

Justus-Liebig Universität Gießen  
IFZ für Umweltsicherung  
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Abschlussbericht

Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß genetischer  
Variation traditioneller Rebsorten im Hinblick auf die  
Erhaltung genetischer Ressourcen

**Forschungsprojekt Nr.:** 514-33.52/04HS023

Teilprojekt 3 „Analyse der Gen-Expression mittels Profilingtechniken“

- |                  |   |
|------------------|---|
| Projektpartner 1 | Forschungsanstalt Geisenheim<br>Fachgebiet Rebenzüchtung                        |
| Projektpartner 2 | Universität Hohenheim<br>Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie |
| Projektpartner 3 | Justus-Liebig Universität Gießen<br>Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung              |

## **Verbundprojektpartner**

Partner 3 (P3)

Justus-Liebig Universität Gießen

IFZ für Umweltsicherung - Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Heinrich-Buff-Ring 26-32

35392 Gießen

Tel.: 0641-99-37420

Fax: 0641-99-37429

Bearbeiter: Wolfgang Friedt, Achim Schmitt

## **Thema**

Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß genetischer Variation traditioneller Rebsorten im Hinblick auf die Erhaltung genetischer Ressourcen

**Forschungsprojekt Nr.:** 514-33.52/04HS023

Teilprojekt 3 „Analyse der Gen-Expression mittels Profilingtechniken“

## **Schlussbericht des Verbundforschungsprojekts**

Berichtszeitraum: 01.10.2005 – 31.03.2009

Bearbeitungszeitraum: 01.10.2005 – 31.03.2009

## **Zusammenarbeit mit**

Partner 1 (P1) Forschungsanstalt Geisenheim

Fachgebiet Rebenzüchtung und Rebveredelung

Eibingerweg 1, 65366 Geisenheim

Bearbeiter: Ernst H. Rühl, Hubert Konrad, Elske M. Schönhals

Partner 2 (P2) Universität Hohenheim

Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie

Emil-Wolff-Str. 25, 70599 Stuttgart

Bearbeiter: Astrid Forneck, Petra Hoffmann



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Tabellen.....	IV
Verzeichnis der Abbildungen.....	V
1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes.....	1
1.1 Gesamtziel des Projekts .....	1
1.2 Teilprojekt 3 .....	2
1.3 Planung und Ablauf des Teilprojekts 3 .....	2
1.3.1 Jahr 1 – 2006.....	3
1.3.2 Jahr 2 – 2007.....	3
1.3.3 Jahr 3 – 2008.....	4
1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand .....	5
2 Material und Methoden .....	8
2.1 Material.....	8
2.1.1 Pflanzenmaterial für die Genexpressionsstudien.....	8
2.1.1.1 Auswahl des Pflanzenmaterials 2006 .....	9
2.1.1.2 Phänotypische Dokumentation 2006.....	10
2.1.1.3 Probennahme 2006.....	10
2.1.1.4 Auswahl des Pflanzenmaterials 2007 und 2008.....	10
2.1.1.5 Phänotypische Dokumentation 2007 und 2008.....	11
2.1.1.6 Probennahme 2007 und 2008.....	11
2.1.2 Pflanzenmaterial zur Sequenzierung von Kandidatengenen .....	11
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 RNA Extraktion .....	13
2.2.2 Microarray Hybridisierung.....	13
2.2.2.1 Affymetrix <i>Vitis vinifera</i> Genome GeneChip®.....	13
2.2.2.2 Genexpressionsanalysen .....	15
2.2.2.3 Experimentelles Design der Genexpressionsanalyse .....	16
2.2.3 Real Time PCR.....	17
2.2.3.1 Quantitative Real Time PCR .....	17
2.2.3.2 Aufbau und Prinzip des Gerätes .....	17
2.2.3.3 Der CT – Wert.....	19
2.2.3.4 PCR – Effizienz .....	19

2.2.3.5	Relative Quantifizierung von Genen.....	20
2.2.3.6	Berechnungssoftware "REST".....	22
2.2.4	Sequenzierung.....	23
2.2.4.1	Direktsequenzierung .....	23
2.2.4.2	Sequenzierung nach Klonierung .....	23
3	Ergebnisse .....	24
3.1	Darstellung der Ergebnisse .....	24
3.1.1	Ausgewählte Klone für die Genexpressionsanalyse .....	24
3.1.1.1	Klon 18 Gm .....	24
3.1.1.2	Klon 1–84 Gm .....	25
3.1.1.3	'Cardinal' .....	26
3.1.2	RNA – Extraktion .....	27
3.1.3	Microarray Analyse .....	28
3.1.3.1	Proben für die Genexpressionsanalyse .....	28
3.1.3.2	Genexpressionsergebnisse.....	29
3.1.3.2.1	Gesamtanzahl differentiell exprimierter Gene.....	29
3.1.3.2.2	Bestimmung der „Top 100“ Gene pro Telexperiment.....	33
3.1.3.2.3	Einteilung nach molekularer Funktion.....	34
3.1.3	Real Time PCR.....	37
3.1.4.1	Auswahl der „Housekeeping Genes“.....	37
3.1.4.2	Auswahl der Kandidatengene für Lockerbeerigkeit.....	38
3.1.4.3	Real Time PCR Experiment – Test der Kandidatengene.....	40
3.1.4.4	Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2006.....	43
3.1.4.5	Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2007.....	55
3.1.4.5.1	Erweiterter Klon – Satz und Probennahme 2007.....	55
3.1.4.5.2	Auswahl der Kandidatengene .....	56
3.1.4.5.3	Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2007 .....	57
3.1.4.6	Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2008.....	62
3.1.4.7	Vergleich 2007 mit 2008 .....	66
3.1.4.8	Vergleich der Standorte Geisenheim und Heppenheim .....	67
3.1.4.9	Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008.....	74
3.1.5	Sequenzierung.....	77
3.1.5.1	Bestimmung der möglichen Promotorenbereiche .....	77
3.1.5.2	Ergebnisse PCR – Produkt Sequenzierung .....	78

3.1.5.3	Ergebnisse der Sequenzierung nach Klonierung .....	80
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse .....	82
3.2.1	Anwendung der Ergebnisse.....	82
4	Zusammenfassung .....	84
4.1	Versuchsjahr 2006.....	84
4.2	Versuchsjahr 2007.....	84
4.3	Versuchsjahr 2008.....	85
4.4	Zusammenfassung Gesamtergebnisse .....	86
5	Gegenüberstellung geplanter und tatsächlich erreichter Ziele .....	88
6	Literaturverzeichnis .....	89
7	Anhang.....	93

## Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Für die Genexpressionsanalysen verwendete Rebsorten und Klone..	8
<b>Tabelle 2:</b> Probennahmezeitpunkte nach Entwicklungsschema für die differenzielle Genexpressionsuntersuchungen.....	9
<b>Tabelle 3:</b> Die Sorten, die mit den für die Genexpressionsstudien verwendeten Klonen den Satz für unterschiedliche Struktur des Fruchtstandes bilden.....	12
<b>Tabelle 4:</b> „Sample Submission Sheet“ für Affymetrix Service.....	29
<b>Tabelle 5:</b> Liste der Oligonukleotide für die Kandidatengene, die aus den Ergebnissen der Microarray Analyse ausgewählt wurden. ....	39
<b>Tabelle 6:</b> Liste der Oligonukleotide für die Kandidatengene, die aus der Literatur ausgewählt wurden, da sie bei anderen Pflanzen Merkmale ähnlich der Lockerbeerigkeit beeinflussen. ....	40
<b>Tabelle 7:</b> Alle Kandidatengene aus der Literatur und aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierung, für die eine Kinetik mittels quantitativer Real Time PCR erstellt wurde. ....	55
<b>Tabelle 8:</b> Ausgewählte Kandidatengene für die Erstellung der Kinetiken mittels quantitativer Real Time PCR für das Pflanzenmaterial 2007. ....	56
<b>Tabelle 9:</b> Erklärung der Abkürzungen in den Legenden der nachfolgenden Abbildungen .....	57
<b>Tabelle 10:</b> Darstellung der Ergebnisse der Kinetiken aus den Versuchsjahren 2007 und 2008 .....	67
<b>Tabelle 11:</b> Identifizierte SNPs in den möglichen Promotorsequenzen der Kandidatengene SPS, ER, STM und REV .....	79

## Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Schematischer Ablauf der Herstellung eines Microarrays .....	14
<b>Abbildung 2:</b> Allgemeiner Arbeitsablauf einer Genexpressionsanalyse mittels Microarray Hybridisierung .....	15
<b>Abbildung 3:</b> Durchgeführte vergleichende Genexpressionsanalysen .....	16
<b>Abbildung 4:</b> 7500 Fast Real-Time PCR System.....	17
<b>Abbildung 5:</b> Detektierbare Farbstoffe .....	18
<b>Abbildung 6:</b> Prinzip der sequenzunabhängigen DNA – Detektion durch SYBR Green I .....	18
<b>Abbildung 7:</b> Entwicklungsstadien beim Klon 18 Gm .....	24
<b>Abbildung 8:</b> Entwicklungsstadien beim Klon 1–84 Gm .....	25
<b>Abbildung 9:</b> Entwicklungsstadium BBCH 85 bei `Cardinal` .....	26
<b>Abbildung 10:</b> Gelelektrophoresebilder extrahierter RNA aus Klon 18 Gm, 1–84 Gm und `Cardinal` nach Zeng et al. (2002). .....	28
<b>Abbildung 11:</b> Darstellung aller Gene, die zum Entwicklungszeitpunkt BBCH 57 signifikant differentiell exprimiert waren. ....	30
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung aller Gene, die zum Entwicklungsstadium BBCH 65 signifikant differentiell exprimiert waren. ....	30
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der Gene, die zwischen BBCH 57 und BBCH 73 signifikant differentiell exprimiert waren. ....	31
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung aller Gene, die zum Entwicklungszeitpunkt BBCH 73 signifikant differentiell exprimiert waren. ....	31
<b>Abbildung 15:</b> Darstellung der Gene, die bei jedem Teilexperiment einen höheren „fold change“ – Wert als $-1 < x < 1$ bei einem p – Wert von 0,05 aufwiesen. ...	33
<b>Abbildung 16:</b> Blast X Ergebnis für das Gen, dass zu drei Zeitpunkten differentiell exprimiert ist.....	35
<b>Abbildung 17:</b> Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene .....	36
<b>Abbildung 18:</b> Ergebnisse der geNorm Auswertung: Sand, UBC und alpha – Tubulin sind die drei stabilsten Referenzgene. ....	37
<b>Abbildung 19:</b> Real Time PCR Ergebnisse für die Kandidatengene aus der Literatur. ....	41
<b>Abbildung 20:</b> Real Time PCR Ergebnisse für die Kandidatengene der Microarray Hybridisierung. ....	42

<b>Abbildung 21:</b> Kinetik für BLIND.....	43
<b>Abbildung 22:</b> Kinetik für LATERAL SUPPRESSOR..	44
<b>Abbildung 23:</b> Kinetik für CLAVATA1..	44
<b>Abbildung 24:</b> Kinetik für CLAVATA2.....	44
<b>Abbildung 25:</b> Kinetik für ERECTA.....	45
<b>Abbildung 26:</b> Kinetik für BREVIPEDICELLUS.....	45
<b>Abbildung 27:</b> Kinetik für PENNYWISE.....	45
<b>Abbildung 28:</b> Kinetik für MORE AXILLARY GROWTH 1.....	46
<b>Abbildung 29:</b> Kinetik für MORE AXILLARY GROWTH 2.....	46
<b>Abbildung 30:</b> Kinetik für MORE AXILLARY GROWTH 3.....	46
<b>Abbildung 31:</b> Kinetik für REVOLUTA.....	47
<b>Abbildung 32:</b> Kinetik für SHOOT MERISTEMLESS.....	47
<b>Abbildung 33:</b> Kinetik für SUPERSHOOT.....	47
<b>Abbildung 34:</b> Kinetik für SUPERMAN..	48
<b>Abbildung 35:</b> Kinetik für bZiP.....	48
<b>Abbildung 36:</b> Kinetik für PKS1.....	48
<b>Abbildung 37:</b> Kinetik für RHG1.....	49
<b>Abbildung 38:</b> Kinetik für TCP2.....	49
<b>Abbildung 39:</b> Kinetik für WRKY1.....	49
<b>Abbildung 40:</b> Kinetik für ZIB1.....	50
<b>Abbildung 41:</b> Kinetik für CB341658.....	50
<b>Abbildung 42:</b> Kinetik für CB341760.....	50
<b>Abbildung 43:</b> Kinetik für CD009416.....	51
<b>Abbildung 44:</b> Kinetik für CD721663.....	51
<b>Abbildung 45:</b> Kinetik für CF202148.....	51
<b>Abbildung 46:</b> Kinetik für CF203567.....	52
<b>Abbildung 47:</b> Kinetik für CF203581.....	52
<b>Abbildung 48:</b> Kinetik für CF204825.....	52
<b>Abbildung 49:</b> Kinetik für CF214472.....	53
<b>Abbildung 50:</b> Kinetik für CF512412.....	53
<b>Abbildung 51:</b> Kinetik für CF512494.....	53
<b>Abbildung 52:</b> Kinetik für CF512751.....	54
<b>Abbildung 53:</b> Kinetik für CF513596.....	54
<b>Abbildung 54:</b> Kinetiken 2007 für LAS, SPS und bZiP.....	59

---

<b>Abbildung 55:</b> Kinetiken 2007 für CD721663, ER und STM. ....	59
<b>Abbildung 56:</b> Kinetiken 2007 für CB341658, PKSf1 und REV. ....	60
<b>Abbildung 57:</b> Kinetiken 2008 für LAS und SPS. ....	62
<b>Abbildung 58:</b> Kinetiken 2008 für bZiP, CD721663 und ER ....	63
<b>Abbildung 59:</b> Kinetiken 2008 für STM, CB341658 und PKSf1. ....	64
<b>Abbildung 60:</b> Kinetiken 2008 REV. ....	65
<b>Abbildung 61:</b> Expressionswerte von LAS für die beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim. ....	68
<b>Abbildung 62:</b> Expressionswerte von SPS für die beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim. ....	69
<b>Abbildung 63:</b> Expressionswerte von bZiP für die beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim. ....	70
<b>Abbildung 64:</b> Expressionswerte von ER für die beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim. ....	71
<b>Abbildung 65:</b> Expressionswerte von STM für die beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim. ....	72
<b>Abbildung 66:</b> Expressionswerte von REV für die beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim. ....	73
<b>Abbildung 67:</b> Ergebnisse der Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008 für die Kandidatengene LAS, SPS und bZiP ....	75
<b>Abbildung 68:</b> Ergebnisse der Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008 für die Kandidatengene ER, STM und REV ....	76
<b>Abbildung 69:</b> Sequenzausschnitt des möglichen Promotorbereiches von SPS	78
<b>Abbildung 70:</b> Sequenzausschnitt des möglichen Promotorbereiches von SPS für den Probensatz `Pinot´. ....	80
<b>Abbildung 71:</b> Sequenzausschnitt des möglichen Promotorbereiches von bZiP für den Probensatz Lockerbeerigkeit. ....	81

# 1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

## 1.1 Gesamtziel des Projekts

Die Erhaltung der genetischen Vielzahl von Wild- und Kulturpflanzen ist eine der wichtigen Forderungen der Agenda 21 der Vereinten Nationen (UN). Reben, die seit Jahrhunderten vegetativ vermehrt werden, zeigen ein großes und äußerst vielfältiges Sortenspektrum und intervarietale Variation (= Klone) entwickelt. Man schätzt weltweit zwischen 6000 und 8000 alte Rebsorten mit zum Teil mehr als tausendjähriger Kulturgeschichte. Diese alten, traditionellen 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 Entwicklung von Methoden, die Wichtiges von Unwichtigem und Einzigartiges von der breiten Masse abgrenzen helfen, dringend erforderlich.

Das Projekt zielt auf die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der genetischen Einzigartigkeit eines Rebklons ab, um damit die Erhaltung der genetischen Vielfalt möglichst effizient zu ermöglichen. Diese Methode kann anschließend zur Charakterisierung von alten Reben eingesetzt werden, wobei ein schnelles und effizientes, von Virus und standortbedingten Merkmals-Unterschieden unabhängiges Selektieren möglich ist. Außerdem kann sichergestellt werden, dass bei der Erhaltung der genetischen Variation wichtiges von unwichtigem Pflanzenmaterial, sowie einzigartiges Pflanzenmaterial von der breiten Masse abgegrenzt werden kann.

Im Rahmen dieses Projektes sollten daher modellhaft Klone von `Riesling` und `Spätburgunder` sowie ihre verschiedenen Spielarten phänologisch, morphologisch, physiologisch und genetisch untersucht und charakterisiert

werden. Die Aufgabe der Justus – Liebig Universität (P3) war es hierbei, zunächst an ausgewählten Klonen vom `Blauen Spätburgunder` Untersuchungen zur Genexpression durchzuführen. Das virusfreie Pflanzenmaterial wurde von den Projektpartnern, bzw. vom Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof bereitgestellt. Für die Genexpressionsanalysen wurden kommerziell verfügbare DNA – Chips verwendet. Aus den Ergebnissen dieser Analyse sollten Kandidatengene entwickelt werden, die später in molekulare Marker umgewandelt werden sollten, die für die Marker – gestützte Selektion in der Züchtung nutzbar sind.

Diese Marker sollen den Verbundpartnern zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in der Klonenzüchtung testen können. Bei Eignung dieser Methode zur Entwicklung von Markern für ein bestimmtes Merkmal für die Marker – gestützte Selektion sollte es möglich werden, potentielle genetische Ressourcen eindeutig zu charakterisieren. Langwierige Anbauversuche zur Unterscheidung der Klone könnten somit beschleunigt werden.

### **1.2 Teilprojekt 3**

Die Aufgabe der Justus – Liebig Universität – als Projektpartner 3 (P3) – war es, an ausgewählten Klonen vom `Blauen Spätburgunder` Untersuchungen zur Genexpression mittels geeigneter Profilingtechniken (z.B.: Microarray Analyse, quantitative Real Time PCR) durchzuführen. Diese erlauben in multiparallelen Ansätzen Genaktivitätsunterschiede zwischen Klonen zu untersuchen und differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Ziel war es, im direkten Vergleich zweier Klone vom `Blauen Spätburgunder` die erwartete geringe Anzahl an differentiell exprimierten Genen zu erfassen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu genutzt werden, die zugrundeliegenden DNA – Sequenzen in molekulare Marker für die Klonenzüchtung zu konvertieren. Das Hauptaugenmerk wurde auf das Merkmal “lockerbeerige / kompakte“ Struktur der Trauben bei `Spätburgunder` gelegt.

### **1.3 Planung und Ablauf des Teilprojekts 3**

Die ausgesuchten Klone wurden in drei Versuchsjahren an der Justus – Liebig Universität mittels geeigneter Profilingtechniken auf differentielle Genexpression in Hinsicht auf das Merkmal “lockerbeerige / kompakte“ Traube untersucht. Das Pflanzenmaterial für die Genexpressionsanalysen wurde von dem Partner Forschungsanstalt Geisenheim (P1) sowie vom Institut für Rebenzüchtung

Geilweilerhof in Siebeldingen und vom Weinbaubetrieb Antes in Heppenheim zur Verfügung gestellt.

### **1.3.1 Jahr 1 – 2006**

Zu Beginn des ersten Versuchsjahres wurden in Absprache mit den Projektpartnern Geisenheim (P1) und Hohenheim (P2) ein "kompakter" und ein "lockerbeeriger" `Spätburgunder`- Klon für die differentiellen Genexpressionsanalysen ausgewählt, die bereits deutliche Unterschiede in der Merkmalsausprägung der Lockerbeerigkeit gezeigt hatten. An beiden Klone wurden über die gesamte Vegetationsperiode hinweg Proben der Gescheine und später der Fruchtstände gesammelt.

Für dieses Pflanzenmaterial musste zunächst eine geeignete RNA – Extraktionsmethode entwickelt werden, um qualitativ hochwertige RNA für die Genexpressionsanalysen zu erhalten. Nach erfolgreicher Etablierung einer geeigneten RNA – Extraktionsmethode konnte die RNA für die Genexpressionsanalysen mittels Microarray Hybridisierungen extrahiert werden. Die gewonnene mRNA wurde in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde an das deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Ressourcenzentrum Primärdatenbank) in Berlin geschickt, wo im Service die Microarray Hybridisierung und die anschließende Analyse durchgeführt wurden.

### **1.3.2 Jahr 2 – 2007**

Im zweiten Projektjahr wurden die Ergebnisse der Microarray Hybridisierungen ausgewertet, um mögliche Kandidatengene für das Merkmal "lockerbeerige / kompakte Traube" zu identifizieren. Weitere interessante Kandidatengene konnten in der Literatur gefunden werden. Hierbei handelt es sich um Gene, welche bei anderen Pflanzen an den Merkmalsausprägungen der Architektur des Fruchtstandes, der Verzweigung oder dem Längenwachstum beteiligt sind.

Mit allen Kandidatengenen wurde eine quantitative Real Time PCR (qRT PCR) durchgeführt, um die Ergebnisse der Microarray Hybridisierung zu verifizieren und eine mögliche differentielle Expression der Kandidatengene zwischen den beiden Klone detektieren zu können.

Als nächster Schritt wurde für jedes Kandidatengene eine Kinetik des Expressionsmusters über die gesamte Vegetationsperiode experimentell mittels quantitativer Real Time PCR ermittelt, um eine Aussage über die differentielle

Genexpression zwischen den beiden Klonen treffen zu können. Mit Hilfe der Kinetiken konnten sowohl die Anzahl der interessanten Kandidatengene als auch die Anzahl der interessantesten Wachstumszeitpunkte für die weiteren Untersuchungen eingegrenzt werden.

Alle Gene, die eine gesicherte differentielle Expression zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen aufwiesen, wurden an einem erweiterten Satz an Klonen untersucht. Von diesem erweiterten Satz an Klonen wurde in der Vegetationsperiode 2007 Pflanzenmaterial an zwei verschiedenen Standorten, Geisenheim und Heppenheim, gesammelt. Aus diesem Material wurde mittels quantitativer Real Time PCR eine Kinetik des Expressionsmusters der einzelnen Kandidatengene ermittelt.

### **1.3.3 Jahr 3 – 2008**

Im dritten Projektjahr wurde erneut Pflanzenmaterial des erweiterten Satzes an Klonen von den beiden Standorten während der Vegetationsperiode gesammelt. An diesem Pflanzenmaterial wurde für die Gene, die im Jahr 2007 eine stabile differentielle Genexpression an beiden Standorten zwischen den "kompakten" und den "lockerbeerigen" Klonen gezeigt hatten, erneut eine Kinetik des Expressionsmusters mittels quantitativer Real Time PCR ermittelt.

Nach Auswertung aller qRT PCR Ergebnissen, wurden die 5' – UTR („Untranslated Region“) und Promotorbereiche der Kandidatengene, die über beide Jahre und an beiden Standorten eine stabile differentielle Expression zwischen den "kompakten" und "lockerbeerigen" Klonen gezeigt hatten, *in silico* zu ermitteln versucht. Für diesen Bereich wurden spezifische Oligonukleotide entwickelt, mit denen der mögliche Promotorbereich amplifiziert werden konnte.

Für die anschließende Sequenzierung wurde ein Probensatz zusammengestellt, der neben den "kompakten" und den "lockerbeerigen" Klonen, die in den Genexpressionsanalysen untersucht worden waren, weitere "kompakte", "intermediäre" und "lockerbeerige" Rebsorten enthält. Die amplifizierten DNA – Fragmente wurde im Service von der Firma GATC, Konstanz direkt sequenziert. Die Promotorbereiche, die nicht erfolgreich direkt sequenziert werden konnten, was auf deutlich ausgeprägte Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen hindeutet, wurden kloniert und anschließend im Auftrag von der Firma GATC, Konstanz sequenziert.

Abschließend wurden anhand der Sequenzierungsergebnisse Marker für die interessanten Gene entwickelt, die an der Ausbildung der Lockerbeerigkeit beteiligt sein könnten.

### **1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand**

Die Rebe gehört zu den ältesten Kulturpflanzen der Menschheit. Ihre frühe Inkulturnahme ist neben den vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten als Tafeltrauben, für Rosinen, Saft, Wein und Essig 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. genetisch identische Kopien (Klone) angelegt werden, konnten sich im Verlauf von Jahrtausenden durch Vermehrung der besten Genotypen unsere heutigen Rebsorten entwickeln.

Die fortgesetzte vegetative (klonale) Vermehrung der Rebsorten hat in Verbindung mit natürlicher Mutation und anthropogener Selektion zu zahlreichen Spielarten und Variationen geführt. Einige dieser Formen sind so auffällig, dass aus ihnen eigenständige Rebsorten entstanden sind, andere werden dagegen als Klone einer Rebsorte zugeordnet. So sind aus ursprünglich blauen Rebsorten weiße Rebsorten hervorgegangen, wie der 'Grauburgunder' ('Grauburgunder') und 'Weißburgunder' aus dem 'Blauen Spätburgunder'. Zusätzlich dazu sind innerhalb der Rebsorten morphologische Varianten entstanden, wie beispielsweise Klone mit kompakten oder lockerbeerigen Traubenstrukturen. Genetisch betrachtet sind Burgundersorten als Mutanten hinsichtlich der Beerenhautfarbe aufzufassen, die auf Grund der lange zurückliegenden Trennung zahlreiche weitere, oft stille Mutationen tragen. Diese Mutationen lassen sich teilweise durch molekulare Marker erfassen (Forneck et al. 2003). Die Differenzierung zwischen den Burgundersorten lässt trotz dieser genetischen Betrachtung keine Zweifel an ihrer Eigenständigkeit als Rebsorte aufkommen. Vom Standpunkt des Sortenrechtes begründet sich diese Position mit Unterschieden in den so genannten Registermerkmalen.

Aufgrund der teilweise sehr unterschiedlichen Merkmalsausprägung von Klonen, sind Berichte über signifikante Ertrags- und Qualitätsunterschiede innerhalb von Rebsorten keineswegs verwunderlich (z.B. Becker und Sievers 1978, Cirami 1993, Cirami et al. 1984, 1985, 1993, Schöffling und Stellmach 1993, Pérez-Hugalde et al. 2004). Die Leistungsunterschiede zwischen Klonen können allerdings auch

durch Virusinfektionen verursacht sein, da Virusinfektionen zu erheblichen Leistungsbeeinträchtigungen führen können (z.B. Mannini et al. 1996, 1998, Credi und Babini 1997).

Varianten, die aus bestehenden Rebsorten durch Knospenmutation hervorgegangen sind und neue Eigenschaften besaßen, waren während der Geschichte des Weinbaus die Quelle für die Entwicklung „verbesserter“ Rebklone. Die Mutationen, welche sich über den Verlauf der Zeit hinweg akkumulierten, haben zur Bildung der genetischen Streubreite innerhalb der Rebsorten geführt. Diese Streubreite ist auch heute noch die entscheidende Voraussetzung für die Selektion neuer, praxisrelevanter Klone und für die Erzeugung von Weinen unterschiedlicher Aromausprägung (Lindner et al. 2008, Schönhals et al. 2008). Für die Klonenselektion ist daher die gegebene genetische Variationsbreite von großer Bedeutung, da nicht selektiert werden kann, was nicht bereits vorhanden ist. Die Erhaltung der genetischen Variation von traditionellen Rebsorten ist daher die Vorbedingung für die nachhaltige Entwicklung neuer, an die Umweltbedingungen angepasster Klone. Sie bildet die Grundlage der Weiterentwicklung und der Konkurrenzfähigkeit des zukünftigen Weinbaus. Daher arbeiten verschiedene Institutionen daran, alte Rebbestände mit züchterisch nicht bearbeitetem Pflanzenmaterial zu erfassen (Junk 2002, Maul und Jung 2003) und die darin befindliche Rebsortenvielfalt zu erschließen (Konrad et al. 2003, Schönhals et al. 2008). Der berechtigten Forderung einer möglichst vollständigen Erhaltung der genetischen Vielfalt innerhalb alter Rebsorten stehen praktische und finanzielle Zwänge entgegen. Der Selekteur stellt sich immer die Frage, was erhaltenswert ist und worauf verzichtet werden kann.

Diese Frage lässt sich in zwei Teilfragen untergliedern, die in diesem Projekt bearbeitet wurden:

- i. Wieweit unterscheiden sich Klone in ihren physiologischen Kennzahlen?
- ii. Wieweit unterscheiden sich Klone genetisch, hinsichtlich ihrer Gensequenzen?

Beide Fragen sind sowohl für die grundsätzliche Entscheidung über die Notwendigkeit einer Klonenerhaltung, sowie für die Wertermittlung einzelner Klone erforderlich. Ziel des Projekts war es daher, exemplarisch die Variation von Klonen

der Rebsorten `Riesling´ und `Spätburgunder´ hinsichtlich ihrer physiologischen Kennzahlen und ihrer genetischen Struktur zu untersuchen und die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze zu verbinden. Neuere Untersuchungen haben bestätigt, dass sich Klone sowohl in ihren weinbaulichen Eigenschaften (Rühl et al. 2000, 2002) als auch hinsichtlich ihrer genetischen Information unterscheiden (Forneck et al. 2003, Konradi et al. 2003).

Unterschiede in der Merkmalsausprägung lassen sich grundsätzlich durch Techniken wie „Transcriptional Profiling“ (Zhao et al. 1995, Bouchez und Höfte 1998, Desprez et al. 1998) erfassen, eine „Reverse Northern“ – Technik, die auf DNA – Arrays basiert. Bei der DNA – Chiptechnologie wird ein Glasträger als Unterlage verwendet, auf welchem 25 Basen lange Fragmente, die von bekannten Genen abgeleitet wurden, gespottet sind. An diese könne Fluoreszenz – markierte cDNA – Fragmente hybridisieren und anschließend mit einem Fluoreszenz – Scanner detektiert werden (Schena et al. 1998). Von der Firma Affymetrix ist ein *Vitis vinifera* Genome Gene Chip käuflich zu erhalten, auf dem 14,000 Transkripte von *V. vinifera* und 1,700 Transkripte von anderen *Vitis* Arten gespottet sind.

Eine weitere Technik, Unterschiede in der Merkmalsausprägung detektieren zu können, ist die Technik der quantitativen Real Time PCR. Hier können Unterschiede in der Kopienzahl einzelner Gene bzw. ihrer Transkripte mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt werden.

Diese Methoden erlauben es, in multiparallelen Ansätzen Unterschiede zwischen Klonen zu untersuchen und differentiell exprimierte Gene identifizieren zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial für die Genexpressionsstudien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Pflanzenmaterial von verschiedenen *Vitis vinifera* Sorten für die Genexpressionsstudien verwendet, die im Bezug auf die Merkmalsausprägung „Struktur des Fruchtstandes“ große phänotypische Unterschiede aufweisen. Das Pflanzenmaterial für die Genexpressionsanalysen wurde vom Kooperationspartner Forschungsanstalt Geisenheim sowie vom Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen und vom Weinbaubetrieb Antes in Heppenheim zur Verfügung gestellt.

Im einzelnen handelt es sich um Pflanzenmaterial der Sorten `Spätburgunder`, `Chardonnay`, `Grauburgunder` und der sehr lockerbeerigen, großtraubigen Tafeltraube `Cardinal`. In Tabelle 1 sind die Klone aufgelistet, die Struktur ihres Fruchtstandes und in welchem Jahr (2006, 2007, 2008) und an welchem Standort (Gm = Geisenheim; Hm = Heppenheim; Gf = Geilweilerhof) diese beprobt wurden.

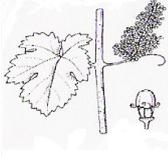
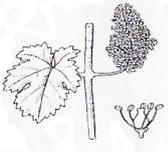
**Tabelle 1:** Für die Genexpressionsanalysen verwendete Rebsorten und Klone

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	
`Ruländer`	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				

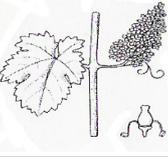
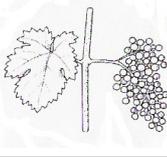
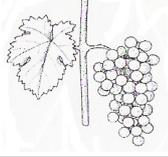
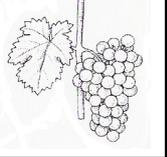
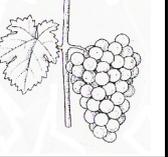
**2.1.1.1 Auswahl des Pflanzenmaterials 2006**

Im Jahr 2006 wurde die beiden `Spätburgunder`- Klone 1–84 Gm und 18 Gm am Standort Geisenheim beprobt. Der Klon 18 Gm bildet kurze Beerenstielchen und entwickelt somit kompakte Trauben. Im Gegensatz dazu zeigt 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. Der Klon 20–13 Gm bildet mischbeerige Fruchtstände aus, d. h. es sind sowohl große als auch kleine Beeren in einer Traube enthalten. 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. 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 extremes Vergleichsmaterial zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2:** Probennahmezeitpunkte nach Entwicklungsschema für die differenziellen Genexpressionsuntersuchungen

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

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

### 2.1.1.2 Phänotypische Dokumentation 2006

In den Anlagen der beiden `Spätburgunder´– Klone 18 Gm und 1–84 Gm in Geisenheim wurden durch P1 je vier Einzelstöcke ausgesucht, an denen die phänologische Entwicklung dokumentiert werden sollte. Ab dem Austrieb wurden im wöchentlichem Abstand an diesen Einzelstöcken je eine repräsentativer Blütenstand (später die Traube) photographiert. Durch die photographische Dokumentation sollten phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Klonen erfasst werden.

### 2.1.1.3 Probennahme 2006

Um die Zeitpunkte für die Probennahme von Pflanzenmaterial klar zu definieren, wurde die BBCH Skala (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft) zur Beschreibung von Entwicklungsstadien bei Kultur- und Unkrautarten verwendet.

Die Kurzbezeichnung BBCH leitet sich von “**B**iologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, **B**undessortenamt und **C**hemische Industrie“ ab. Diese Skala ist in Makro- und Mikrostadien unterteilt. Bei der Probennahme wurde darauf geachtet, die Makrostadien von der Entwicklung der Blütenstände bis hin zur Frucht- und Samenreife abzudecken. Die Makrostadien und die Mikrostadien, sowie der Zeitpunkt der Probenahmen an den beiden `Spätburgunder´– Klonen 18 Gm und 1–84 Gm am Standort Geisenheim sind in Tabelle 2 beschrieben. Die Klone 20–13 Gm. Frank Classic und Frank Charisma bzw. die Tafeltraube `Cardinal´ am Standort Siebeldingen wurden nur zum Zeitpunkt BBCH 65, also zur Vollblüte beprobt.

### 2.1.1.4 Auswahl des Pflanzenmaterials 2007 und 2008

In den beiden Jahren 2007 und 2008 wurde zusätzlich zu den beiden `Spätburgunder´– Klonen 1–84 Gm und 18 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 kompakte Fruchtstände aus, der `Chardonnay´– Klon 1–45 Gm und der `Grauburgunder´– Klon 1–30 Gm große lockere Fruchtstände. Am Standort

Heppenheim wurden neben den oben beschriebenen `Spätburgunder´– Klonen 18 Gm, 1–84 Gm und INRA 777 auch vom Weinsberger Klon M242 Proben entnommen. Dieser Klon zeichnet sich durch ein sehr lockeres Traubengerüst aus.

#### **2.1.1.5 Phänotypische Dokumentation 2007 und 2008**

In den Anlagen der beiden `Spätburgunder´– Klone 18 Gm und 1–84 Gm in Geisenheim wurden die selben vier Einzelstöcke ausgewählt, an denen schon im Jahr 2006 die phänologische Entwicklung dokumentiert worden war. Zusätzlich wurde die phänologische Entwicklung der beiden `Chardonnay´– Klone dokumentiert. Ab dem Austrieb wurde im wöchentlichem Abstand an diesen Einzelstöcken je eine repräsentativer Blütenstand (später die Traube) durch P1 photographiert. Durch die photographische Dokumentation sollten phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Klonen erfasst werden.

#### **2.1.1.6 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 an den Standorten Geisenheim und Heppenheim entnommen.

#### **2.1.2 Pflanzenmaterial zur Sequenzierung von Kandidatengen**

Im Jahr 2008 wurden von den verschiedenen Klonen, an denen die Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden, neben den Gescheins– bzw. Fruchtständen Proben ebenfalls Blätter für Arbeiten mit genomischer DNA an den verschiedenen Standorten entnommen. Des Weiteren wurde ein Satz verschiedener Sorten erstellt, der sich in drei Untereinheiten gliedert. Ein Teil der beprobten Sorten bildet einen kompakten Fruchtstand aus, der zweite Teil bildet einen lockeren Fruchtstand aus und der dritte Teil einen intermediären Fruchtstand, d.h. die Struktur des Fruchtstandes ist eine Zwischenform von kompakt und locker.

In Tabelle 3 sind die 22 Sorten mit Namen und ihrer Abstammung aufgelistet, soweit diese bekannt ist. Die Bonitur erfolgte nach dem OIV Deskriptor 204, der

das Merkmal "Dichte der Traube" beschreibt. Bonituren unter 3 bedeuten sehr locker bis locker, 5 bis 6 mittel bzw. intermediär und 7 dicht bzw. kompakt.

**Tabelle 3:** Die Sorten, die mit den für die Genexpressionsstudien verwendeten Klonen den Satz für die unterschiedliche Struktur des Fruchtstandes bilden.

	SORTE	ABSTAMMUNG	BONITUR
Locker	´Harslevelue´	-	<3
	´Arbane´	-	<3
	´Koshu´	-	<3
	´Räuschling´	´Pinot´ x ´Heunisch´	<3
	´Black Rose´	´Damas Rose´ x ´Black Monukka´	<3
	´Cardinal´	´Ahmeur Bou Ahmeur´ x ´Alphonse Lavallee´	<3
Intermediär	´Regent´	(´Silvaner´ x ´Müller-Thurgau´) x ´Chambourcin´	5
	´Dornfelder´	´Helfensteiner´ x ´Heroldrebe´	5
	´Kerner´	´Trollinger´ x ´Riesling´	5
	´Müller-Thurgau´	´Riesling´ x ´Madeleine Royale´	6
	´Muskateller´	-	6
	´Riesling´	´Heunisch´ x <i>V. sylvestris</i>	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
Kompakt	´Grauburgunder´	´Pinot´	7
	´Portugieser´	-	7
	´Schwarzriesling´	´Pinot´	7
	´Dakapo´	´Deckrot´ x ´Portugieser´	7
	´St. Laurent´	´Pinot´	7
	´Villaris´	´Sirius´ x ´Villard blanc´	7

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 RNA Extraktion

RNA ist das Ausgangsmaterial für differenzielle Genexpressionsstudien durch z.B. Microarray Analyse und qRT Time PCR. Wichtig ist hierbei, dass die Qualität der RNA hochwertig ist, das heißt, dass die RNA möglichst undegradiert und frei von Verunreinigungen sein sollte. Die Rebe ist eine Pflanze, die sehr Phenol- und Polysaccharidreich ist, wodurch es schwierig ist, qualitativ hochwertige RNA zu extrahieren. Da bisher noch kein Protokoll für die Extraktion von RNA aus Blütenständen der Rebe veröffentlicht war, wurden zunächst sowohl kommerziell erhältliche Kits (z.B. von Qiagen, Invitex und MoBio) als auch RNA Extraktionsprotokolle für andere Pflanzen mit hohem Phenol- und Polysaccharidgehalt (z.B. Chang et al. (1993); Zeng et al. (2002); landolino et al. (2004)) an den Blütenständen der Reben getestet. Anschließend wurden Modifikationen dieser Protokolle ebenfalls getestet, um die Extraktionsmethode zu optimieren.

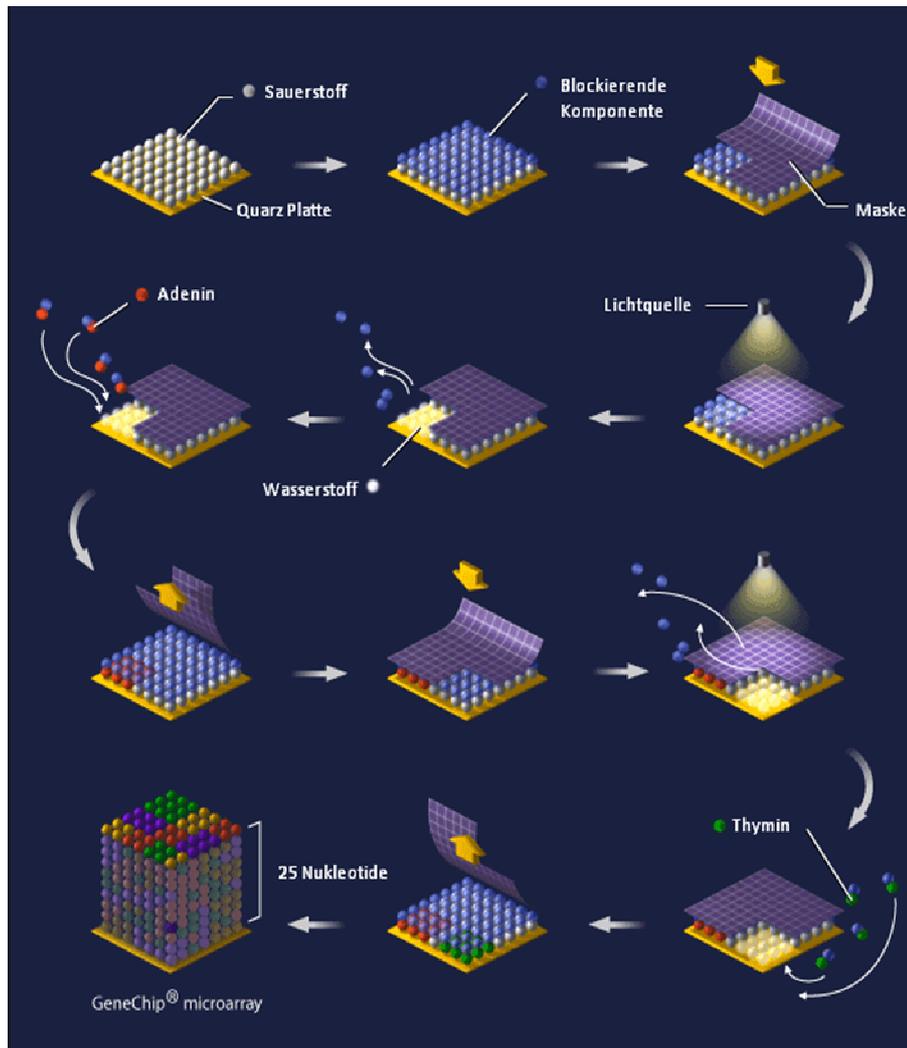
### 2.2.2 Microarray Hybridisierung

#### 2.2.2.1 Affymetrix *Vitis vinifera* Genome GeneChip®

Auf Oligonukleotid Arrays sind kleine 25 Basen lange Fragmente aus den Genen der Weinrebe als einzelsträngige DNA gespottet. Insgesamt sind pro Gen 11 bis 16 Kopien dieser DNA – Fragmente auf dem Array verteilt. Die DNA – Fragmente, auch Sonden genannt, sind so gewählt, das möglichst keine Kreuzreaktion mit anderen Genen auftritt, und somit eine unspezifische Hybridisierung minimiert wird. Trotzdem sind unspezifische Hybridisierungen nicht vollständig zu vermeiden. Zur Kontrolle wird daher unmittelbar neben der ersten Sonde eine zweite Sonde, die bis auf eine Base in ihrer Mitte identisch mit der ersten ist, auf dem Chip platziert. Diese Strategie wird „Perfect Match/Mismatch“ (PM/MM) genannt. Die Hintergrundhybridisierungen mit den MM Sonden wird von den PM Proben subtrahiert, was zu aussagefähigen Hybridisierungsdaten führt.

Auf den GeneChip® *Vitis vinifera* von Affymetrix sind 14,000 Transkripte von *V. vinifera* und 1,700 Transkripte von anderen *Vitis* Arten gespottet. Der Chip wurde hergestellt durch eine Kombination aus Photolithographie und chemischen Reaktionen, diese Technik erlaubt sehr schnell eine simultane Generierung tausender Sonden (siehe Abbildung 1). Ihre Produktion beginnt mit einer kleinen

Quarzplatte, die die optimale Trägersubstanz für chemische gebundenen Oligonukleotide darstellt.



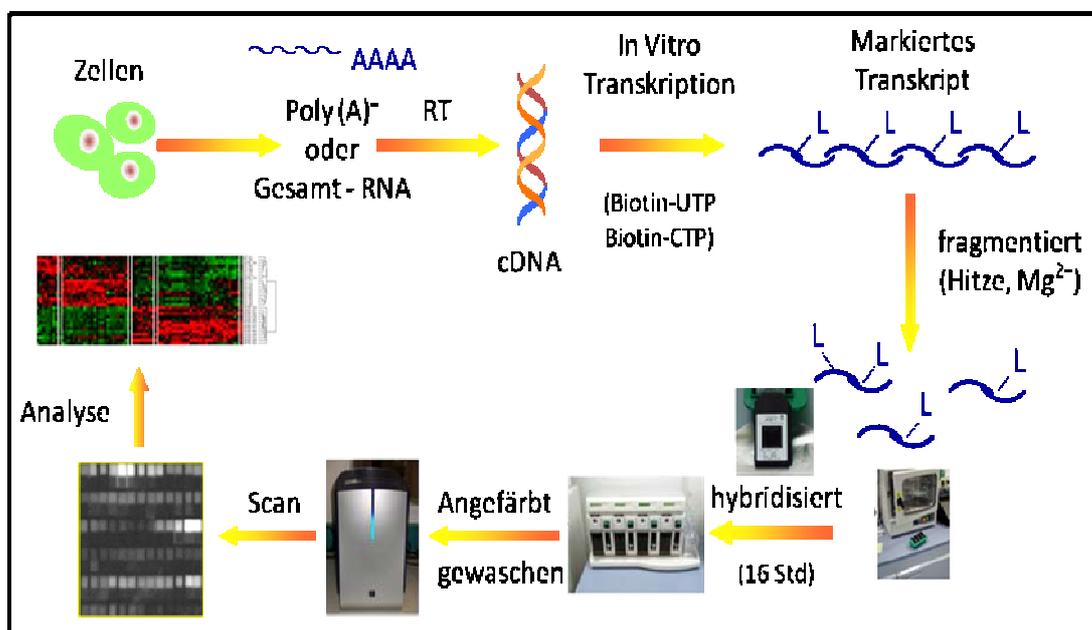
**Abbildung 1:** Schematischer Ablauf der Herstellung eines Microarrays (Affymetrix)

Die Quarzplatte wird mit einer blockierenden Komponente gewaschen, die durch Lichtbestrahlung wieder entfernt werden kann. Als nächstes wird eine Art Maske benötigt, die so beschaffen ist, dass an den Stellen, wo eine spezifische Base benötigt wird,  $18 - 20 \mu\text{m}^2$  kleine Fenster Licht auf diese Stelle durchlassen. Wird zum Beispiel an einer Stelle Adenin für eine Sonde benötigt, so befindet sich an dieser Stelle der Maske ein Fenster. Alle anderen Stellen werden durch die Maske verdeckt. Nachdem die Maske auf den Array gelegt ist, wird dieser mit ultravioletten Licht bestrahlt. An den Stellen der Sonden, die dem Licht ausgesetzt sind, löst sich die blockierende Komponente, alle anderen Positionen bleiben durch diese besetzt. Anschließend wird der Array mit einer Lösung der benötigten Base gewaschen (z.B.: Adenin), welche sich mit der blockierenden Komponente

verbindet, wodurch die Base an die Stellen des Arrays gebunden werden, die dem Licht ausgesetzt waren. Nun wird eine neue Maske auf den Array gelegt, mit Fenstern für die Stellen, an denen die nächste Base (z.B.: Thymin) benötigt wird. Dieser Prozess wird solange wiederholt, bis alle Sonden komplett synthetisiert sind, d.h. bis sie alle 25 Nukleotide lang sind. Mit Hilfe von Algorithmen können Computer das optimale Design der Masken berechnen, um die Anzahl der benötigten Reaktionen so klein wie möglich zu halten.

### 2.2.2.2 Genexpressionsanalysen

Die Microarray Analysen wurden im Service vom RZPD in Berlin durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde Gesamt – RNA von allen Proben nach Berlin geschickt. Der Service beinhaltet folgende Schritte: Zunächst wurde poly (A)<sup>+</sup> mRNA isoliert und im BioAnalyzer (Agilent, Waldbronn) auf ihre Qualität überprüft. Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgewandelt, dann unter Biotin-Markierung *in vitro* in cRNA transkribiert und fragmentiert. Die Biotin markierten cRNA – Fragmente wurden auf den *Vitis vinifera* GeneChip® hybridisiert.



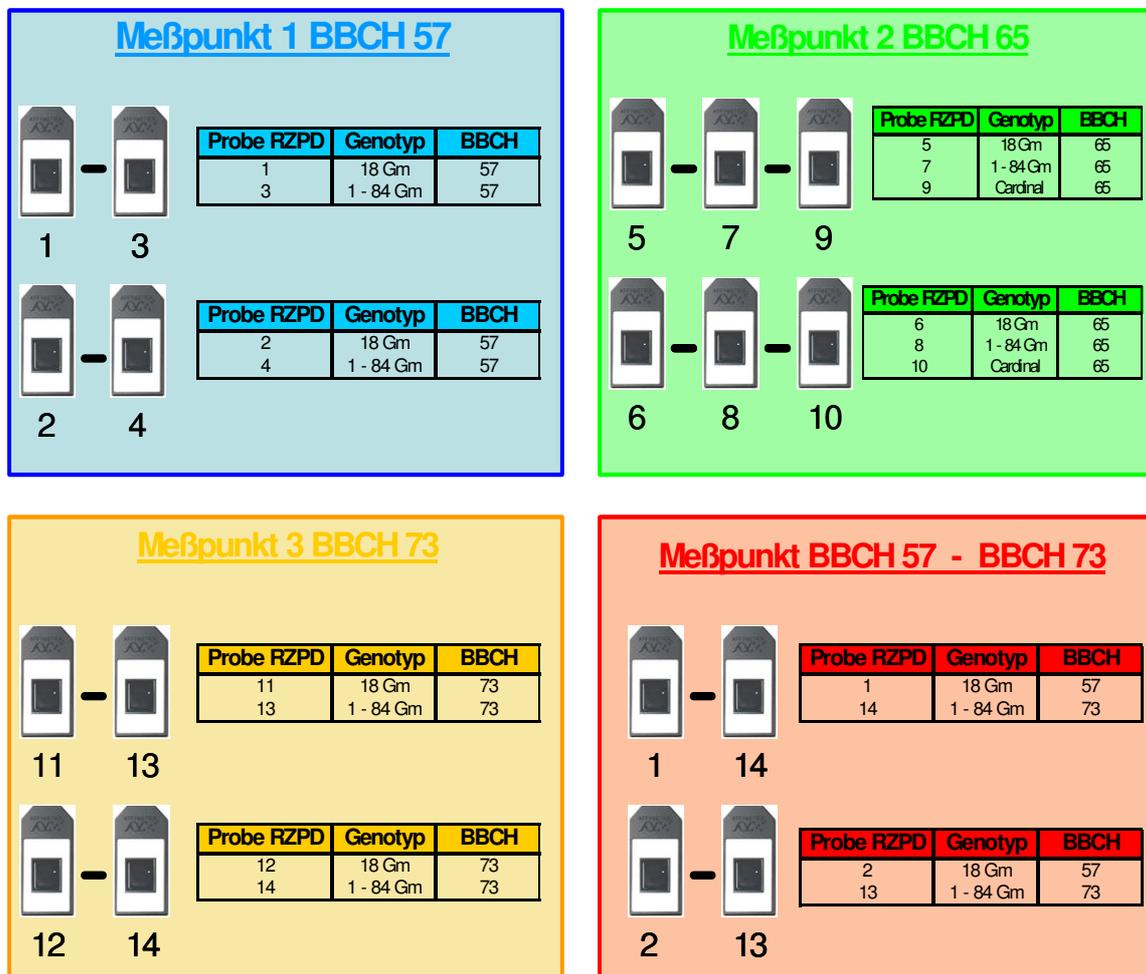
**Abbildung 2:** Allgemeiner Arbeitsablauf einer Genexpressionsanalyse mittels Microarray Hybridisierung

Nach der Hybridisierung kann die mit Biotin markierte cRNA mit Streptavidin – Phycoerythrin angefärbt werden. **Streptavidin** ist ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes Protein, deren 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. Sein Absorptionsspektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 496 nm und hat sein Emissionsmaximum bei 521 nm. Anschließend wurde der Chip gewaschen, angefärbt und eingescannt. In Abbildung 2 ist der gesamte Arbeitsablauf einer Genexpressionsanalyse mittels Microarray Analyse abgebildet.

### 2.2.2.3 Experimentelles Design der Genexpressionsanalyse

Insgesamt wurden vergleichende Genexpressionsanalysen bei drei verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt.



**Abbildung 3:** Durchgeführte vergleichende Genexpressionsanalysen

Zu den zwei Stadien BBCH 57 und 73 wurde die Genexpression der beiden 'Spätburgunder'- Klone 18 Gm und 1-84 Gm miteinander verglichen, zum Stadium BBCH 65, d.h. zur Vollblüte, wurden die beiden 'Spätburgunder'- Klone zusätzlich mit der Tafeltraube 'Cardinal' verglichen. In der vierten

Genexpressionsanalyse wurden die Klone 18 Gm (BBCH 57) mit den Klonen 1–84 Gm (BBCH 73) verglichen. Für jeden Messpunkt wurde eine biologische Wiederholung durchgeführt. In Abbildung 3 ist ein Schema des experimentellen Designs der durchgeführten Genexpressionsanalysen abgebildet. Auf technische Wiederholungen konnte verzichtet werden, da die Ergebnisse anschließend mit quantitativer Real Time PCR verifiziert wurden.

### 2.2.3 Real Time PCR

#### 2.2.3.1 Quantitative Real Time PCR

Die Methode der Real – Time PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR, wobei die Amplifikation des Ausgangsmaterials durch Integration von Fluoreszenzfarbstoffen über einen PC – Monitor in Echtzeit überwacht und die Transkriptmenge eines Gens quantitativ bestimmt werden kann.

#### 2.2.3.2 Aufbau und Prinzip des Gerätes

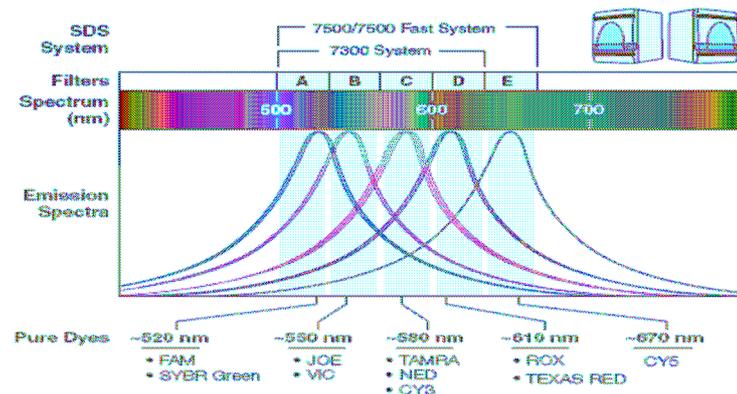
Der 7500 Fast Real-Time PCR System (Abbildung 4) wurde von der Firma Applied Biosystems entwickelt und besteht aus einem PCR – Cyclus und einem Fluorimeter. In Kombination mit einem Computer mit Monitor und Software (7500 Fast System SDS 1.3.1) wird er für quantitative Untersuchungen verwendet.

Der PCR – Cyclus bildet die Amplifikationseinheit des Gerätes, die den Reaktionsablauf ermöglicht. Schnelle Heiz- und Kühlraten verkürzen die Analysezeiten, können allerdings auch die homogene Verteilung und exakte Einhaltung der Temperatur erschweren. Um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, muss an jeder Position des Blocks zur gleichen Zeit die gleiche Temperatur herrschen. Im 7500 Fast Real Time PCR System wird hierfür ein Peltier – Element eingesetzt.



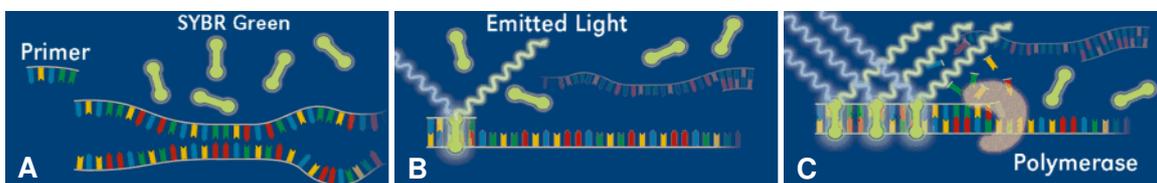
**Abbildung 4:** 7500 Fast Real-Time PCR System

Das Fluorimeter bildet die Detektionseinheit des Gerätes, die aus fünf Anregungs- und fünf Detektionskanälen A, B, C, D, E ( A = grün = 520 nm / B = hellgrün = 550 nm / C = gelb = 580 nm / D = rot = 610 nm / E = tiefrot = 670 nm) besteht. Die Detektion erfolgt nacheinander durch stufenweise Positionierung der Proben über die optische Einheit des Fluorimeters. In Abbildung 5 sind alle Farbstoffe aufgelistet, die mit dem 7500 Fast System detektiert werden können.



**Abbildung 5:** Detektierbare Farbstoffe ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com))

Der Nachweis der PCR – Produkte erfolgte über die Fluoreszenzmessung des DNA bindenden asymmetrischen Cyanin – Farbstoffs SYBR Green I. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sequenzunabhängig aber spezifisch an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Er wird bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei 521 nm. Das Prinzip der Detektion mit SYBR Green I beruht auf die Bestimmung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs nach dessen Bindung an doppelsträngige DNA.



**Abbildung 6:** Prinzip der sequenzunabhängigen DNA – Detektion durch SYBR Green I; Quelle modifiziert: <http://www.gene-quantification.de>

Die Leuchtkraft des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I ist in gelöster Form gering (Abbildung 6 A), erhöht sich aber drastisch in gebundener Form. Während der PCR Reaktion beginnt nach der Anlagerung der Primer (Abbildung 6 B) die *Taq* – DNA – Polymerase mit der Kettenverlängerung, wobei zuerst wenige und

danach immer mehr Fluoreszenzmoleküle in den entstehenden DNA Doppelstrang eingebaut werden (Abbildung 6 C). Angeregt durch eine Wolfram – Halogen Lampe im 7500 Fast Real Time PCR Gerät beginnen sie zu fluoreszieren. Das von ihnen abgegebene Licht kann von der optischen Detektionseinheit des Gerätes erfasst und der Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität einer Probe ist zur Konzentration des neu gebildeten PCR – Produktes direkt proportional. Mit Hilfe der 7500 Fast System SDS 1.3.1 Software (Applied Biosystems) wird dem Fluoreszenzsignal jeder Probe ein bestimmter CT – Wert („Crossing Threshold“) zugeordnet, der sich aus der Anzahl der PCR – Zyklen einer PCR Reaktion ergibt.

### 2.2.3.3 Der CT – Wert

Der CT – Wert („Crossing Threshold“) dient der Bestimmung der Konzentration eines PCR – Produktes in einer Probe und wird aus den Fluoreszenzwerten der PCR – Produkte bestimmt. Er repräsentiert einen bestimmten PCR – Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal einer Probe über das Hintergrundsignal ansteigt und zur Ausgangskonzentration der Probe proportional ist. Der CT – Wert wird in der exponentiellen Phase der PCR – Amplifikation gemessen, in der eine Quantifizierung der PCR – Reaktionen aller Proben unter ähnlichen Bedingungen möglich ist.

### 2.2.3.4 PCR – Effizienz

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

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

$E = 2$  (theoretisch)

$E \neq 2$  (experimentell)

$N_n$  = Nukleinsäure Endkonzentration

$N_0$  = Nukleinsäure Anfangskonzentration

$E^n$  = PCR-Effizienz nach n Zyklen

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

Einfluss auf die PCR – Effizienz haben unterschiedliche Faktoren wie die Ausgangskonzentration der Matrize, die Qualität der Nukleinsäure, die Dauer einer PCR – Reaktion, die Effizienz der Polymerase, die Nukleotid- und die  $MgCl_2$  Konzentration, die Primersequenz und die Primerlänge, die Endkonzentration des PCR – Produktes sowie mögliche Pipettierfehler.

Die PCR – Effizienz wurde mit der Software „LinRegPCR“ (Ramakers et al. 2003) für jede PCR – Reaktion bestimmt.

#### **2.2.3.5 Relative Quantifizierung von Genen**

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten „House Keeping Gene“ (HKG) normalisiert. 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 bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkriptase innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. GAPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon Untereinheiten und  $\beta$  – Aktin sind wohl die häufigsten verwendeten HKGs, die zur Normalisierung herangezogen werden. 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 ( $\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$ ). Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta CT$  Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta CT$  Wert einer Kontrolle abgezogen ( $\Delta\Delta CT$ ); 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):

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

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

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

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 natürlich nicht der Praxis entspricht. Die „wahre Real Time PCR – Effizienz“ dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 bewegen und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf. 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).

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

Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens im Nenner zusammen. Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert und sowohl in der Behandlung als auch in der Kontrolle sind die CT – Werte identisch, d.h. die CT – Werte heben sich in der Berechnungsformel auf. Der Nenner wird

gleich eins, das Referenzgen fällt heraus und das berechnete Verhältnis ist nur von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig.

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

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

### 2.2.3.6 Berechnungssoftware "REST"

Hat man nun, wie üblich in einem wissenschaftlichen Experiment, mehrere zu testende Proben oder Wiederholungen, die behandelt sind und weitere die als Kontrolle dienen, so kommt 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, die Expressionsunterschiede von zwei unterschiedlich großen Gruppen berechnet und auch statistisch auswerten kann. 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 Signifikanzlevels ausgegeben. Die Statistik basiert auf einem sehr robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem beliebig viele tausend Randomisierungen und Wiederholungen durchgeführt werden können (Pfaffl et al. 2002).

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

#### 2.2.4 Sequenzierung

Die DNA – Sequenzierung ist die Bestimmung der DNA – Sequenz, d.h. der Nukleotid – Abfolge in einem DNA – Molekül. Als Sequenzierreaktion kommt heutzutage eine wiederholte Synthese vom gleichen Startpunkt aus zum Einsatz. Anders als bei der PCR wird nur ein Oligonukleotid eingesetzt, so dass die DNA nur linear synthetisiert wird. Seit Anfang der neunziger Jahre werden vor allem mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleosidtriphosphate eingesetzt. Jedes der vier ddNTPs wird mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Diese Modifikation erlaubt es, alle vier ddNTPs in einem Reaktionsgefäß zuzugeben, eine Aufspaltung in getrennte Ansätze und der Umgang mit Radioisotopen entfällt. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA – Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Das Chromatogramm (die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen) gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA - Stranges wieder. Mit dieser Methode können DNA – Fragmente von bis zu 1000 bp (Basenpaare) Länge sequenziert werden.

##### 2.2.4.1 Direktsequenzierung

Für alle interessanten Gene wurde zunächst *in silico* der mögliche Promotorbereich mit VektorNTI (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt. Für diese möglichen Promotorbereiche wurden je zwei Oligonukleotide entwickelt, mit denen ein ca. 1000 bp großes DNA – Fragment mittels PCR amplifiziert werden konnte. Dieses DNA – Fragment wurde anschließend von der Firma GATC (Koblenz) direkt sequenziert.

##### 2.2.4.2 Sequenzierung nach Klonierung

Die Promotorbereiche, die nicht erfolgreich direkt sequenziert werden konnten, was auf deutlich ausgeprägte Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen hindeutet, wurden kloniert. Hierfür wurde das Klonierungskit „TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Klone, die das gewünschte DNA – Fragment im Vektor inseriert enthielten, wurden anschließend von GATC (Koblenz) sequenziert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Darstellung der Ergebnisse

##### 3.1.1 Ausgewählte Klone für die Genexpressionsanalyse

Wie bereits in Kapitel 2.1.1.2 erwähnt, wurden wöchentlich an vier ausgewählten Einzelstöcken der beiden `Spätburgunder`-Klone 18 Gm und 1-84 Gm Photos von Elske Schönhals Geisenheim aufgenommen, um die phänotypische Entwicklung zu dokumentieren. Nachfolgend sind beispielhaft einiger dieser Photos dargestellt, welche die phänotypischen Unterschiede der beiden Klone verdeutlichen.

##### 3.1.1.1 Klon 18 Gm

Der Klon 18 Gm ist ein kompakter, traditioneller `Spätburgunder`-Klon. Der Klon hat einen sehr dichten Traubenaufbau, so das durch Abschnürungen und Quetschungen der Früchte untereinander die berühmten „Botrytisnester“ innerhalb der Traube entstehen können. Andererseits wird diesem Klon, neben einigen anderen, das klassische Spätburgunderaroma zugesprochen.



**Abbildung 7:** Entwicklungsstadien bei 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

In Abbildung 7 ist die phänotypische Entwicklung an Hand 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 ab Entwicklungsstadium 79 schon zu ausgeprägten Quetschungen der einzelnen Beeren, wodurch die Gefahr des Botrytisbefalls steigt. Außerdem litten die meisten Trauben der Parzelle an Sonnenbrand.

### 3.1.1.2 Klon 1–84 Gm

Der Klon 1-84 Gm ist im Gegensatz zu 18 Gm ein lockerbeeriger Typ. Der Traubengerüstaufbau ist sehr locker im Vergleich mit dem des Klons 18 Gm. Deutlich länger sind auch die Beerenstielchen des Klons 1–84 Gm. Die Qualität des Weines, bzw. die Aromausprägung, ist bei Klon 1–84 vergleichbar dem Klon 18 Gm.



**Abbildung 8:** Entwicklungsstadien bei 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

Analog zu Abbildung 7 ist in Abbildung 8 die phänotypische Entwicklung einer Traube von Klon 1–84 Gm beispielhaft dargestellt. Im Vergleich zum Klon 18 Gm ist 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 nahezu gleich. Auffällig ist die Länge der Beerenstielchen, welche sehr viel länger sind als beim Klon 18 Gm.

### 3.1.1.3 `Cardinal`

Die Tafeltraubensorte `Cardinal` wurde als extrem lockerbeerige Sorte als Referenz ausgewählt. Die Genexpression zum BBCH Stadium 65 soll mit der Genexpression der beiden `Spätburgunder`– Klone 18 Gm und 1–84 Gm verglichen werden. In Abbildung 9 ist die Tafeltraubensorte `Cardinal`, Standort Geilweilerhof, im Entwicklungsstadium BBCH 85 abgebildet. Im Gegensatz zu den beiden `Spätburgunder`– Klonen trat bei `Cardinal` eine starke Verrieselung auf, wodurch die Trauben sehr lockerbeerig sind. Außerdem fällt auf, dass die Rachis (Hauptachse des Fruchtstandes) bei `Cardinal` deutlich 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 lockerbeeriger ist, als bei den beiden `Spätburgunder`– Klonen 18 Gm und 1–84 Gm.



**Abbildung 9:** Entwicklungsstadium BBCH 85 bei `Cardinal`

### 3.1.2 RNA – Extraktion

Qualitativ hochwertige RNA aus der Weinrebe zu extrahieren ist schwierig, da die Rebe sehr reich an Phenolen und Polysacchariden ist. Mit käuflichen Kits von z. B. von Qiagen (Hilden) oder Invitex (Berlin) lässt sich zwar mittlerweile gut DNA aus Blättern von Weinreben extrahieren, die Kits für die RNA – Extraktion dieser und anderer Firmen funktionieren bei der Weinrebe jedoch nicht. Hinzu kommt, dass das verwendete Pflanzenmaterial, Gescheine bzw. Traubengerüste, relativ späte Entwicklungsstadien darstellt, und einen hohen Phenol- und Polysaccharidgehalt aufweist.

Aus diesem Grund wurde zunächst ein Protokoll von Chang et al. (1993) getestet, dass für die RNA Extraktion aus jungen Blättern aus Pflanzen mit hohem Phenol- und Polysaccharidgehalt etabliert war. Die RNA – Fällung erfolgt hierbei durch LiCl. In Tests konnte mit dieser Methode erfolgreich RNA aus jungen Gescheinen (BBCH 53) extrahiert werden, es war aber nicht möglich, RNA aus älteren Entwicklungsstadien zu extrahieren. Eine Modifikation des Protokolls von Chang ist bei Zeng et al. (2002) beschrieben. Durch zusätzliche Zentrifugationsschritte konnten Phenole und Polysaccharide vor der LiCl – Fällung eliminiert werden. LiCl ist sehr spezifisch für die Fällung von RNA, aber es wird auch ein geringer Teil an genomischer DNA präzipitiert.

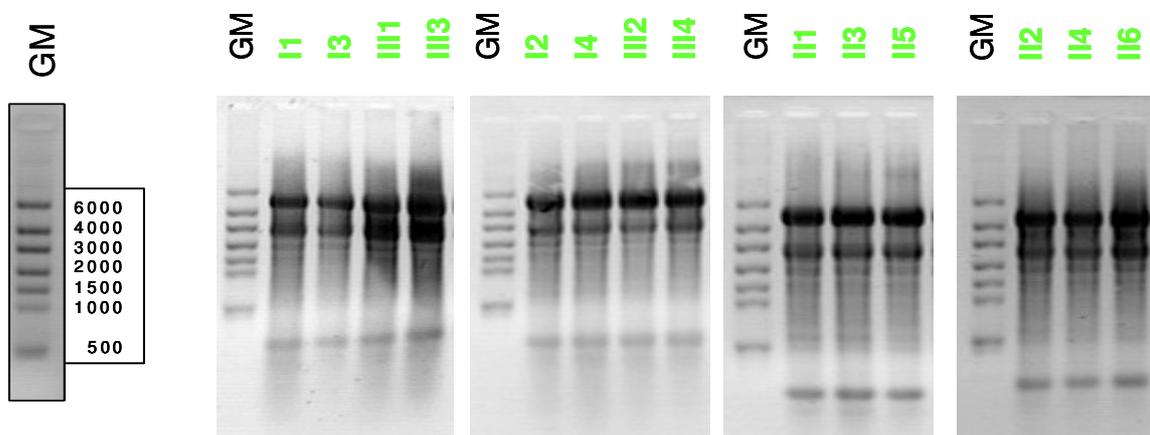
Aus diesem Grund wurde anschließend an die RNA – Präparation nach dem Protokoll von Zeng et al. (2004) ein DNase Behandlung angeschlossen. Diese wurde mit der RNase – freien DNase von Qiagen durchgeführt. Der Vorteil ist, dass direkt im Anschluss der DNase Behandlung ein Reinigungsschritt angeschlossen werden kann, um die RNA von möglichen Verunreinigungen reinigen zu können. Für diesen Reinigungsschritt wurde das Qiagen „MinElute Cleanup Kit“ verwendet. Mögliche Verunreinigungen könnten später Probleme bei der cDNA-Synthese, bei der Fluoreszenzmarkierung oder bei der Hybridisierung auf die Microarrays ergeben.

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

### 3.1.3 Microarray Analyse

#### 3.1.3.1 Proben für die Genexpressionsanalyse

Die RNA für Microarray Analysen wurden nach dem modifizierten Protokoll von Zeng et al. 2002 aus Gescheinsproben extrahiert (siehe Punkt 3.1.2). Das verwendete Pflanzenmaterial stammte von den beiden Geisenheimer 'Spätburgunder'- Klonen 18 Gm und 1-84 Gm und von der Tafeltraube 'Cardinal', vom Standort Siebeldingen. Insgesamt wurde RNA aus drei verschiedenen Entwicklungsstadien extrahiert. Zur genauen Definition dieser Entwicklungsstadien wurden die Proben zu definierten Stadien der BBCH Skala entnommen. Da es sehr wichtig für die nachfolgenden Schritte (wie z.B. cDNA – Synthese, Microarray Hybridisierung) ist, qualitativ hochwertige RNA ohne DNA Verunreinigung zu extrahieren, beinhaltet die Extraktionsmethode eine DNase Behandlung mit anschließender Aufreinigung mittels dem „MinElute Cleanup Kit“ von Qiagen. Anschließend wurden die RNA – Proben für eine visuelle Qualitätskontrolle auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Gelelektrophoresebilder extrahierter RNA aus Klon 18 Gm, 1-84 Gm und 'Cardinal' nach Zeng et al. (2002) mit zusätzlicher DNase Behandlung und anschließender Aufreinigung mit dem Qiagen „MinElute Cleanup Kit“; GM steht für den RNA – Größenmarker „RiboRuler High Range RNA Ladder“ (Fermentas, Leon-Rot); die römischen Zahlen stehen für den Probenahmezeitpunkt; 1 und 2 entsprechen Klon 18 Gm; 3 und 4 sind Klon 1-84 Gm und 5 und 6 enthalten RNA aus 'Cardinal'. Für alle Proben konnten deutlich die beiden Banden für die ribosomale RNA ( 28s und 18s) detektiert werden.

Bei der Messung der 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. In Tabelle

4 sind die Probanddaten dargestellt, die für das RZPD relevant waren, und zusammen mit den RNA – Proben nach Berlin geschickt wurden. Die Minimalmenge zur Array Hybridisierung waren 3 µg RNA gelöst in 10µl H<sub>2</sub>O.

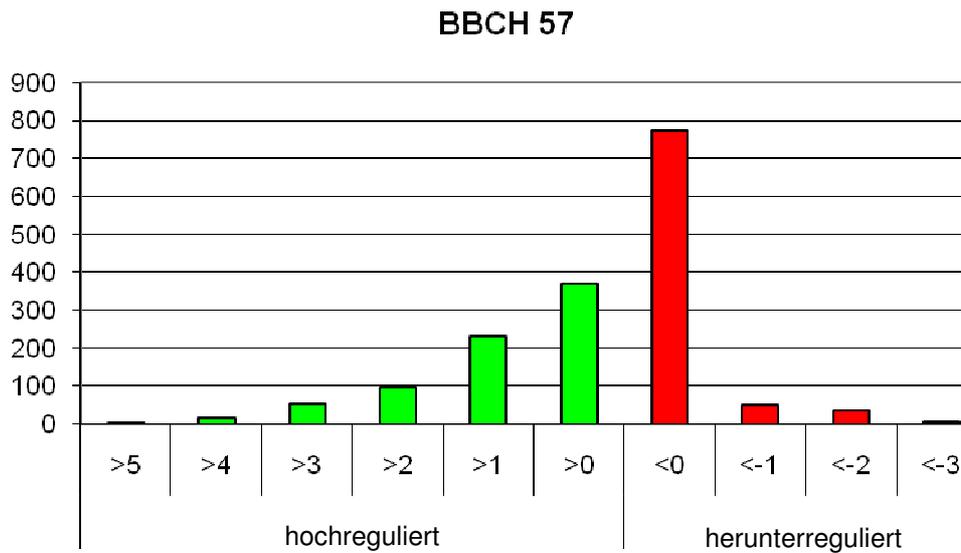
**Tabelle 4:** „Sample Submission Sheet“ für Affymetrix Service

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

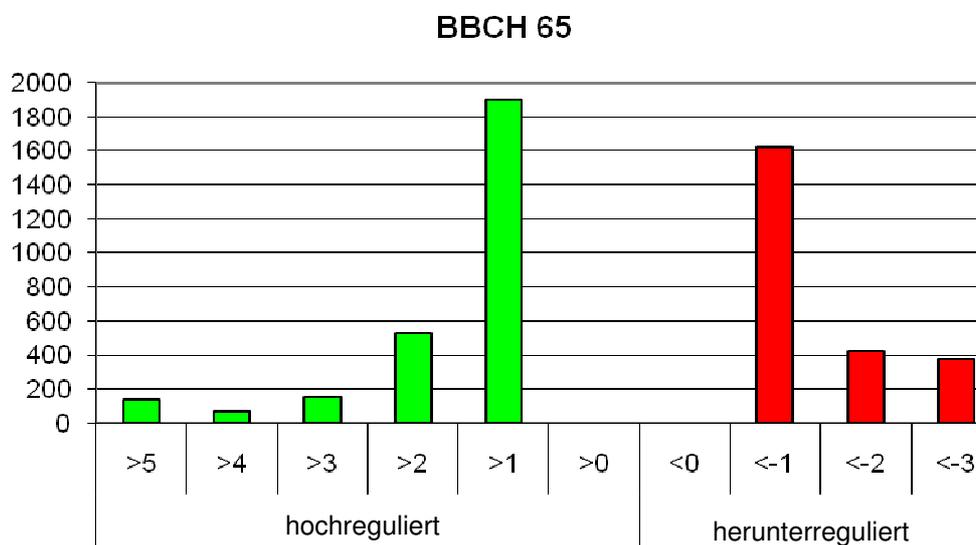
### 3.1.3.2 Genexpressionsergebnisse

#### 3.1.3.2.1 Gesamtanzahl differentiell exprimierter Gene

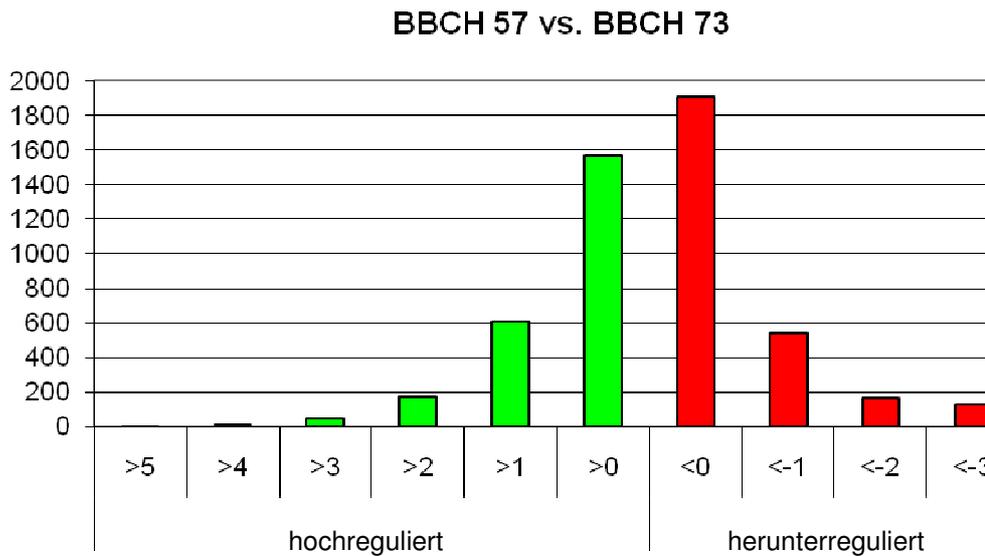
Für jede der vier durchgeführten Genexpressionsanalysen mittels Microarray Hybridisierung gibt es eine große Gesamtzahl an unterschiedlich stark hybridisierenden Genen. Um zu klären, ob jedes dieser Gene signifikant differentiell exprimiert war, wurde für das gesamte Experiment ein p – Wert festgelegt, der das Risiko angibt, mit der die Null – Hypothese verworfen wird, obwohl sie richtig ist. Die Null – Hypothese ( $H_0$ ) besagt, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der Expressionswerte zwischen den vergleichenden experimentellen Bedingungen gibt. Für die durchgeführten Genexpressionsanalysen wurde ein p – Wert von 0,05 festgelegt. Alle Gene, die einen p – Wert von 0,05 oder größer haben, wurden für die weiteren Untersuchungen nicht weiter verwendet. In den folgenden Abbildungen sind für jedes Einzelexperiment alle Gene dargestellt, deren p – Wert unter 0,05 lag.



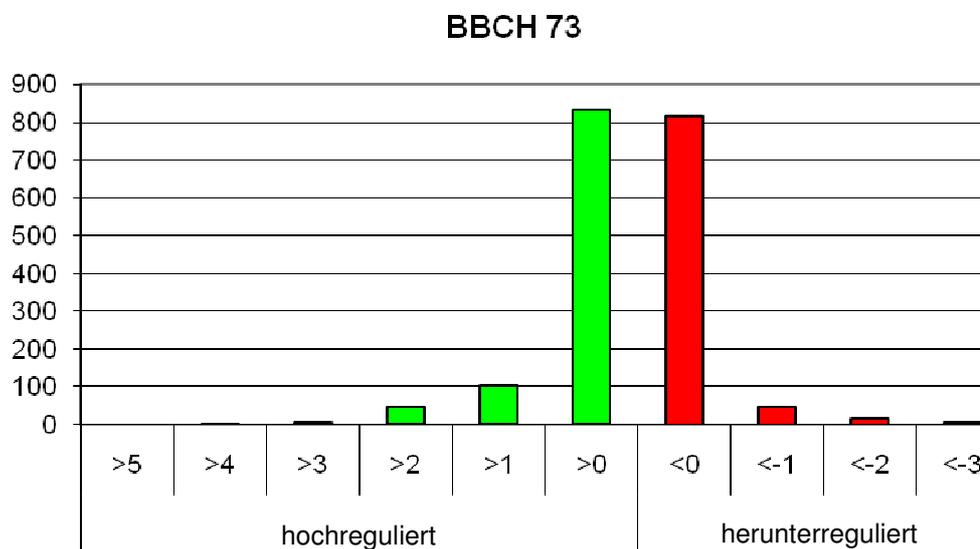
**Abbildung 11:** Darstellung aller Gene, die zum Entwicklungszeitpunkt BBCH 57 signifikant differentiell zwischen den beiden `Spätburgunder`- Klonen 1–84 Gm und 18 Gm exprimiert waren. Als Kontrolle wurde der kompakte Klon 18 Gm verwendet. Alle Gene wurden nach ihrem „fold change“ eingeteilt. Die grünen Säulen repräsentieren Gene, die im Klon 1–84 Gm hochreguliert waren, die roten Säulen die Gene, die im Klon 1–84 Gm herunterreguliert erschienen.



**Abbildung 12:** Darstellung aller Gene, die zum Entwicklungsstadium BBCH 65 signifikant differentiell zwischen beiden `Spätburgunder`- Klonen 1–84 Gm und 18 Gm und der Tafeltraube `Cardinal` exprimiert waren. Als Kontrolle wurden in diesem Experiment die beiden `Spätburgunder`- Klone verwendet. Alle Gene wurden nach ihrem „fold change“ eingeteilt. Die grünen Säulen repräsentieren Gene, die bei `Cardinal` hochreguliert waren, die roten Säulen die Gene, die bei `Cardinal` herunterreguliert erschienen.



**Abbildung 13:** Darstellung aller Gene, die zwischen den beiden Entwicklungszeitpunkten BBCH 57 und BBCH 73 signifikant differentiell exprimiert waren. Als Kontrolle wurde der kompakte Klon 18 Gm verwendet. Alle Gene wurden nach ihrem „fold change“ eingeteilt. Die grünen Säulen entsprechen Genen, die im Klon 1–84 Gm hochreguliert waren, die roten Säulen solchen, die im Klon 1–84 Gm herunterreguliert erschienen.



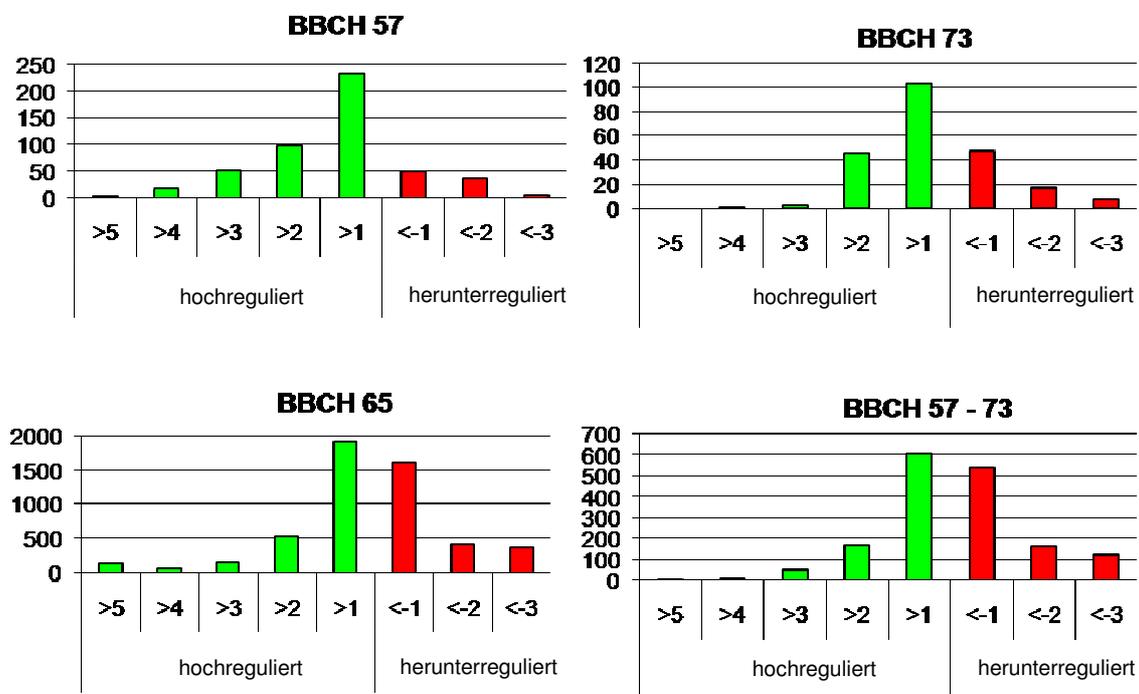
**Abbildung 14:** Darstellung aller Gene, die zum Entwicklungszeitpunkt BBCH 73 signifikant differentiell zwischen den beiden `Spätburgunder`-Klonen 1–84 Gm und 18 Gm exprimiert waren. Als Kontrolle wurde der kompakte Klon 18 Gm verwendet. Alle Gene wurden nach ihrem „fold change“ eingeteilt. Die grünen Säulen repräsentieren Gene, die im Klon 1–84 Gm hochreguliert waren, die roten Säulen die Gene, die im Klon 1–84 Gm herunterreguliert erschienen.

Im den beiden Telexperimenten der Expressionsstudien zu den Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 wurden die beiden `Spätburgunder`-Klone 18 Gm und 1-84 Gm auf differentiell exprimierte Gene hin untersucht. In beiden Experimenten wurde der kompakte Klon 18 Gm als Referenz definiert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten die differentielle Expression der einzelnen Gene beim lockerbeerigen Klon 1-84 Gm im Vergleich zum kompakten Klon 18 Gm. Zum Zeitpunkt BBCH 57 waren insgesamt 1638 Gene signifikant differentiell exprimiert. 774 Gene waren hochreguliert, 864 Gene herunterreguliert. Zum Zeitpunkt BBCH 73 waren insgesamt 1874 Gene signifikant differentiell exprimiert; 986 Gene waren hochreguliert, 888 Gene herunterreguliert. Die Gene lassen sich nach ihrem „fold change“ in verschiedene Regulationsklassen einteilen. Der „fold change“ gibt an, um wie vielfach ein Gen in seiner Regulierung in einer zu prüfenden Probe zu dem selben Gen in der Kontrolle im Vergleich abweicht. Dieser Wert kann sowohl negativ als auch positiv sein. Negativ bedeutet, dass dieses Gen in der Probe herunterreguliert ist, positiv bedeutet, dass dieses Gen in der Probe im Vergleich zu Kontrolle hochreguliert ist. Nach Einteilung in Regulationsklassen zeigte sich für die beiden Telexperimente BBCH 57 (siehe Abb. 11) und BBCH 73 (siehe Abb. 14) dass die differentiell exprimierten Gene einen relativ geringen „fold change“ aufwiesen. Im Telexperiment BBCH 65 wurden beide `Spätburgunder`-Klone 18 Gm und 1-84 Gm mit der Tafeltraube `Cardinal` verglichen. Die beiden `Spätburgunder`-Klone wurden in diesem Fall als Vergleichswert definiert. Insgesamt waren 5209 Gene signifikant differentiell exprimiert. 2789 Gene waren hochreguliert, 2420 Gene herunterreguliert. Im Vergleich zu den beiden Telexperimenten BBCH 57 und BBCH 73 waren viel mehr Gene differentiell exprimiert, und nach Einteilung in Regulationsklassen (siehe Abb. 12) wiesen diese einen durchschnittlich höheren „fold change“ auf. Eine Begründung hierfür ist sicherlich, dass sich der genetische Hintergrund der Tafeltraube `Cardinal` sehr von dem der `Spätburgunder`-Klone unterscheidet. Im letzten Telexperiment wurden die zwei Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 verglichen. Auch hier wurde der kompakte Klon 18 Gm als Kontrolle definiert. Insgesamt waren 5129 Gene signifikant differentiell exprimiert. 2400 Gene waren hochreguliert, 2724 Gene herunterreguliert. Nach Einteilung in die Regulationsklassen (siehe Abb. 13) wurde deutlich, dass die Anzahl an Genen differentiell exprimierter Gene ähnlich des Telexperiments BBCH 65 waren, der

„fold change“ aber eher ähnlich dem der Telexperimente BBCH 57 und BBCH 73 relativ gering war.

### 3.1.3.2.2 Bestimmung der „Top 100“ Gene pro Telexperiment

Da die Gesamtanzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene mit 13850 Genen für weitere Untersuchungen zu umfangreich war, wurden zunächst alle Gene, die einen geringeren „fold change“ als  $-1 < x < 1$  aufwiesen, von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. In den folgenden Abbildungen ist die Verteilung der signifikant differentiell exprimierten Gene nach „fold change“ – Klassen für jedes Telexperiment dargestellt.



**Abbildung 15:** Darstellung der Gene, die bei jedem Telexperiment eine höheren „fold change“ – Wert als  $-1 < x < 1$  bei einem p – Wert von 0,05 aufwiesen.

In den beiden Telexperimenten BBCH 57 und BBCH 73, in denen die beiden ‘Spätburgunder’– Klone 18 Gm und 1–84 Gm auf differentiell exprimierte Gene hin untersucht wurden, waren zum Zeitpunkt BBCH 57 insgesamt 498 Gene signifikant differentiell exprimiert, zum Zeitpunkt BBCH 73 insgesamt 225. Von den 498 Genen zum Zeitpunkt BBCH 57 waren 406 Gene hochreguliert, 92 Gene herunterreguliert. Von den 225 Genen zum Zeitpunkt BBCH 73 waren 154 Gene

hochreguliert, 71 Gene herunterreguliert. Im Telexperiment BBCH 65, bei dem beide 'Spätburgunder'-Klone 18 Gm und 1-84 Gm mit der Tafeltraube 'Cardinal' verglichen wurden, änderte sich an der Anzahl der Gene nichts, da diese einen höheren „fold change“ – Wert als  $-1 < x < 1$  aufwiesen. Im vierten Teilprojekt, dem Vergleich der beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 waren insgesamt 1658 Gene signifikant differentiell exprimiert, 835 Gene waren hochreguliert, 823 Gene herunterreguliert (siehe Abbildung 15).

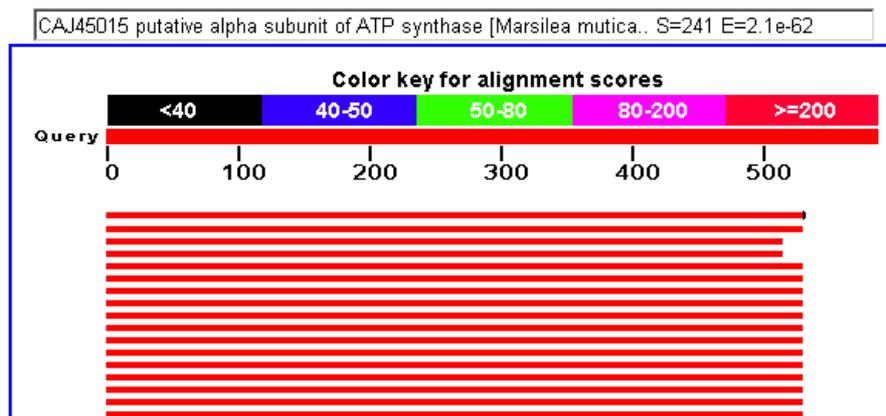
Für jedes Telexperiment wurden die „Top 100“ differentiell exprimierten Gene bestimmt. Maßgeblich für die Auswahl waren jeweils der p – Wert und der „fold change“ – Wert. Insgesamt sind bei den „Top 400“ Genen aller vier Telexperimente 380 verschiedene Gene detektiert worden. 20 Gene waren bei mehreren Entwicklungszeitpunkten differentiell exprimiert zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen. Die folgende Auflistung zeigt die Verteilung der differentiell exprimierten Gene auf die Zeitpunkte an:

<b>1 Gen</b>	bei 3 Zeitpunkten (BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 57 – BBCH 73)
<b>1 Gen</b>	bei 2 Zeitpunkten (BBCH 57 und BBCH 65)
<b>3 Gene</b>	bei 2 Zeitpunkten (BBCH 57 und BBCH 57 – BBCH 73)
<b>1 Gen</b>	bei 2 Zeitpunkten (BBCH 65 und BBCH 73)
<b>11 Gene</b>	bei 2 Zeitpunkten (BBCH 64 und BBCH 57 – BBCH 73)
<b>3 Gen</b>	bei 2 Zeitpunkten (BBCH 73 und BBCH 57 – BBCH 73)
<b>96 Gene</b>	bei 1 Zeitpunkt (BBCH 57)
<b>86 Gene</b>	bei 1 Zeitpunkt (BBCH65)
<b>96 Gene</b>	bei 1 Zeitpunkt (BBCH73)
<b>82 Gene</b>	bei 1 Zeitpunkt (BBCH 57 – BBCH 73)

### 3.1.3.2.3 Einteilung nach molekularer Funktion

Um potentielle Kandidatengene für das Merkmal "Lockerbeerigkeit" zu finden, mussten die differentiell exprimierten Gene zunächst nach ihrer molekularen Funktion gruppiert werden. Hierzu wurde die Sequenz, aus denen die Oligos, die auf dem GeneChip® gespottet sind, in den NCBI Datenbanken UNIGene und GenBank gesucht werden. Mit dieser Sequenz wurde anschließend ein Vergleich mit dem Blast X Algorithmus durchgeführt, das heißt, die Sequenz wurde mit allen, in den Datenbanken vorhandenen Sequenzen verglichen.

### Distribution of 101 Blast Hits on the Query Sequence



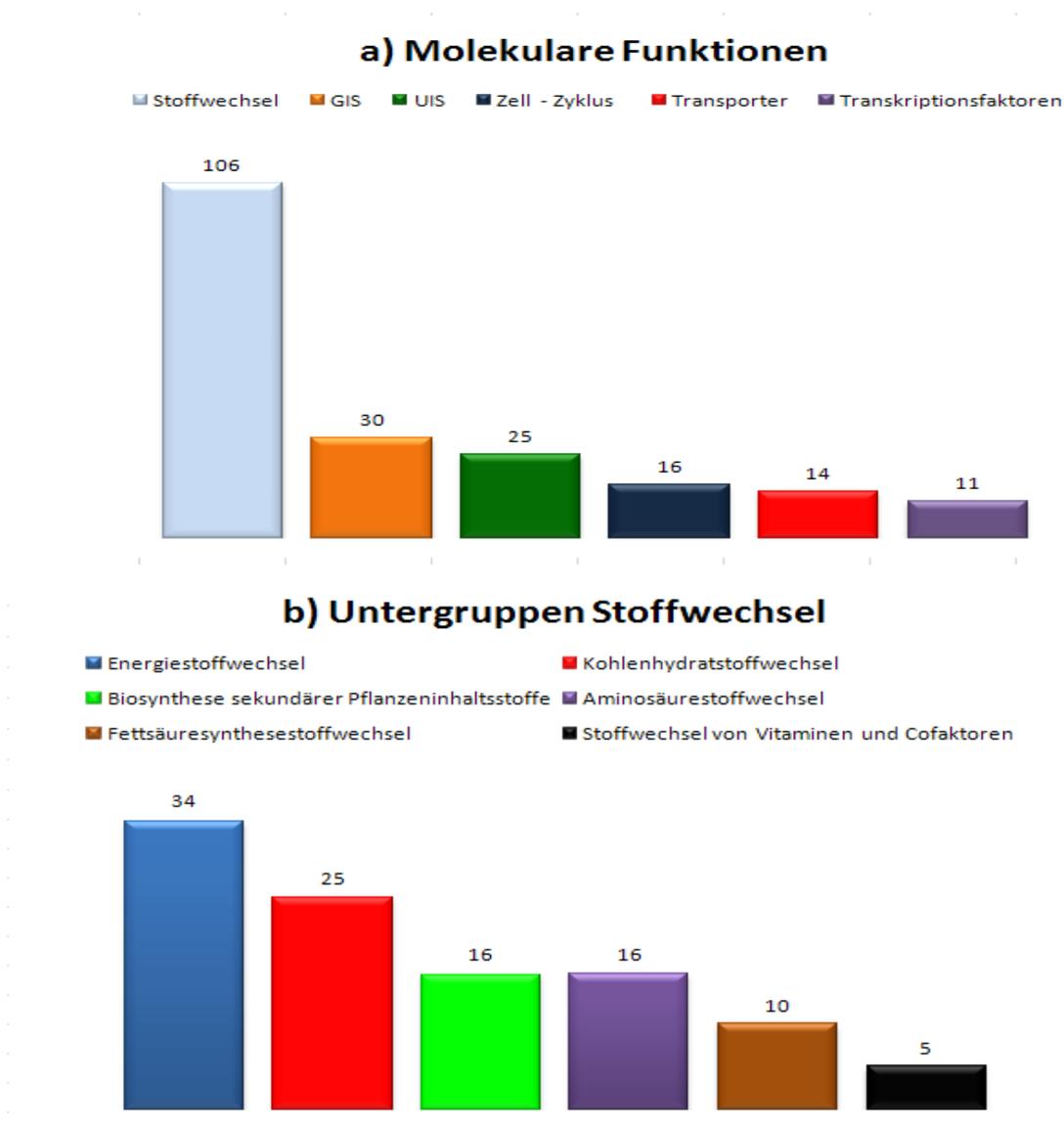
**Abbildung 16:** Blast X Ergebnis für das Gen, das zu drei Zeitpunkten differentiell exprimiert ist.

In Abbildung 16 ist das Ergebnis der Blast X Analyse für das Gen, welches zu drei Zeitpunkten differentiell exprimiert war, abgebildet. Anschließend wurde die Sequenz gesucht, die die größte Homologie zu der zu prüfenden Sequenz besitzt. Hierbei ist besonders auf den 'Expect' – Wert (E – Wert) zu achten. Je näher dieser Wert auf Null zugeht, desto wahrscheinlicher entspricht die gefundene Sequenz mit der zu überprüfenden Sequenz. Weitere wichtige Werte sind der Wert der Übereinstimmungen (Positives) und der Wert der Lücken (Gaps). Der Prozentsatz der „Positives“ sollte möglichst hoch sein, und der Prozentsatz der „Gaps“ möglichst gering. Sinnvoll ist sicher auch, zu schauen, von welcher Pflanzenspezies die homologe Sequenz stammt.

Insgesamt konnten die 202 Gene nach dem Blast X Abgleich in sechs molekulare Funktionsgruppen eingeordnet werden:

- Stoffwechsel
- Transkriptionsfaktoren
- Transporter
- Zell – Zyklus regulierende Gene
- Umwelt Informations – Signaltransduktion (UIS)
- Genetische Informations – Signaltransduktion (GIS)

178 Gene konnten keiner molekularen Funktionsgruppe zugeordnet werden. Ihre molekulare Funktion ist noch nicht bekannt. Diese Gene kann man in unbekannte Gene und Gene, die hypothetisch ein Protein kodieren, unterteilen.



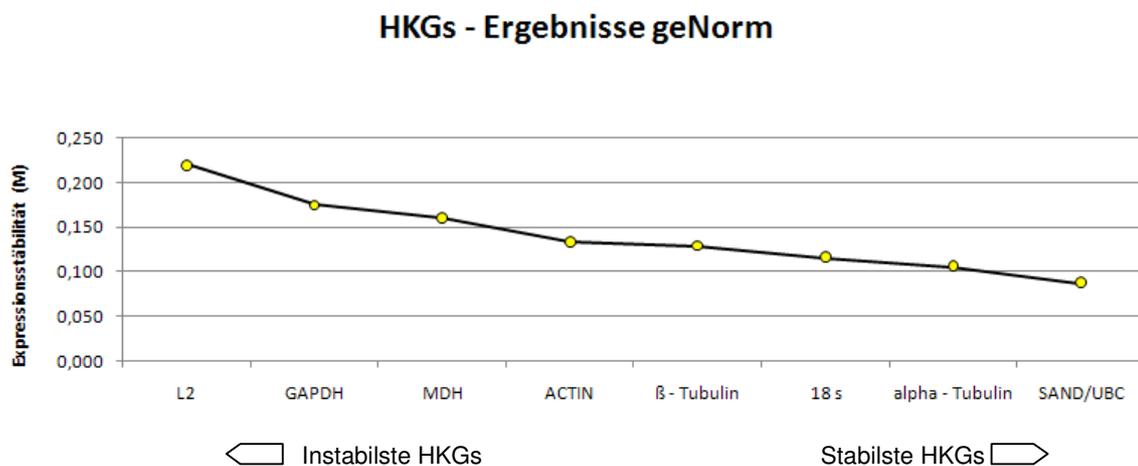
**Abbildung 17a + b:** Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene nach molekularer Funktion

Innerhalb des Stoffwechsels lässt sich noch eine genauere Einteilung vornehmen (Abbildung 17b). Innerhalb dieser Gruppe wurden Homologien mit Genen aus dem Energiestoffwechsel, dem Kohlenhydratstoffwechsel, der Biosynthese sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, des Fettsäuresynthesestoffwechsels, dem Stoffwechsel von Vitaminen und Cofaktoren und dem Aminosäurestoffwechsel gefunden. Eine detaillierte Darstellung der Resultate in dieser Einteilung ist in Abbildung 17a zu sehen.

### 3.1.4 Real Time PCR

#### 3.1.4.1 Auswahl der „Housekeeping Genes“

Ein wichtiger Punkt für eine aussagekräftige Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real Time PCR ist die Wahl geeigneter „Housekeeping Genes“ (HKG) (Referenzgene, die stabil in ihrer Expression sind). Diese spielen in der Auswertung eine große Rolle zur Normalisierung und sollten aus diesem Grund möglichst keinen Schwankungen in der Expression unterliegen. Ziel eines Experimentes war es daher, die stabilsten HKG für die beiden `Spätburgunder`-Klone 18 Gm und 1-84 Gm zu finden. Es wurde mit neun Genen eine quantitative Real Time PCR durchgeführt. Anhand der Resultate lässt sich die PCR – Effizienz mit „LinRegPCR“ für jedes Gen errechnen. Mit der PCR – Effizienz und den CT – Werten („Crossing Threshold“), die den Zyklus 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. Hierbei wird schrittweise immer das am wenigsten stabil exprimierte HKG ausgeschlossen.



**Abbildung 18:** Ergebnisse der geNorm Auswertung: Sand, UBC und Alpha – Tubulin sind die drei stabilsten „Housekeeping Genes“ (HKGs) für die beiden `Spätburgunder`-Klone 18 Gm und 1-84 Gm.

Dies erfolgt an Hand des Expressionsstabilitätsmaßes (siehe Abb. 18). Je höher dieser Wert, desto unstabiler ist das Gen in seiner Expression, je niedriger desto stabiler. Für die weiteren quantitativen Real Time PCR Experimente wichtig war, möglichst stabil exprimierte HKGs zur Normalisierung einzusetzen. Deshalb

wurden nach Auswertung der HKG – Ergebnisse die drei Gene SAND, Ubiquitin und alpha – Tubulin, die am stabilsten in den beiden Spätburgunder´– Klone 18 Gm und 1–84 Gm exprimiert waren, als HKGs ausgewählt.

### **3.1.4.2 Auswahl der Kandidatengene für Lockerbeerigkeit**

Die Auswahl an Kandidatengenen für die Real Time Experimente wurde zum einen aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen und zum anderen wurden Gene aus Literaturstudien ausgewählt, die in anderen Pflanzen (z.B. Arabidopsis), bekanntermaßen Merkmalen ähnlich der Lockerbeerigkeit, steuern, getroffen.

#### **Kandidatengene aus der Microarray Analyse**

Aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen wurden Gene, deren kodierendes Proteine als Transkriptionsfaktoren agieren, als Kandidatengene ausgewählt. Die andere Gruppe, aus der Kandidatengene für die quantitative Real Time PCR ausgewählt wurden, ist die Gruppe der Gene, die Proteine mit unbekannter molekularer Funktion kodieren. Hier wurden die Gene ausgewählt, die einen sehr großen Unterschied in ihrer Expressionsrate zwischen den beiden `Spätburgunder´– Klonen ausweisen. Insgesamt wurden 20 Gene aus dem Microarray Experiment als Kandidatengene für das Real Time PCR Experiment ausgewählt. In Tabelle 5 sind die für die qRT PCR verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

#### **Kandidatengene aus dem Wissen aus anderen Pflanzen**

Der zweite Weg, geeignete Kandidatengene für das Merkmal Lockerbeerigkeit zu finden, war die Suche nach Genen von anderen Pflanzen (z.B. Arabidopsis, Tomate, Mais), die in ihrer Funktion bekanntermaßen Merkmale, die ähnlich der Lockerbeerigkeit bei der Weintraube sind, beeinflussen. Hierzu wurde in relevanter Literatur nach möglichen Kandidatengenen gesucht. Anschließend wurde die Sequenz der identifizierten Kandidatengene mit den 57662 Contigs der französisch-italienischen *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 einen weitgehend homozygoten `Spätburgunder´– Klon (PN40024) handelt. Konnten Homologien in der *Vitis*

Sequenz festgestellt werden, wurden Oligonukleotide für die qRT PCR entwickelt. Insgesamt konnten 15 interessante Gene gefunden werden (Tabelle 6).

**Tabelle 5:** Liste der Oligonukleotide für die Kandidatengene, die aus den Ergebnissen der Microarray Analyse ausgewählt wurden. Lila markiert in der Tabelle sind die Gene, die als Transkriptionsfaktor annotiert sind, rot sind die Gene, deren molekulare Funktion unbekannt ist.

Primer Name	5' - 3'	Länge (bp)	Amplifikat (bp)
PKSF1 for	GCCTTCCTGCCAATTAGGTTTT	22	67
PKSF1 rev	AGCCTAGCTTCTTGGACTTCAATC	24	
WRKY1 for	CTCGATCTGATGCGAATGCA	20	65
WRKY1 rev	CGCCTATCAAAGACGAAGGA	21	
RHG1 for	CAAAATCGGGTGCTTCATGTT	21	62
RHG1 rev	GGCACAGGCCTGAGAGAAGAT	21	
TCP2 for	GAGGCAACAGAGACGGAGAAT	21	59
TCP2 rev	CGGCCTTGCTGGTTTCAA	18	
ZIB1 for	CAAGGGCTCAGCAGCCTTT	19	59
ZIB1 rev	CTCACCACAGCCGACATTCTAC	22	
bZiP for	GGCTTGAGATCAAACGAAGGAT	22	59
bZiP rev	AGCCTCCAACGCATTGTTCT	20	
CB002795 for	GGAAGCAGAAGGCTCAAAGAAG	22	67
CB002795 rev	GGCCCTAATGATGGCATTTC	21	
CB341658 for	GTGATTCCACAAGACCCCAA	21	68
CB341658 rev	GGAGATGACCCACGATGTGAA	21	
CB341760 for	TGAGGGCAAATGTGGTGTAGAA	22	67
CB341760 rev	TGGAATTGGAGTCTGGATTGAA	22	
CD009416 for	GAGTCTTTGTGCGAGCCGTAT	21	58
CD009416 rev	CGAACCCCTCGTTACC	18	
CD721663 for	CAACCCGACATCCTTGAATA	21	63
CD721663 rev	CAACCCGCTACTCCCCTAT	20	
CF202148 for	CCCACAGCTTCGGCAGAT	18	63
CF202148 rev	CTCACTGATCGAGCGCTCTTG	21	
CF203567 for	CTCCGTTGTCGCTGAATGAG	20	63
CF203567 rev	GGGCTTTTCCGATTTGCTAGA	21	
CF203581 for	CAAGCTAAACCCAAAAGATTCCC	23	80
CF203581 rev	CGCAAACGGACTCCAAAAT	20	
CF204825 for	GTTTTCGGCATCACAATGCA	20	68
CF204825 rev	TCCTAGGGAAAGCGTGGTTTT	21	
CF214472 for	GCCTCCAATTGCCATAAATGAA	22	77
CF214472 rev	GACCGCATACCTCATATTTGCA	22	
CF512412 for	TCCAGGGAGTGAATGGAACCTA	22	68
CF512412 rev	TCTCCGCTCCGAAATTGACT	20	
CF512494 for	CACGTAGGTTTTGTTTTGCATCTTG	24	82
CF512494 rev	TGGCAAACCATGGCTAGTGTA	22	
CF512751 for	CACTTCCCCACTGACTCAATCA	22	66
CF512751 rev	TGCTTGCCACTCCGAAGTTAA	21	
CF513596 for	CTTTGGCTCGGCTTTTCTGA	18	60
CF513596 rev	AAGGCCAAGGCAATCATTGA	20	

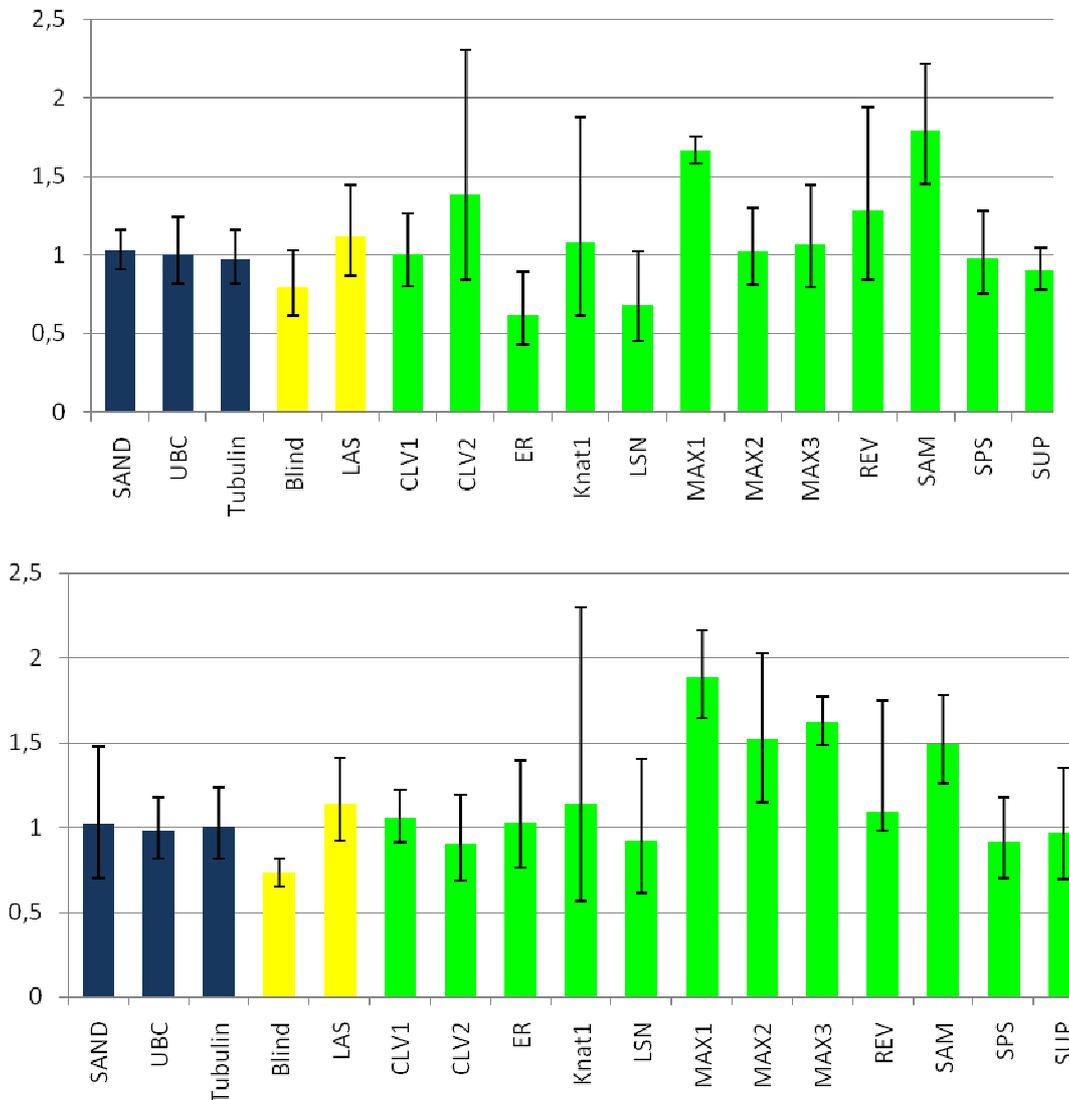
**Tabelle 6:** Liste der Oligonukleotide für die Kandidatengene, die aus der Literatur ausgewählt wurden, da sie bei anderen Pflanzen Merkmale ähnlich der Lockerbeerigkeit beeinflussen. Gelb sind Kandidatengene aus der Tomate und grün Kandidatengene von Arabidopsis.

Primer Name	5' - 3'	Länge (bp)	Amplifikat (bp)
BLIND for	GCCCATGGTCACCTGAAGA	19	65
BLIND rev	TCCCCAGTCCCATATTCTC	21	
LAS for	TATGAGGCCTGCCCTACCT	20	59
LAS rev	CTCGAGGATGGCTTGATTGG	20	
CLV1 for	CACCATGAGAGAGGTGGTTTAC	22	63
CLV1 rev	GATGAGGCTTGGAGCATTCTG	21	
CLV2 for	CCTGCCAGGATTGGTAATTTG	21	61
CLV2 rev	GAAAGCGAGTTGTGGGAAAGA	21	
ER for	CGTCTCACGGAAAAGTCTGATG	22	66
ER rev	CCTTCCAGTCAGCAGCTCAAG	21	
KNAT1 for	GAAGTGCAGGGGTGTTGGTT	20	76
KNAT1 rev	GATCAATCTCAGGAAGTTCAGTTTCC	26	
PYN for	TGCACAGCTCAGGATTTCTTGA	22	67
PYN rev	GCTCAGGAAGTCCCCTTTGG	20	
MAX1 for	GTCAAACCGGGACACTTGCT	20	67
MAX1 rev	CACTGCGGAGATATGGAAGCT	21	
MAX2 for	GCCATTTGGGCTGAGTTCTC	20	65
MAX2 rev	CCACAATCCAACCTTCATCTTTGAC	24	
MAX3 for	TGTCGTATGTGCACGATGAGAA	22	63
MAX3 rev	AGTCTTGGCATCCATCACCAA	21	
REV for	GTGAGGCTCTGGAACGAGT	20	60
REV rev	GCTGCCGCCGAAGAGAA	17	
STM for	GGCCTGGATCAGAAGCAAATAA	22	60
STM rev	GCTTCCAGTGCCGCTTCCTT	20	
SPS for	CCAAAACCTCCCCTACCTGGAA	21	63
SPS rev	GTGGCACTGATGGGTGCTT	19	
SUP for	CATGGCCTCCAAGATCTTATACATG	25	63
SUP rev	AGAGCTTGGGCAGATCTGAATT	22	

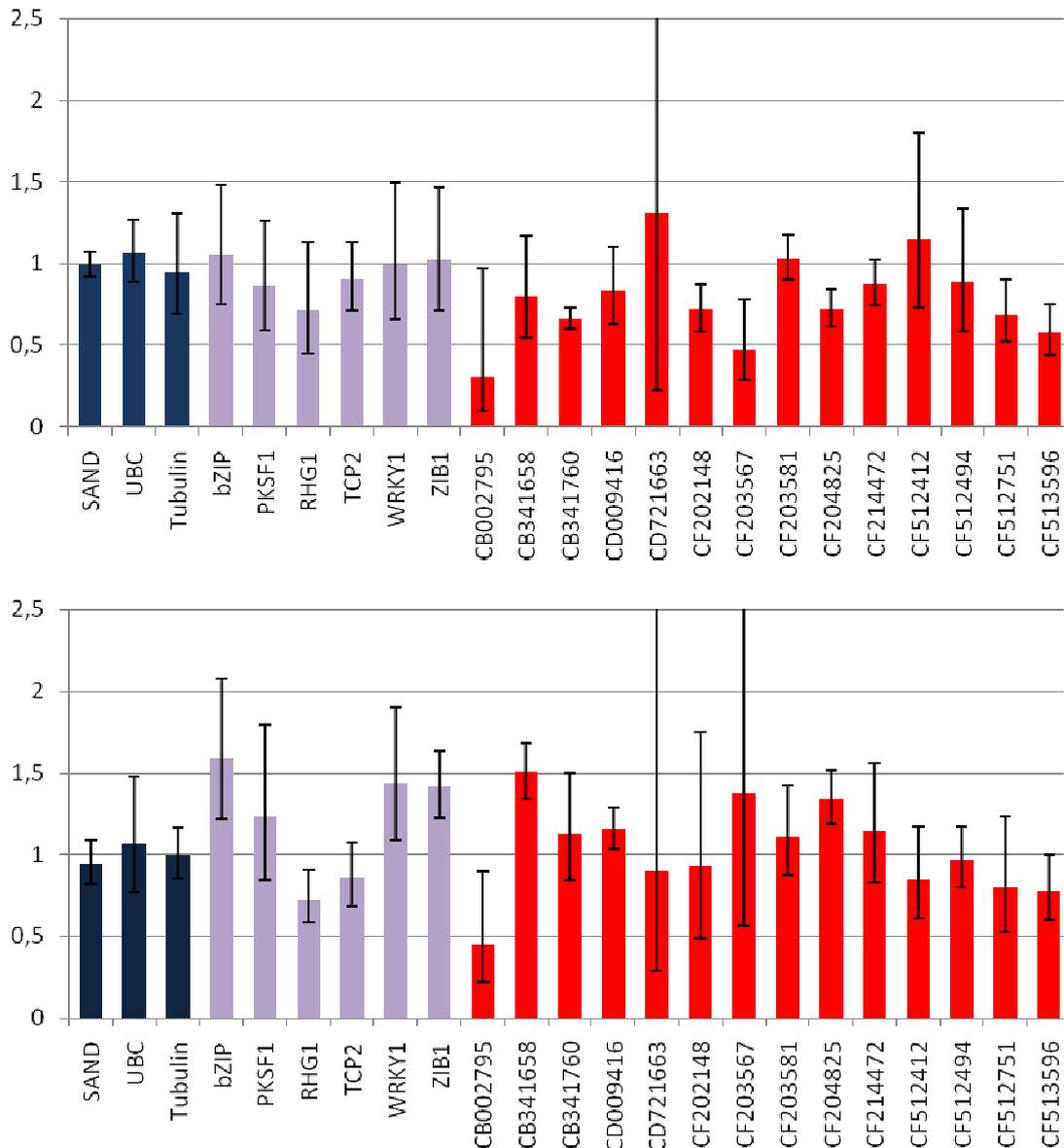
### 3.1.4.3 Real Time PCR Experiment – Test der Kandidatengene

Mit den insgesamt 35 Kandidatengenen wurden eine quantitative Real Time PCR durchgeführt, um mögliche Expressionsunterschiede zwischen den beiden 'Spätburgunder'- Klonen detektieren zu können. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden die drei HKGs für SAND, UBC und alpha – 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 Genexpressionen 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 19:** Real Time PCR Ergebnisse für die Kandidatengene aus der Literatur. Als Kontrolle wurde der kompakte Klon 18 Gm definiert, als zu testende Probe der lockerbeerige Klon 1–84 Gm. In der oberen Hälfte sind die Ergebnisse für das Entwicklungsstadium BBCH 57 abgebildet, unten die Ergebnisse für das Entwicklungsstadium BBCH 73. Ein Expressionswert von 1 bedeutet keine differentielle Expression, Werte >1 weisen auf eine erhöhte Transkription hin und Werte <1 auf eine reduzierte Transkription. Die blauen Säulen stehen für die drei HKGs für SAND, UBC und alpha – Tubulin. Die gelben Säulen entsprechen Kandidatengenen, die aus Tomate abgeleitet wurden, die grünen Säulen denjenigen aus Arabidopsis.



**Abbildung 20:** Real Time PCR Ergebnisse für die Kandidatengene der Microarray Hybridisierung. Als Kontrolle wurde der kompakte Klon 18 Gm definiert, als zu testende Probe der lockerbeerige Klon 1–84 Gm. In der oberen Hälfte sind die Ergebnisse für das Entwicklungsstadium BBCH 57 abgebildet, unten die Ergebnisse für das Entwicklungsstadium BBCH 73. Die blauen Säulen stehen wieder für die drei HKGs für SAND, UBC und alpha – Tubulin. Die lila Säulen sind Kandidatengene, deren Proteine als Transkriptionsfaktoren wirken und die roten Säulen stehen für Kandidatengene, deren Protein in ihrer molekulare Funktion unbekannt sind.

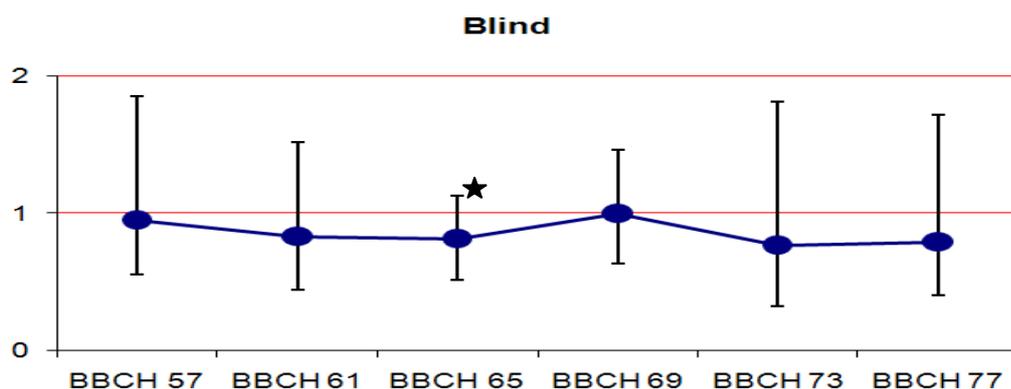
In Abbildung 19 sind die Ergebnisse für die Kandidatengene aus der Literatur dargestellt. Als Kontrolle wurde der kompakte 'Spätburgunder'– Klon 18 Gm verwendet. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse für die 20 Kandidatengene, die aus den Microarray Analyse Ergebnisse ausgewählt wurden zusammengefasst.

Insgesamt konnten bei sieben von 14 Kandidatengenen aus der Information von anderen Pflanzen Expressionsunterschiede zwischen den beiden `Spätburgunder`-Klonen detektiert werden. Sechs Gene waren signifikant im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm hochreguliert, ein Gen erschien herunterreguliert. Von den 20 Kandidatengenen aus der Microarray Hybridisierung konnten bei 12 Genen die Ergebnisse mit qRT PCR bestätigt werden. Diese waren in den beiden Klonen signifikant unterschiedlich exprimiert.

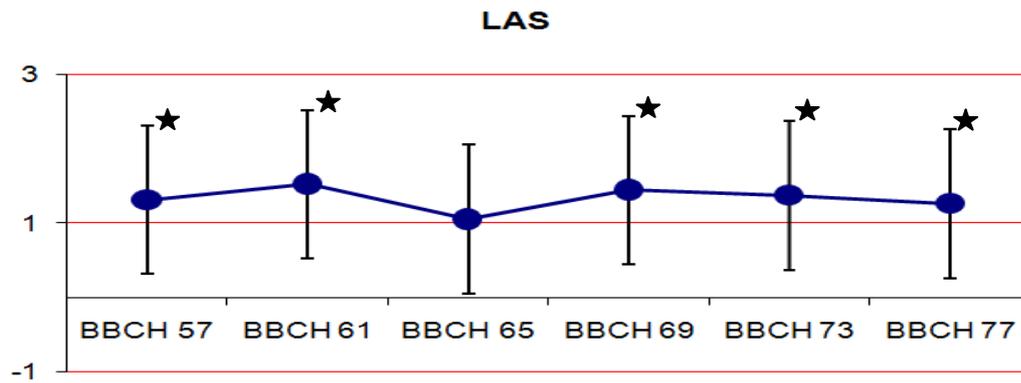
#### 3.1.4.4 Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2006

Um detailliertere Einblicke in die Expressionsmuster der einzelnen Kandidatengene zu erlangen, wurde für jedes der 34 ausgewählten Kandidatengene eine Kinetik der Genaktivität über die Vegetationsperiode 2006 erstellt. Hierfür wurde mit dem Pflanzenmaterial der beiden `Spätburgunder`-Klone 18 Gm und 1–84 Gm von den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 61, BBCH 65, BBCH 69, BBCH 73 und BBCH 77 eine quantitative Real Time PCR durchgeführt. Im Experiment wurden wiederum drei biologische und zwei technische Wiederholungen durchgeführt. Als Signifikanz – Schwelle wurde  $t = 0,05$  verwendet. In den folgenden Abbildungen (21 bis 53) sind die Kinetiken für die 35 Kandidatengene abgebildet.

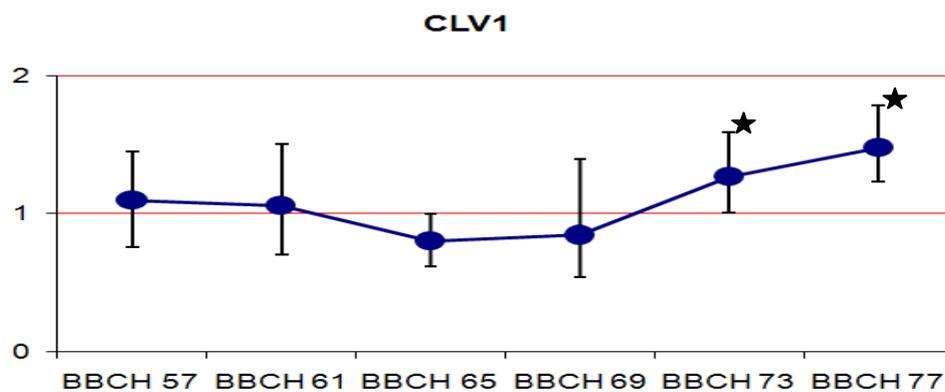
#### Kinetiken für die Kandidatengene aus der Literatur



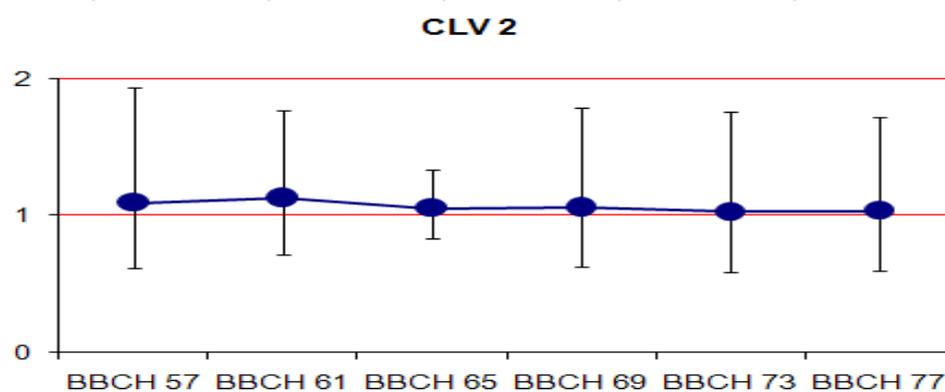
**Abbildung 21:** Kinetik für das Kandidatengen BLIND aus Tomate. BLIND blockiert während der Blütenbildung das laterale Meristem. Ist die Funktion von Blind gestört, kann es zu einer Störung der Blütenbildung kommen, da das Seitenwachstum in der Pflanze erhöht ist, und somit weniger Energie für die Blütenbildung zur Verfügung steht. Zum Entwicklungsstadium BBCH 65 ist BLIND signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm. In allen anderen Entwicklungsstadien konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



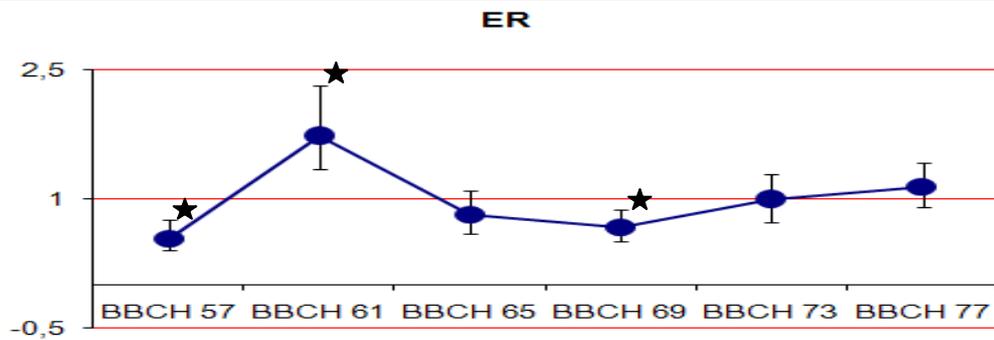
**Abbildung 22:** Kinetik für das Kandidatengen LATERAL SUPPRESSOR aus Tomate. Auch LAS kontrolliert das laterale Meristem. Eine erhöhte Genaktivität führt zur Reduktion der Seitentriebe. In allen Entwicklungsstadien außer im Entwicklungsstadium BBCH 65 ist LAS signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



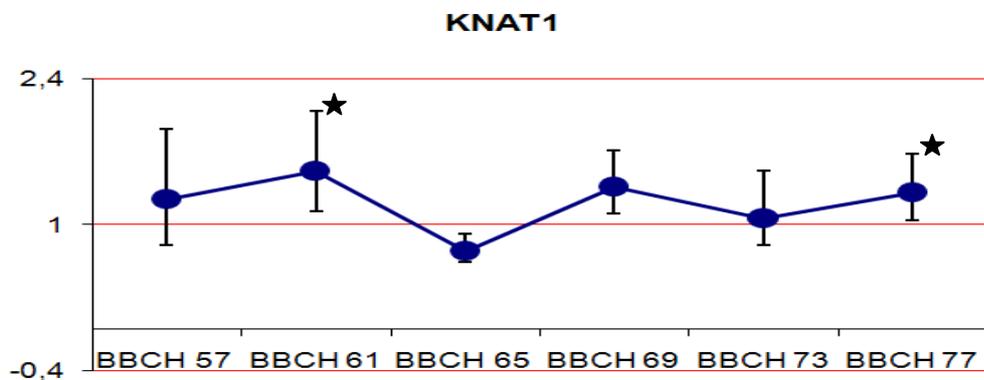
**Abbildung 23:** Kinetik für das Kandidatengen CLAVATA1 aus Arabidopsis. CLV1 reguliert das Blütenmeristem. In den Blütenstielen kann es die Funktion von ERECTA übernehmen. Eine erhöhte Expression führt zu einer höheren Anzahl an Blüten und zu verlängerten Blütenstielen. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 73 und BBCH 77 ist CLV1 signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



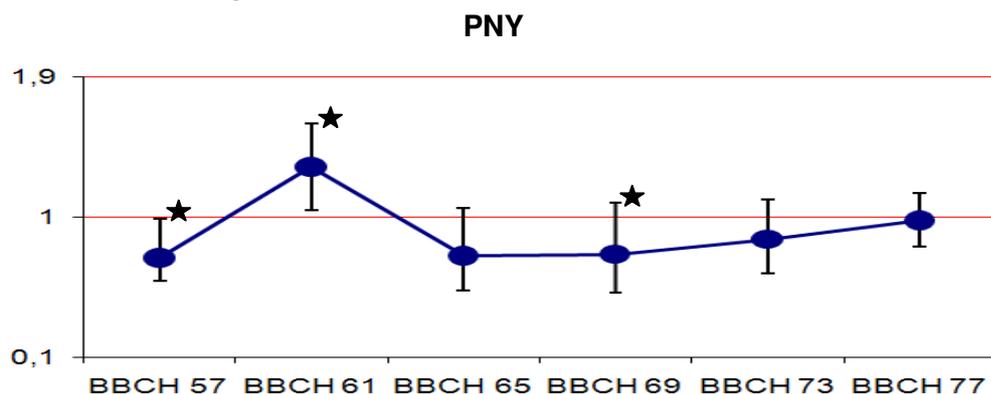
**Abbildung 24:** Kinetik für das Kandidatengen CLAVATA2 aus Arabidopsis. CLV2 hat die selbe Funktion wie CLV1. Zusätzlich ist es involviert in die Differenzierung von männlichen und weiblichen Blüten. Es konnten keine signifikanten differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm detektiert werden



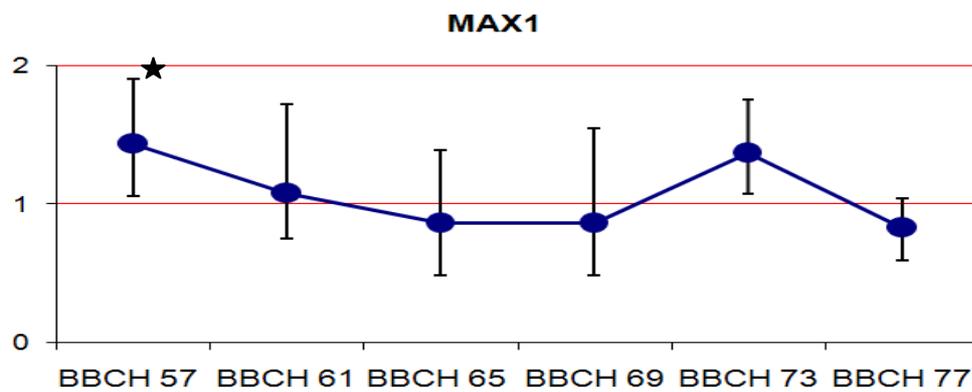
**Abbildung 25:** Kinetik für das Kandidatengen ERECTA aus Arabidopsis. ER reguliert die Infloreszenzarchitektur. Eine erhöhte Genaktivität führt zu lockereren Blütenständen und lateralen Organen. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 69 ist ER signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm. Zum Entwicklungsstadium BBCH 61 ist ER signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



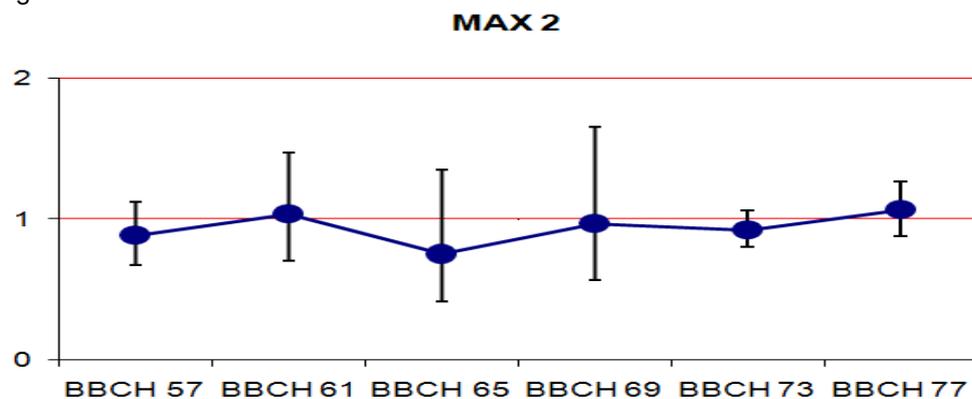
**Abbildung 26:** Kinetik für das Kandidatengen BREVIPEDICELLUS aus Arabidopsis. Knat1 reguliert die Infloreszenzarchitektur. Eine reduzierte Genaktivität führt zu sehr kurzen Blütenstielchen. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 61 und BBCH 77 ist KNAT1 signifikant hoch reguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



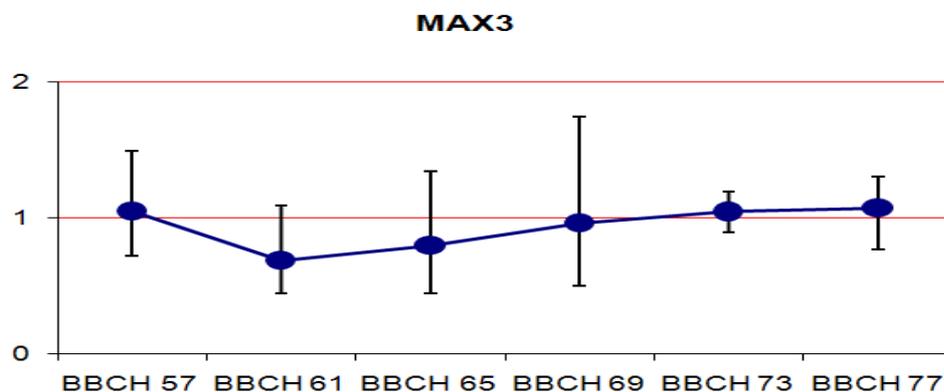
**Abbildung 27:** Kinetik für das Kandidatengen PENNYWISE aus Arabidopsis. PNY reguliert wie Brevipedicellus die Infloreszenzarchitektur. Eine erhöhte Genaktivität führt zu einer verminderten Blütenbildung und zu verkürzten Internodien. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 69 ist PNY signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm. Zum Entwicklungsstadium BBCH 61 ist PNY signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



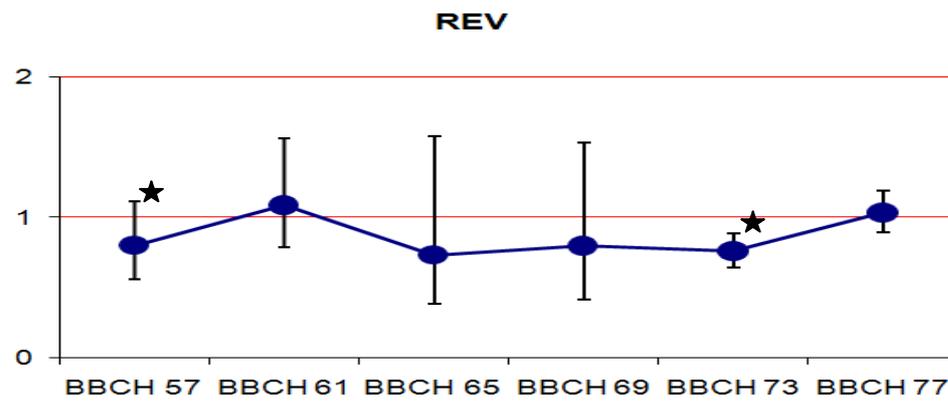
**Abbildung 28:** Kinetik für das Kandidatengen MORE AXILLARY GROWTH 1 aus Arabidopsis. MAX1 gehört zu einer Genfamilie, die das laterale Meristem reguliert. Bei verminderten Genaktivität, ist ein erhöhtes Seitenwachstum und eine verminderte Knospenbildung zu beobachten. Zum Entwicklungsstadium BBCH 57 ist MAX1 signifikant hoch reguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



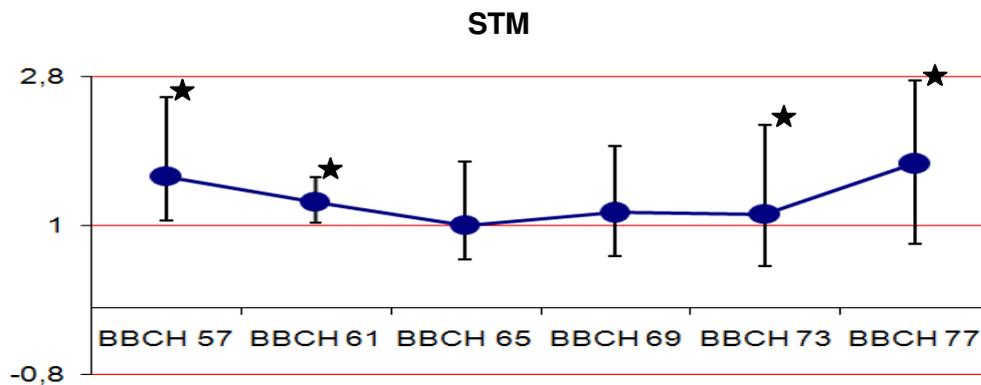
**Abbildung 29:** Kinetik für das Kandidatengen MORE AXILLARY GROWTH 2 aus Arabidopsis. MAX2 gehört zur selben Genfamilie wie MAX1. Auch hier kann durch eine verminderte Genaktivität ein erhöhtes Seitenwachstum beobachtet werden. Es konnten keine signifikanten differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm detektiert werden.



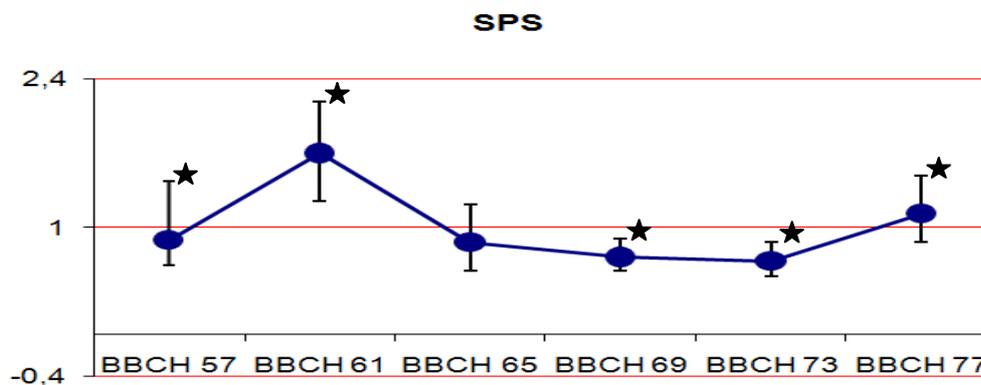
**Abbildung 30:** Kinetik für das Kandidatengen MORE AXILLARY GROWTH 3 aus Arabidopsis. MAX3 hat die gleiche Funktion wie MAX1 und MAX2. Auch hier konnten keine signifikanten differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm detektiert werden.



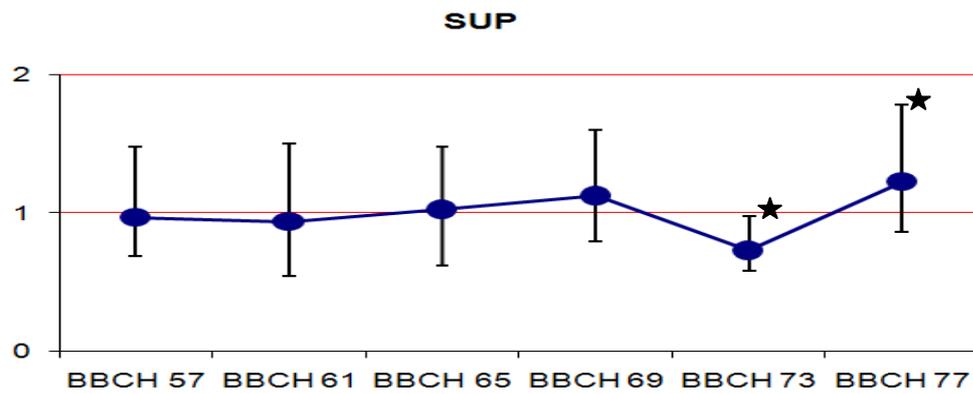
**Abbildung 31:** Kinetik für das Kandidatengen REVOLUTA aus Arabidopsis. REV reduziert ebenfalls das laterale Seitenwachstum. Eine verringerte Genaktivität führt zu erhöhtem Seitenwachstum, was die Ausbildung der Blüten beeinträchtigt. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 ist REV signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



**Abbildung 32:** Kinetik für das Kandidatengen SHOOT MERISTEMLESS aus Arabidopsis. STM ist verantwortlich für die Regulierung von Meristemen. Eine erhöhte Genaktivität führt zur erhöhten Initiierung des floralen Meristems. Außer zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 65 und BBCH 69 ist STM in allen anderen Entwicklungsstadien signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.

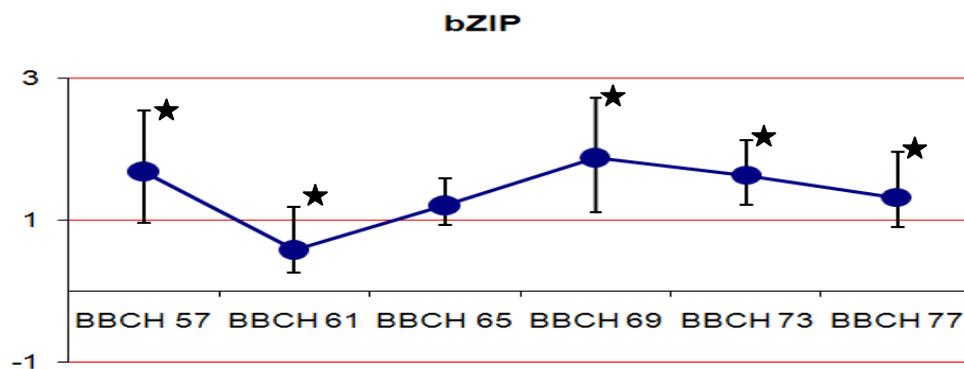


**Abbildung 33:** Kinetik für das Kandidatengen SUPERSHOOT aus Arabidopsis. Eine Überexpression von SPS führt zu einem erhöhten Wachstum der Internodien und Blütenstielchen. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 61 und BBCH 77 ist diese signifikant hochreguliert und zu den drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 69 und BBCH 73 ist diese signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.

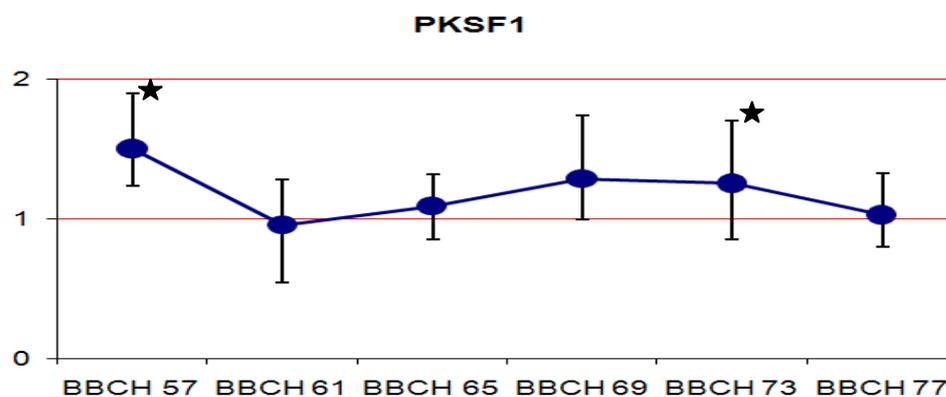


**Abbildung 34:** Kinetik für das Kandidatengen SUPERMAN aus Arabidopsis. SUP reguliert die Infloreszenzarchitektur. Eine erhöhte Genaktivität führt zu verlängerten Blütenstielchen. Zum Entwicklungsstadium BBCH 73 ist SUP signifikant herunterreguliert und zum Entwicklungsstadium BBCH 77 signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.

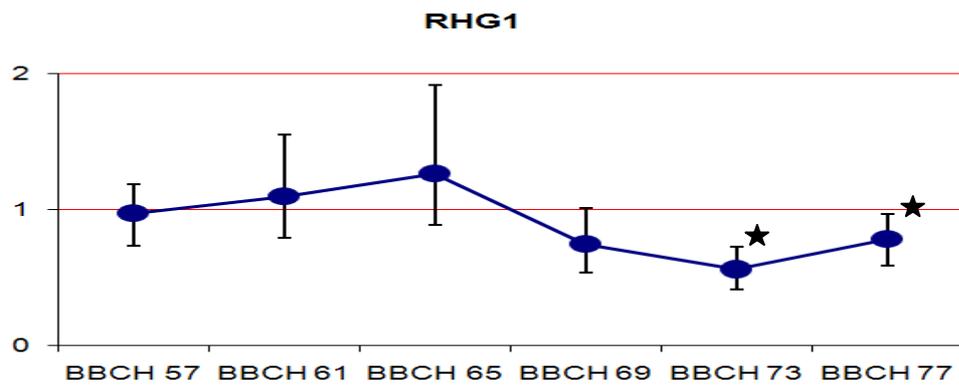
### Kinetiken für die Kandidatengene, welche Transkriptionsfaktoren oder Proteine mit unbekannter molekularer Funktion kodieren



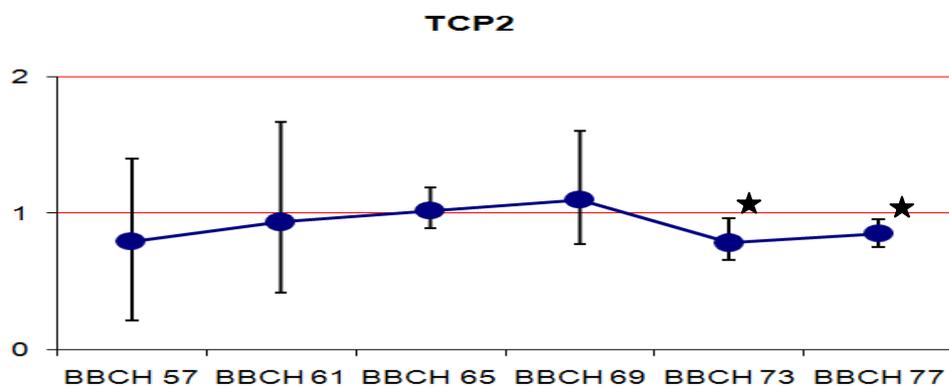
**Abbildung 35:** Kinetik für das Kandidatengen bZIP. Zu den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 69 , BBCH 73 und BBCH 77 ist bZIP signifikant hoch reguliert und zum Entwicklungsstadium BBCH 61 ist dieses signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



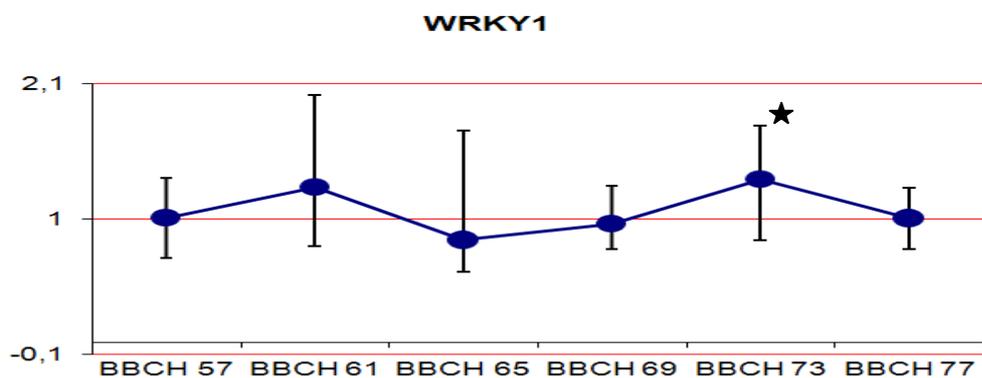
**Abbildung 36:** Kinetik für das Kandidatengen PKSF1. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 ist diese signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



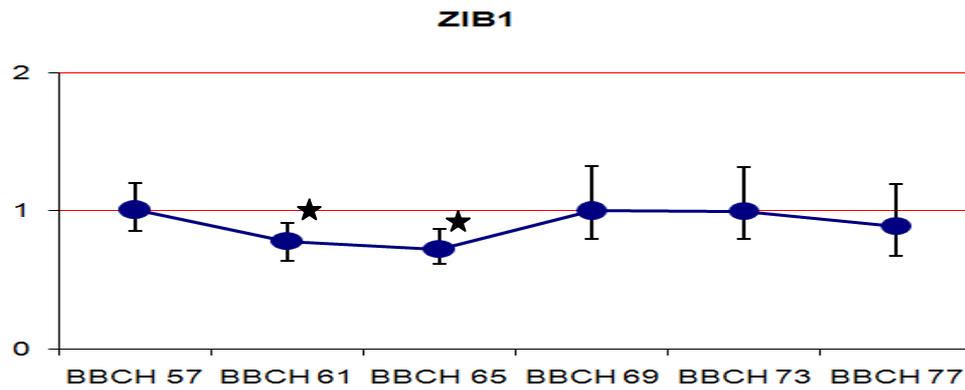
**Abbildung 37:** Kinetik für das Kandidatengen RHG1. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 73 und BBCH 77 ist RHG1 signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



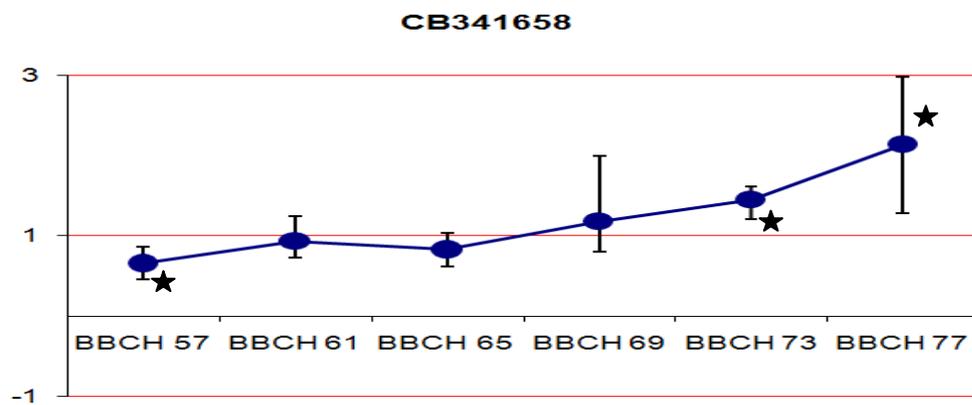
**Abbildung 38:** Kinetik für das Kandidatengen TCP2. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 73 und BBCH 77 ist TCP2 signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



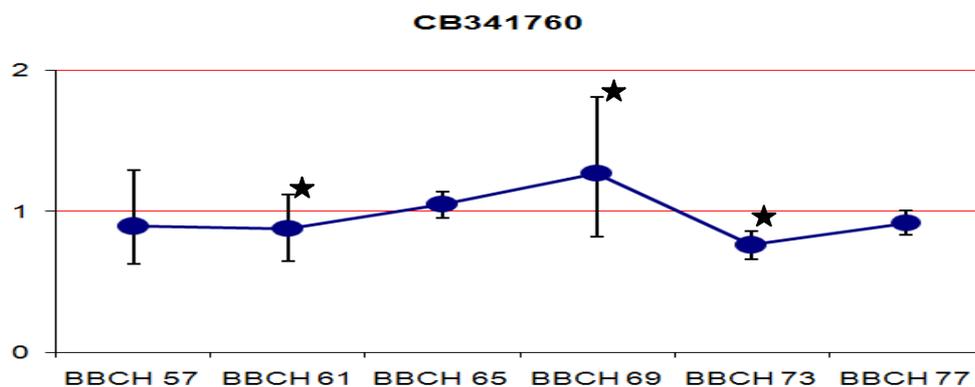
**Abbildung 39:** Kinetik für das Kandidatengen WRKY1. Zum Entwicklungsstadium BBCH 73 ist WRKY1 signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



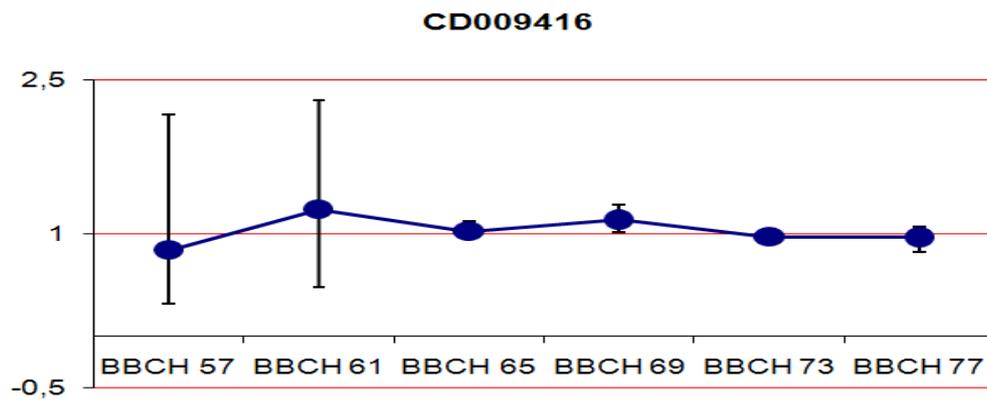
**Abbildung 40:** Kinetik für das Microarray Kandidatengen ZIB1. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 61 und BBCH 65 ist ZIB1 signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



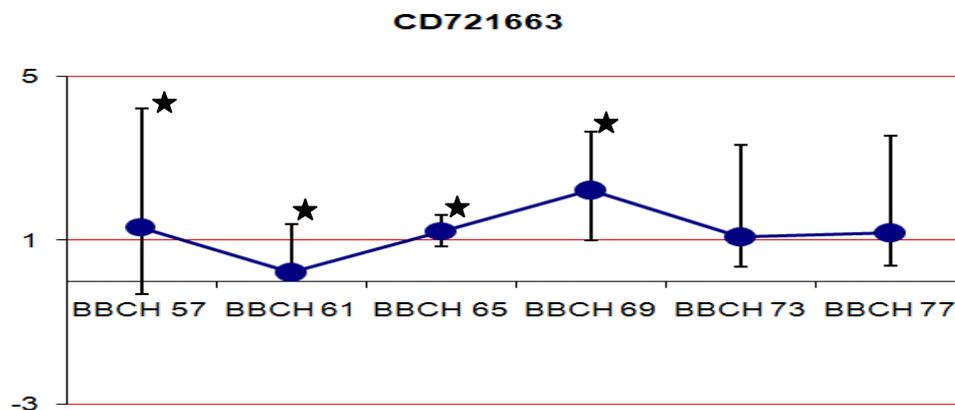
**Abbildung 41:** Kinetik für das Kandidatengen CB341658. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 73 und BBCH 77 ist dieses signifikant hochreguliert und im Entwicklungsstadium BBCH 57 signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



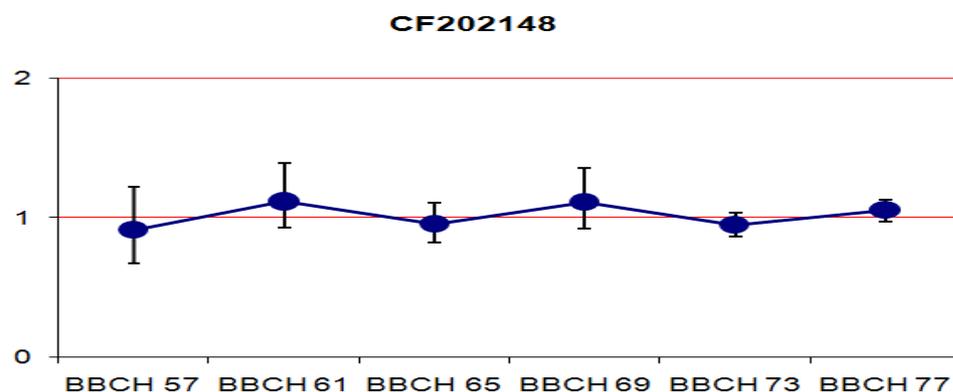
**Abbildung 42:** Kinetik für das Kandidatengen CB341760. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 61 und BBCH 73 ist dieses signifikant herunterreguliert und im Entwicklungsstadium BBCH 69 signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



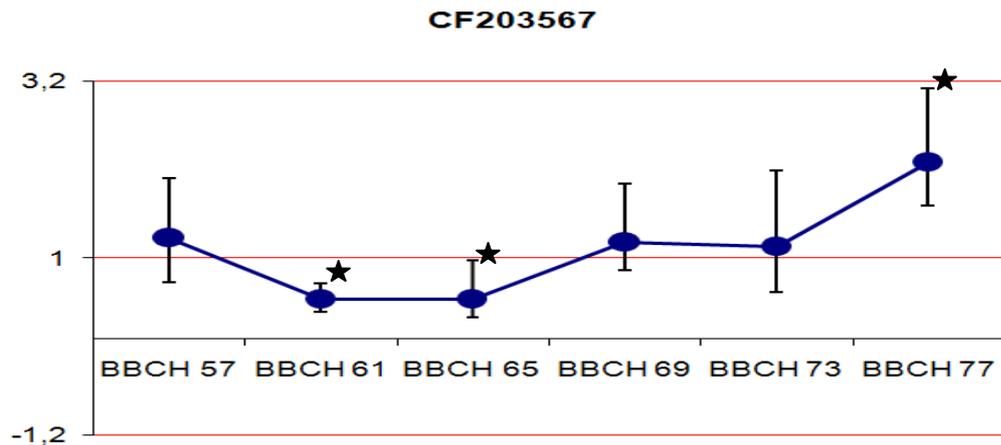
**Abbildung 43:** Kinetik für das Kandidatengen CD009416. Es konnte keinen signifikant differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden `Spätburgunder`- Klonen 18 Gm und 1-84 Gm detektiert werden.



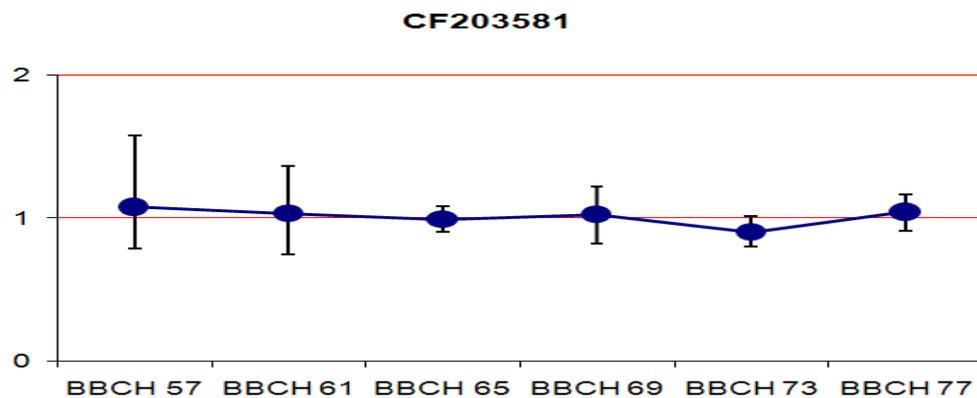
**Abbildung 44:** Kinetik für das Kandidatengen CD721663. Zu den drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 69 ist dieses signifikant hochreguliert und im Entwicklungsstadium BBCH 61 signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1-84 Gm.



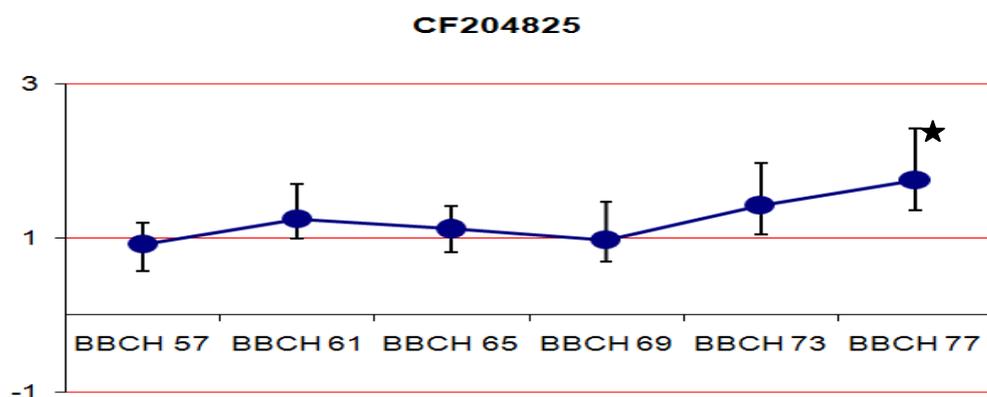
**Abbildung 45:** Kinetik für das Microarray Kandidatengen CF202148. Es konnten keine signifikant differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden `Spätburgunder`- Klonen 18 Gm und 1-84 Gm detektiert werden.



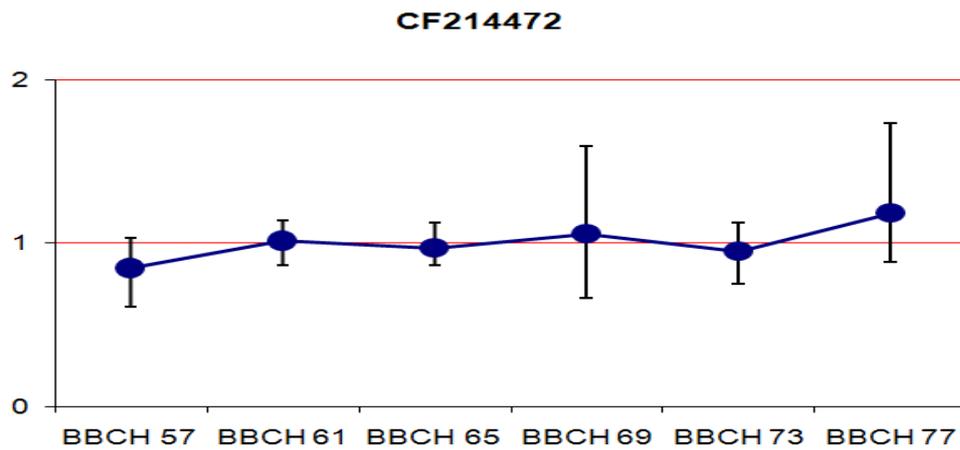
**Abbildung 46:** Kinetik für das Kandidatengen CF203567. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 61 und BBCH 65 ist dieses signifikant herunterreguliert und im Entwicklungsstadium BBCH 77 signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



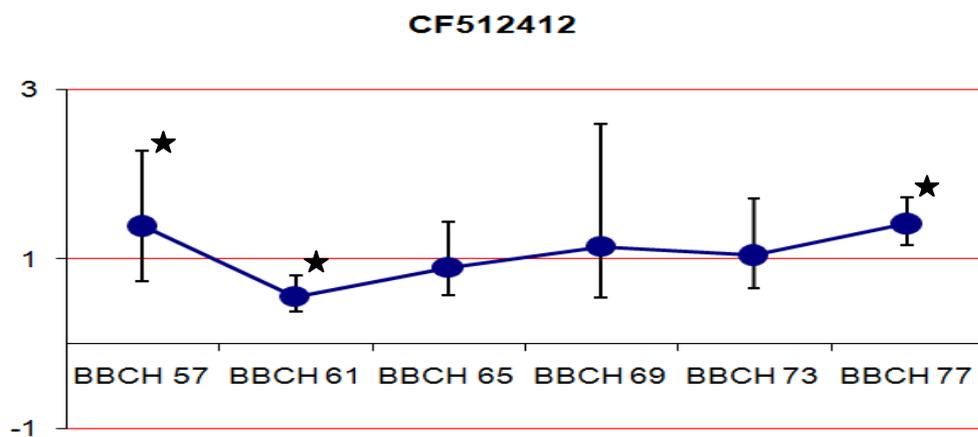
**Abbildung 47:** Kinetik für das Microarray Kandidatengen CF203581. Es konnten keine signifikant differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm detektiert werden.



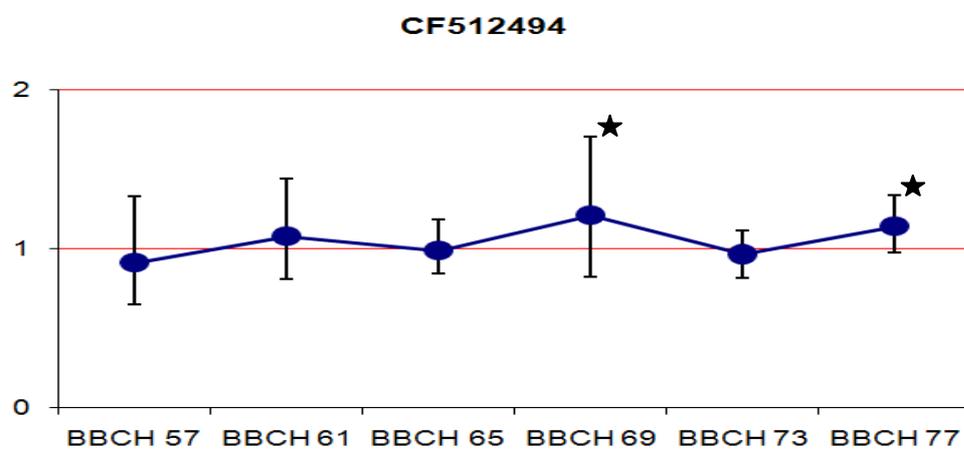
**Abbildung 48:** Kinetik für das Microarray Kandidatengen CF204825. Zum Entwicklungsstadium BBCH 77 ist dieses signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



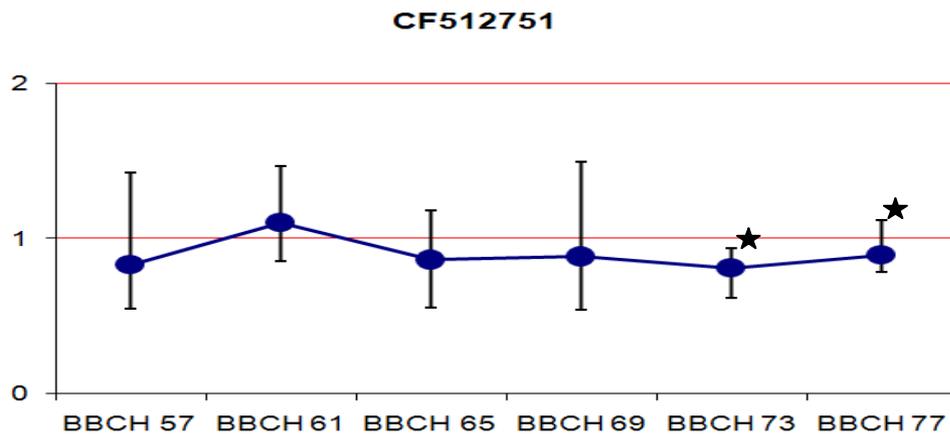
**Abbildung 49:** Kinetik für das Kandidatengen CF214472. Es konnten keine signifikant differentiellen Expressionsunterschiede zwischen den beiden 'Spätburgunder'- Klonen 18 Gm und 1-84 Gm detektiert werden.



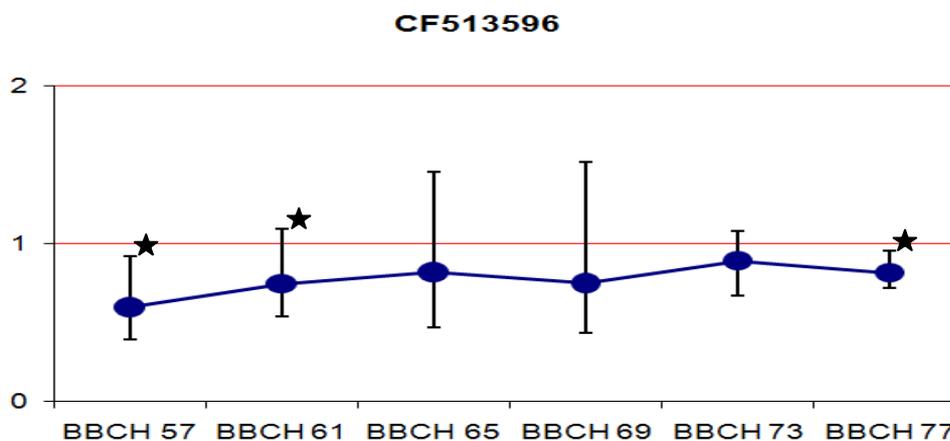
**Abbildung 50:** Kinetik für das Kandidatengen CF512412. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 77 ist dieses signifikant hochreguliert und im Entwicklungsstadium BBCH 61 signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1-84 Gm.



**Abbildung 51:** Kinetik für das Kandidatengen CF512494. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 69 und BBCH 77 ist dieses signifikant hochreguliert im lockerbeerigen Klon 1-84 Gm.



**Abbildung 52:** Kinetik für das Kandidatengen CF512751. Zu den beiden Entwicklungsstadien BBCH 73 und BBCH 77 ist dieses signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.



**Abbildung 53:** Kinetik für das Kandidatengen CF513596. Zu den drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 61 und BBCH 77 ist dieses signifikant herunterreguliert im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm.

Insgesamt konnten bei 27 Kandidatengenen in mindestens einem Entwicklungsstadium eine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 18 Gm und 1–84 Gm detektiert werden. In Tabelle 7 sind alle getesteten Kandidatengene aus der Literatur und aus den Ergebnissen der Microarray Analyse aufgelistet. Für jedes Kandidatengen sind alle sechs getesteten Entwicklungsstadien zusammengestellt, ein x steht für signifikant differentielle Expression im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm. Ein – steht für eine nicht signifikante differentielle Expression zwischen den beiden Klonen. Aus dieser Tabelle wurden neun interessante Kandidatengene für die weiteren Analysen ausgewählt.

**Tabelle 7:** Alle Kandidatengene aus der Literatur und aus den Ergebnissen der Microarray Analyse, für die eine Kinetik mittels quantitativer Real Time PCR erstellt wurde. Grün sind die Kandidatengene von Arabidopsis, gelb die Kandidatengene von Tomate, lila sind die Transkriptionsfaktoren aus den Ergebnissen der Microarray Hybridisierungen, rot sind die Kandidatengene, welche Proteine mit unbekannter molekulare Funktion kodieren.

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

### 3.1.4.5 Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2007

#### 3.1.4.5.1 Erweiterter Klon – Satz und Probennahme 2007

In der Vegetationsperiode 2007 wurde von 10 Klonen (5 kompakte Klone und 5 lockerbeerige Klone) Pflanzenmaterial von zwei verschiedenen Standorten, Geisenheim und Heppenheim gesammelt. Ziel war es, die Gene, die eine gesichert differentielle Expression aufwiesen, an einem größeren Klonen – Satz

und 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 vier `Spätburgunder´- Klonen, 18 Gm , 1–84 Gm, INRA 777 und M242 Pflanzenmaterial gesammelt. An beiden Standorten wurden die Proben zu den drei Entwicklungszeitpunkten BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 entnommen

### 3.1.4.5.2 Auswahl der Kandidatengene

Aus der Liste der 34 Kandidatengene, für die mit dem Pflanzenmaterial der beiden `Spätburgunder´- Klone 18 Gm und 1–84 Gm aus der Vegetationsperiode 2006 die Kinetiken ihres Expressionsmusters erstellt wurden, wurden die neun Kandidatengene ausgewählt, die die höchste Anzahl an signifikant differentiell exprimierten Entwicklungszeitpunkten (in den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73) aufwiesen( vgl. Tabelle 7). Diese sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8:** Ausgewählte Kandidatengene für die Erstellung der Kinetiken mittels quantitativer Real Time PCR für das Pflanzenmaterial aus dem Jahr 2007. Dargestellt sind die drei Entwicklungszeitpunkte BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73. Ein x steht für signifikante differentielle Expression im Jahr 2006, ein – steht für eine nicht signifikant differentielle Expression. Grün sind die Kandidatengene von Arabidopsis, gelb die Kandidatengene von Tomate, lila sind die Transkriptionsfaktoren aus den Ergebnissen der Microarray Analyse, rot sind die Kandidatengene, welche Proteine mit unbekannter molekularer Funktion kodieren.

Gen	BBCH 57	BBCH 65	BBCH 73	Summe	Insgesamt
SPS	x	-	x	2	5
LAS	x	-	x	2	5
bZIP	x	-	x	2	5
SAM	x	-	x	2	4
CD721663	x	x	-	2	4
CB341658	x	-	x	2	3
REV	x	-	x	2	2
PSKF1	x	-	x	2	2
ER	x	-	-	1	3

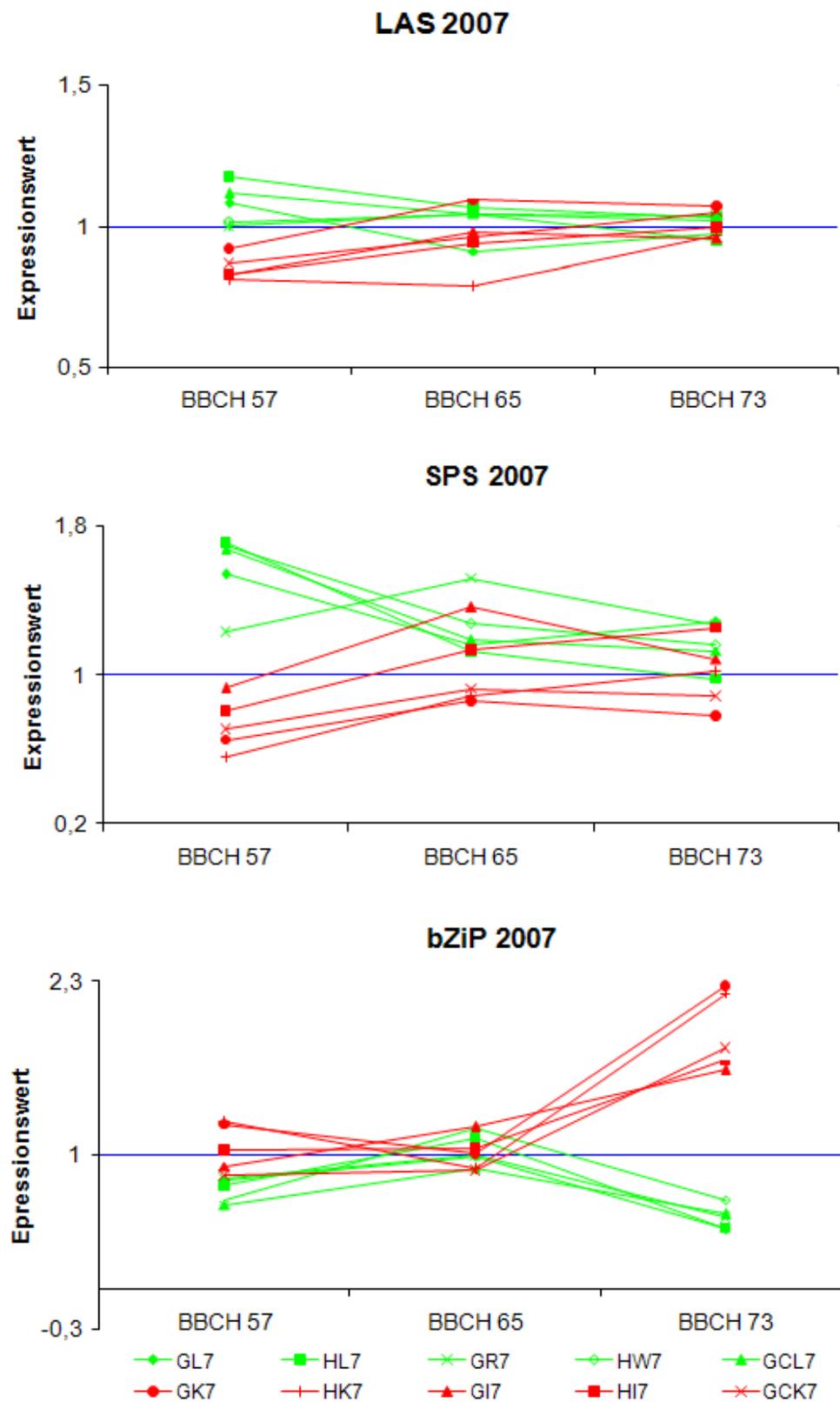
### 3.1.4.5.3 Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2007

Das Experiment wurde wie mit dem Material aus der Vegetationsperiode 2006 durchgeführt. Es wurden jeweils drei biologische und zwei technische Wiederholungen durchgeführt. In den folgenden Abbildungen (54 bis 56) sind die Kinetiken für die neun ausgewählten Kandidatengene abgebildet. In Tabelle 9 sind die Kürzel der 10 Klone erläutert, wie sie in den Legenden der Abbildungen 54 - 56 stehen. Grün sind die Kinetiken der lockerbeerigen Klone dargestellt, rot die der kompakten Klone. Alle Klone vom Standort Geisenheim beginnen mit einem G, die Klone vom Standort Heppenheim mit einem H. Um eine mögliche Signifikanz der Expressionswerte feststellen zu können, wurde mit den Expressionswerten beider Gruppen ein t – Test durchgeführt. Die Signifikanzschwelle liegt bei  $t = 0,05$ . Ist das t – Test Ergebnis größer als diese Schwelle, ist keine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden Gruppen detektierbar. 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.

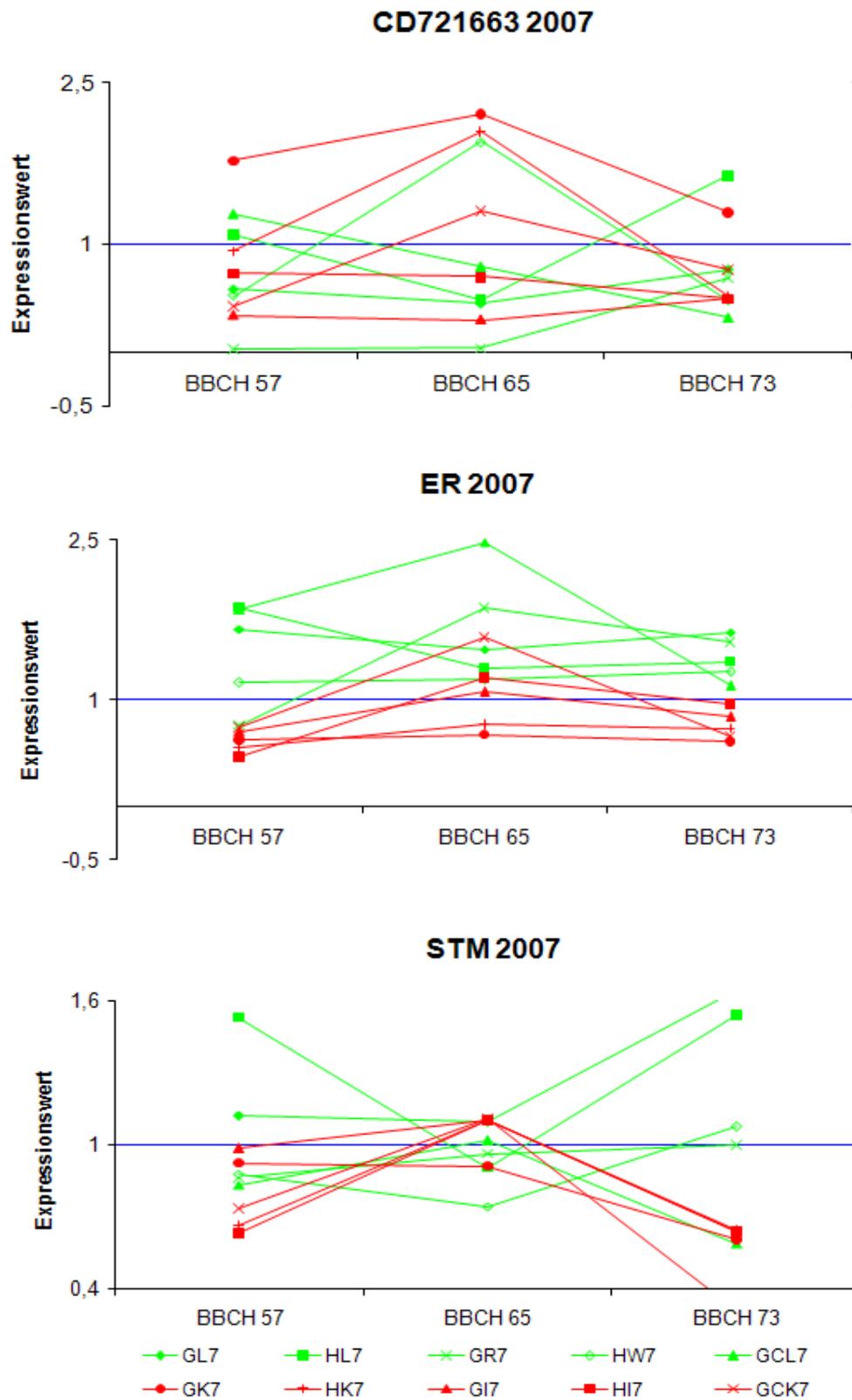
**Tabelle 9:** Erklärung der Abkürzungen in den Legenden der nachfolgenden Abbildungen

	Kürzel	Klon	Sorte	Standort	Vegetation
<b>locker</b>	GL7	1-84 Gm	Spätburgunder	Geisenheim	2007
	HL7	1-84 Gm	Spätburgunder	Heppenheim	2007
	GR7	1-30 Gm	Grauburgunder	Geisenheim	2007
	HW7	M242	Spätburgunder	Heppenheim	2007
	GCL7	1-45 Gm	Chardonnay	Geisenheim	2007

<b>kompakt</b>	GK7	18 Gm	Spätburgunder	Geisenheim	2007
	HK7	18 Gm	Spätburgunder	Heppenheim	2007
	GI7	INRA 777	Spätburgunder	Geisenheim	2007
	HI7	INRA 777	Spätburgunder	Heppenheim	2007
	GCK7	54 Gm	Chardonnay	Geisenheim	2007

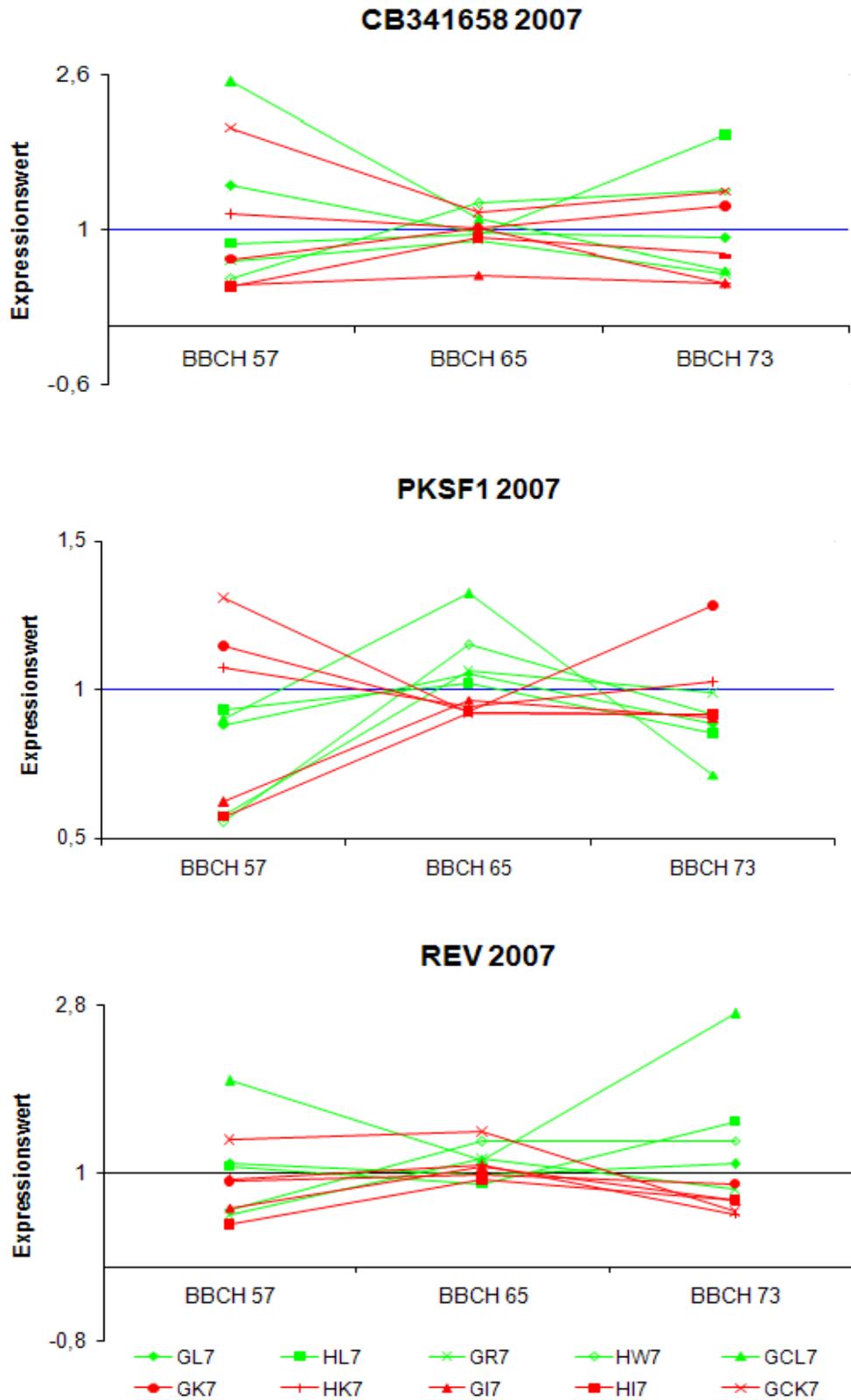


**Abbildung 54:** Kinetiken für die Kandidatengene LAS, SPS und bZiP. Für alle drei Gene konnte in mindestens einem Zeitpunkt eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen festgestellt werden.



**Abbildung 55:** Kinetiken für die Kandidatengene CD721663, ER und STM. Auch für die beiden Gene ER und STM konnte in mindestens einem Entwicklungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden. Für das

Kandidatengen CD721663 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.



**Abbildung 56:** Kinetiken für die Kandidatengene CB341658, PKSF1 und REV. Für die beiden Gene PKSF1 und REV konnte in einem Entwicklungsstadium eine signifikant differenzielle

Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden. Im Kandidatengen CB341658 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Insgesamt konnten bei sieben der neun Kandidatengene in mindestens einem Entwicklungsstadium ein signifikanter Unterschied in der Genaktivität 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.

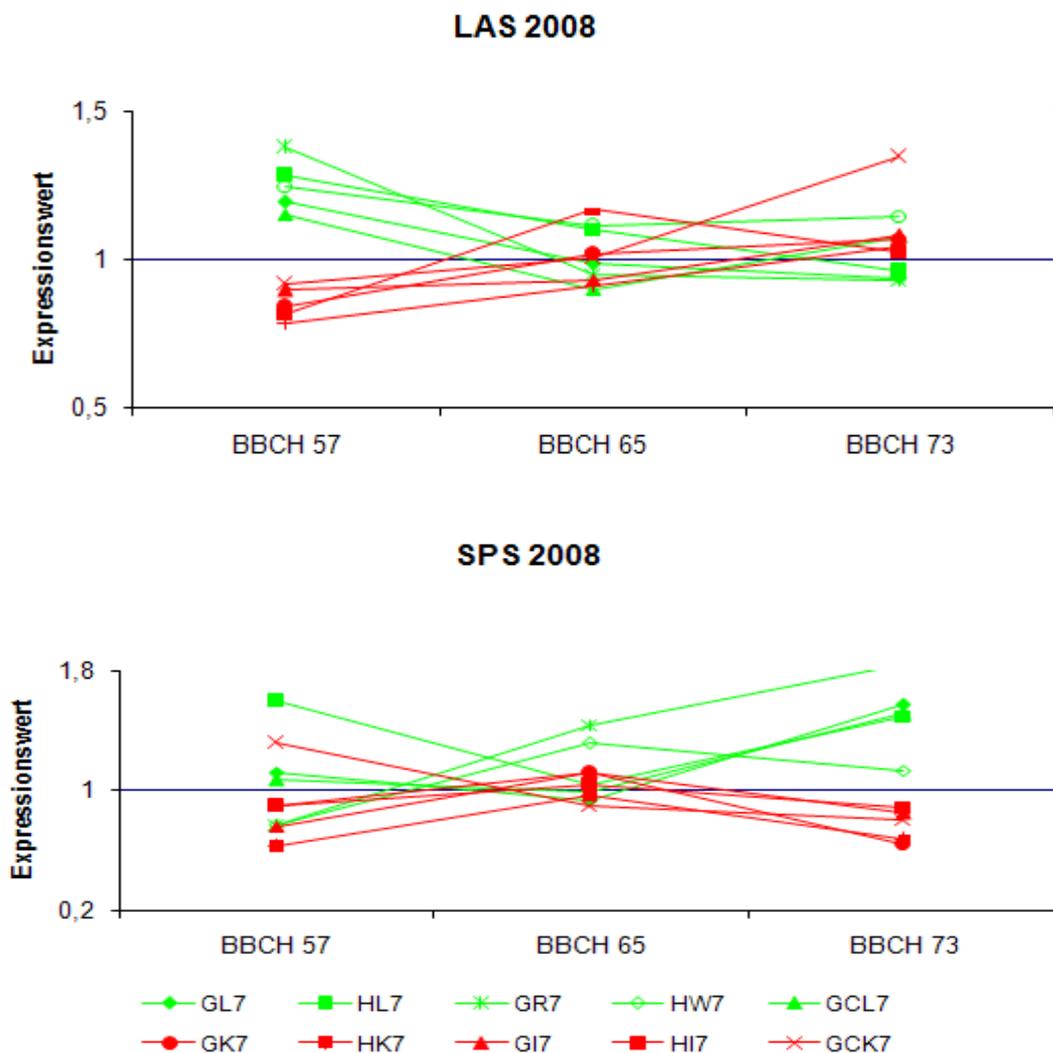
Im Entwicklungsstadium BBCH 57 konnte bei den Kandidatengenen SPS ( $t = 0,00006$ ), LAS ( $t = 0,0004$ ), bZiP ( $t = 0,007$ ) und ER ( $t = 0,005$ ) eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden. In den lockerbeerigen Klonen konnten für die Kandidatengene SPS, LAS und ER eine erhöhte Genaktivität festgestellt werden. Die Genaktivität von bZiP war in den lockerbeerigen Klonen zu BBCH 57 reduziert. In den kompakten Klonen war die Genaktivität der drei Kandidatengene SPS, LAS und ER reduziert, die Genaktivität von bZiP hingegen erhöht. Im Entwicklungsstadium BBCH 65 konnte nur im Kandidatengen PKSF1 ( $t = 0,009$ ) eine signifikante differentielle Expression zwischen den beiden Klengruppen detektiert werden. Auch hier konnte eine erhöhte Genaktivität in den lockerbeerigen Klonen und eine reduzierte Genaktivität in den kompakten Klonen festgestellt werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 73 konnte bei den Kandidatengenen bZiP ( $t = 0,000007$ ), ER ( $t = 0,0005$ ), STM ( $t = 0,018$ ) und REV ( $t = 0,037$ ) ein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt werden. Die drei Gene ER, STM und REV zeigten eine erhöhte Genexpression in den lockerbeerigen Klonen und eine reduzierte Genaktivität in den kompakten Klonen. Das Kandidatengen bZiP zeigte wie im Entwicklungsstadium BBCH 57 eine reduzierte Genaktivität in den lockerbeerigen Klonen und eine erhöhte Genaktivität in den kompakten Klonen.

In den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 und BBCH 73 konnten jeweils in vier Kandidatengenen Unterschiede in der Genaktivität zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen gefunden werden. Im Entwicklungsstadium BBCH konnte nur in einem Kandidatengen eine signifikant differentielle Expression festgestellt werden. Auffällig war, dass sich die `Chardonnay`- Klone, bei denen der `Burgunder` ein Elternteil ist, in ihrer Expression bei einigen Genen sich im

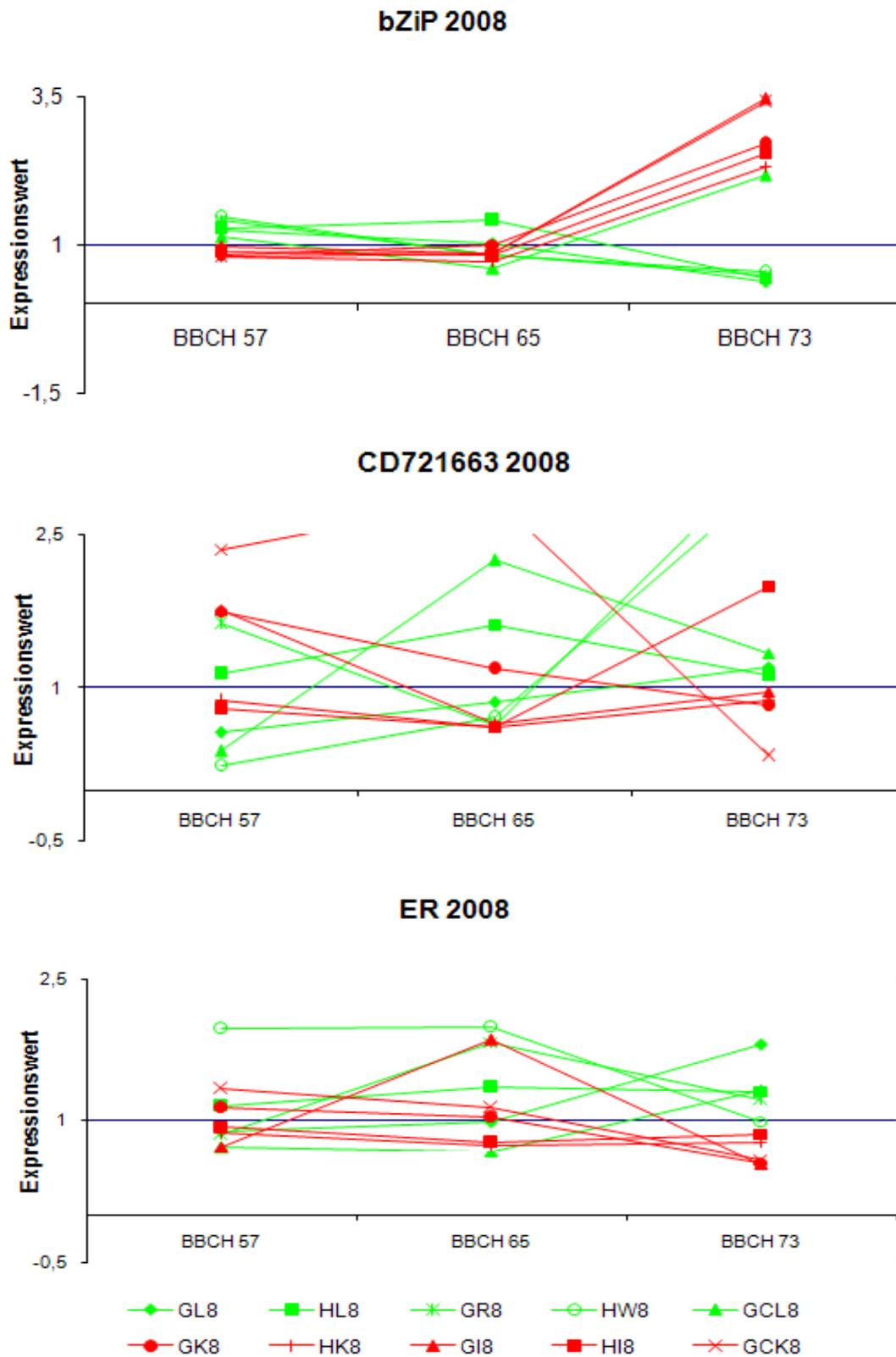
Vergleich zu den `Spätburgunder`- Klonen und dem `Grauburgunder`- Klon unterschieden. Betrachtete man die Ergebnisse ohne Berücksichtigung der beiden `Chardonnay`- Klone, wurden die Ergebnisse eindeutiger. Die dazugehörigen Abbildungen (A1 – A9) sind im Anhang dargestellt.

### 3.1.4.6 Real Time PCR Experiment – Kinetiken 2008

In der Vegetationsperiode 2008 wurde das Real Time PCR Experiment von 2007 wiederholt. Es wurden Kinetiken für die selben Gene mit dem Pflanzenmaterial aus der Vegetationsperiode 2008 der selben Klone erstellt. Es wurde wieder Probenmaterial am Standort Geisenheim und Heppenheim zu den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 gesammelt. In den folgenden Abbildungen (57 bis 60) sind die Kinetiken für die neun ausgewählten Kandidatengene für das Jahr 2008 abgebildet.

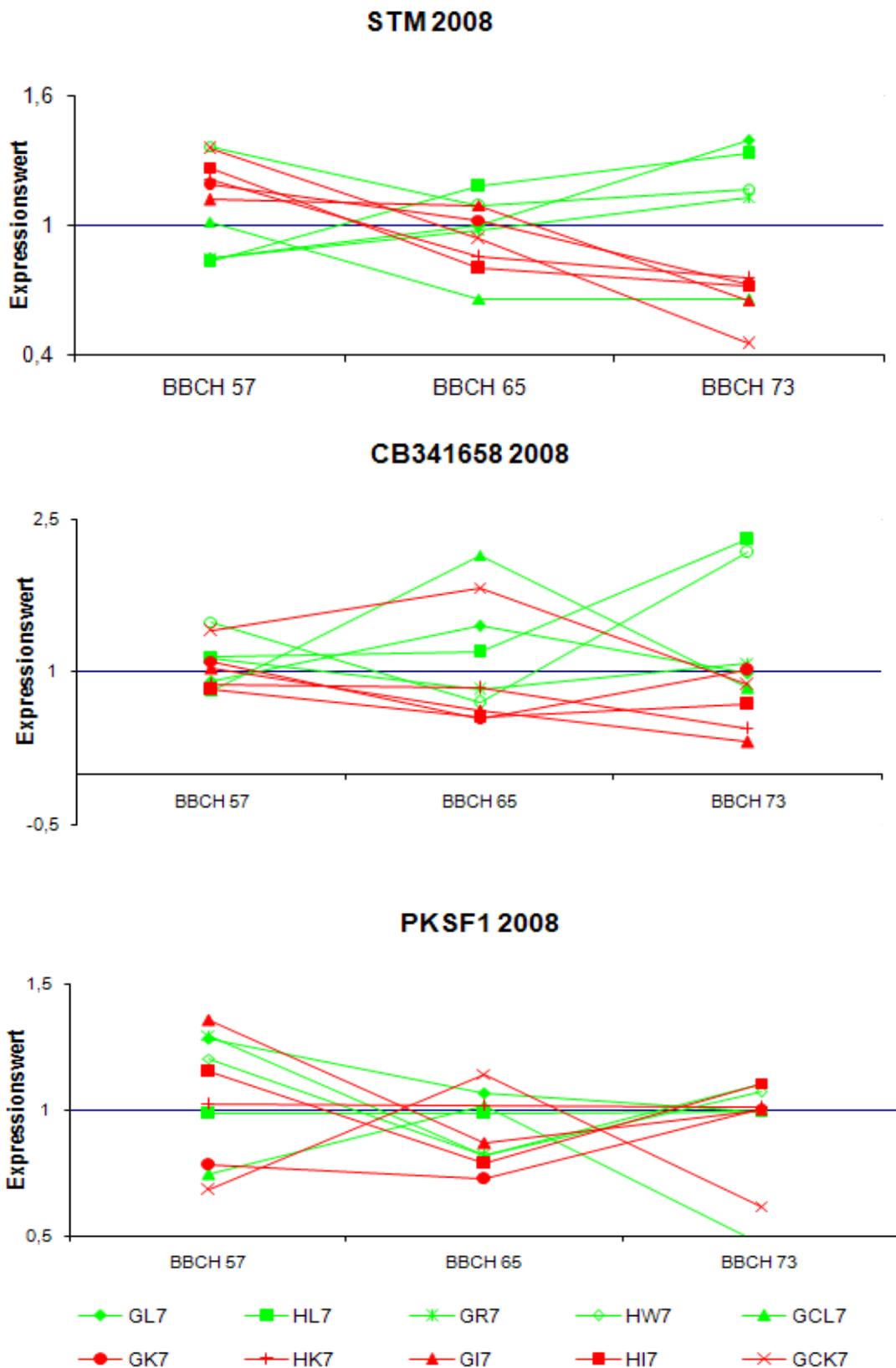


**Abbildung 57:** Kinetiken für die Kandidatengene LAS und SPS. Für die beiden Gene konnte in einem Entwicklungsstadium eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.



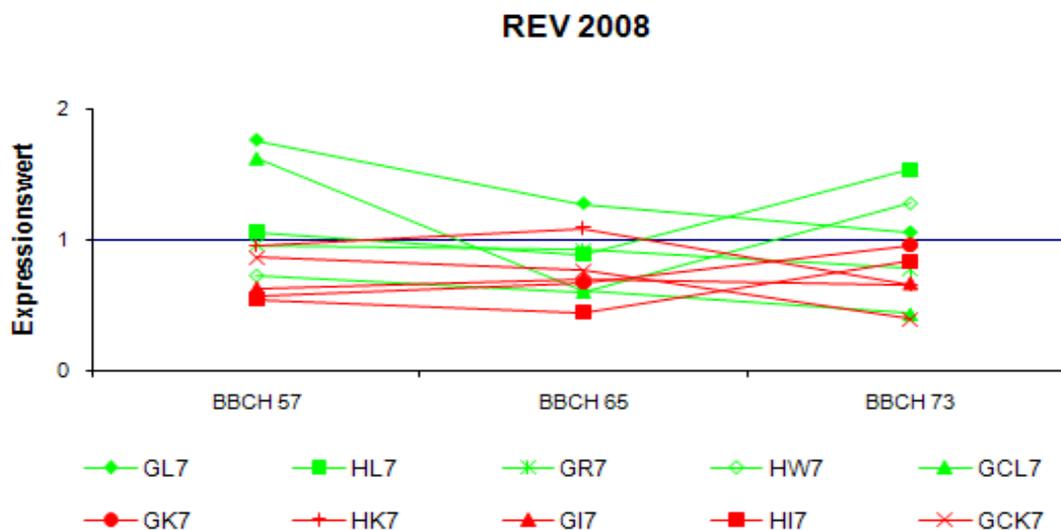
**Abbildung 58:** Kinetiken für die Kandidatengene bZiP, CD721663 und ER. Auch für die beiden Gene bZiP und ER konnte in mindestens einem Entwicklungszeitpunkt ein signifikanter

Unterschied zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden. Für das Kandidatengen CD721663 konnten wie im Versuchsjahr 2007 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.



**Abbildung 59:** Kinetiken für die Kandidatengene STM, CB341658 und PKS1. Im Gene STM konnte in einem Entwicklungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den kompakten und

den lockerbeerigen Klonen detektiert werden. Für die Kandidatengene CB341658 und PKS1F1 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.



**Abbildung 60:** Kinetiken für das Kandidatengen REV. Es konnte ein signifikanter Unterschied zum Entwicklungsstadium BBCH 57 zwischen den beiden Klongruppen festgestellt werden.

Im Versuchsjahr 2008 konnten bei sechs der neun Kandidatengenen eine signifikant differentielle Expression zu mindestens einem Entwicklungsstadium zwischen den beiden Gruppen, den kompakten und den lockerbeerigen Klonen, detektiert werden. Neben den beiden Kandidatengenen CD721660 und CB341658, bei denen schon im Versuchsjahr 2007 keine signifikanten Unterschiede in der Genaktivität zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen festzustellen war, konnte diesmal auch bei dem Kandidatengen PKS1F1 kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

Im Entwicklungszeitpunkt BBCH 57 konnte bei den drei Kandidatengenen LAS ( $t = 0,0002$ ), bZiP ( $t = 0,0002$ ) und REV ( $t = 0,045$ ) eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden. In den lockerbeerigen Klonen konnte eine erhöhte Genaktivität bei allen drei Genen und eine reduzierte Genaktivität bei den kompakten Klonen festgestellt werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 65 konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 73 konnte bei den vier Kandidatengenen SPS ( $t = 0,0003$ ), bZiP ( $t = 0,001$ ), STM ( $t = 0,009$ ) und ER ( $t = 0,002$ ) ein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt werden.

Die drei Gene SPS, STM und ER zeigten eine erhöhte Genexpression in den lockerbeerigen Klonen und eine reduzierte Genaktivität in den kompakten Klonen. Das Kandidatengen bZIP zeigte wie im Versuchsjahr eine reduzierte Genaktivität in den lockerbeerigen Klonen und eine erhöhte Genaktivität in den kompakten Klonen. Im Entwicklungsstadium BBCH 73 konnten wie im Versuchsjahr 2007 wieder bei vier Kandidatengenen Unterschiede in der Genaktivität zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen gefunden werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 57 konnte bei drei Kandidatengen eine signifikant differentielle Expression festgestellt werden. 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. Eine Betrachtung der Ergebnisse ohne diese beiden Klone führte wieder zu klaren Ergebnissen. Die dazugehörigen Abbildungen (A10 – A18) sind im Anhang dargestellt.

#### **3.1.4.7 Vergleich 2007 mit 2008**

Ziel der quantitativen Real Time PCR Experimente war es, die Kandidatengene zu identifizieren, die umweltunabhängig (Standort, Versuchsjahr) eine gesicherte differentielle Expression zwischen den lockerbeerigen und den kompakten Klonen zeigten. Hierzu wurden die Ergebnisse der Versuchsjahre 2007 und 2008 zusammen verrechnet und mit einem t – Test auf Signifikanz überprüft. Die Signifikanzschwelle liegt wieder bei  $t = 0,05$ . Ist das t – Test Ergebnis größer als diese Schwelle, ist keine signifikante differentielle Expression zwischen den beiden Gruppen detektierbar. 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. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der beiden einzelnen 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 zeigt sich deutlich, dass bei den zwei

Kandidatengenen CD721663 und CB341658 zu keinen 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 werde, diese konnte im Versuchsjahr 2008 nicht bestätigt werden. Die Kandidatengene CD721663, CB341658 und PKSF1 wurden deshalb in den weiteren Untersuchungen nicht mehr betrachtet.

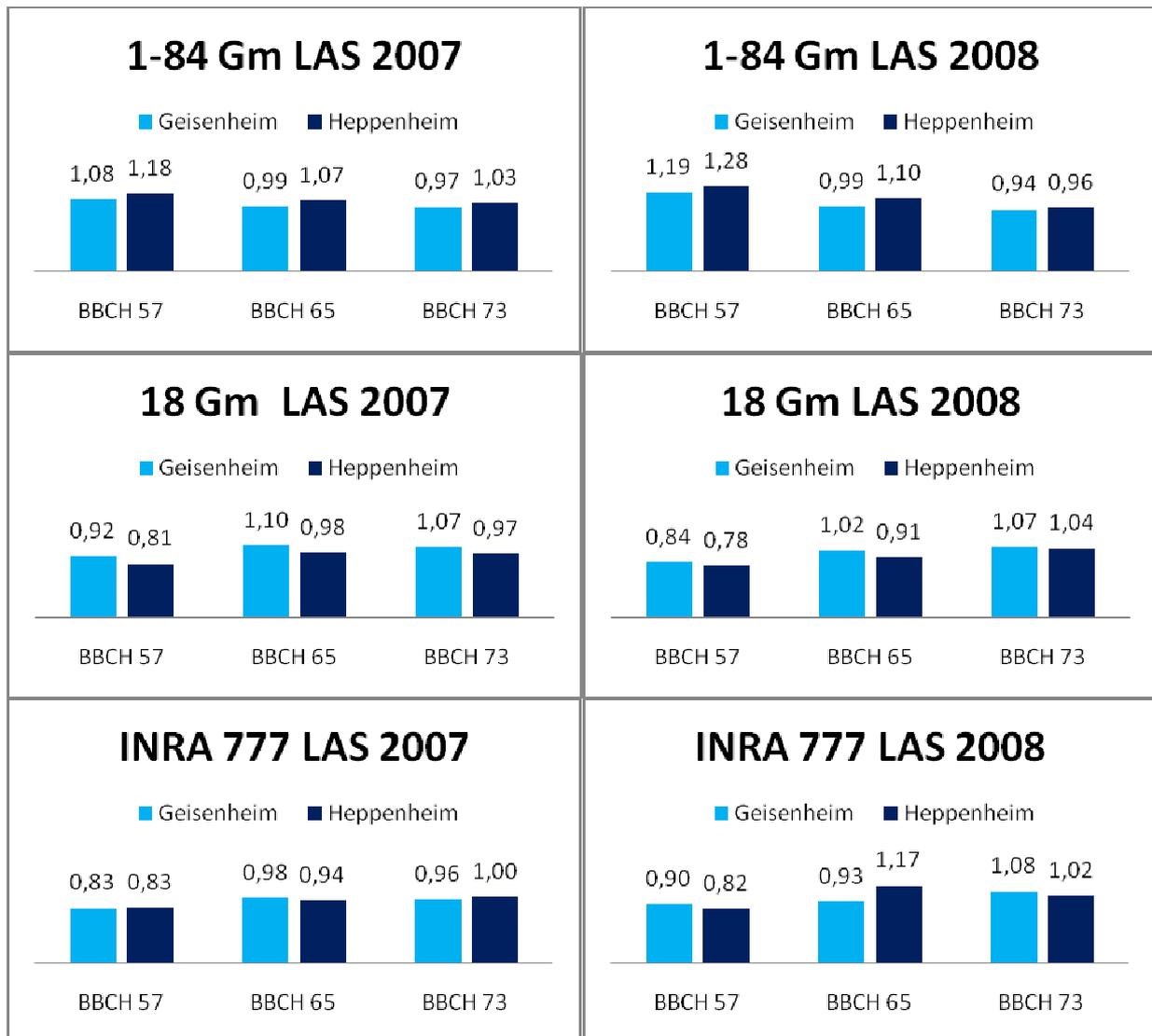
**Tabelle 10** : Darstellung der Ergebnisse der Kinetiken aus den Versuchsjahren 2007 und 2008. Grün dargestellt sind die Kandidatengene aus Arabidopsis, gelb das Kandidatengen aus Tomate. Lila steht für die beiden Kandidatengene aus den Microarray Hybridisierungen, deren Proteine als Transkriptionsfaktoren agieren und rot sind zwei Gene, deren kodierte molekulare Funktion noch nicht bekannt ist.

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

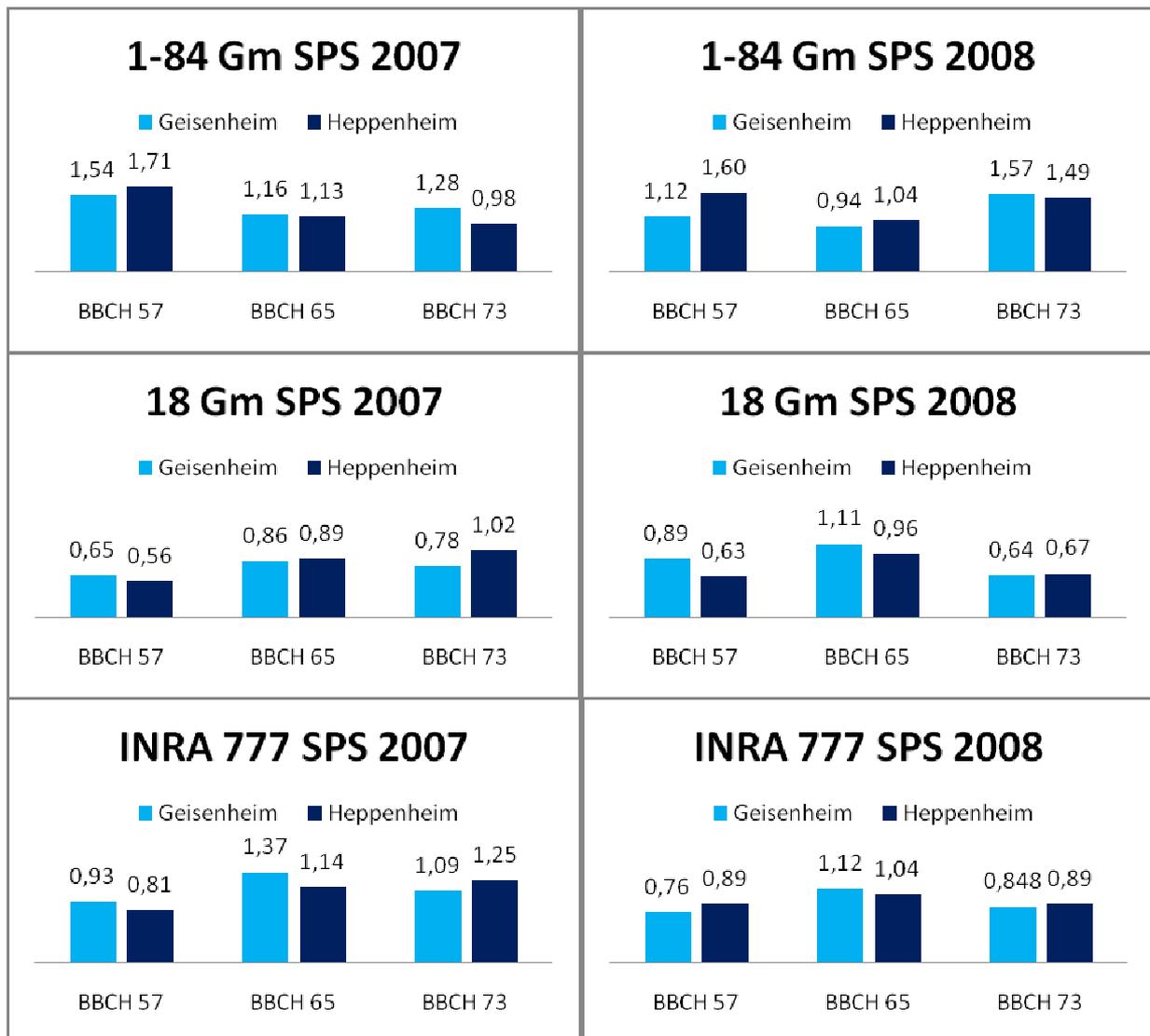
#### 3.1.4.8 Vergleich der Standorte Geisenheim und Heppenheim

Um die Frage zu klären, ob verschiedene Standorte, und damit unterschiedliche klimatische Bedingungen einen Einfluss auf die Expression der Kandidatengene haben, wurde von zwei verschiedenen Standorten, Geisenheim und Heppenheim, Pflanzenmaterial 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 Real Time PCR wurden für jedes Kandidatengen die Expressionswerte für die einzelnen Entwicklungsstadien in beiden Versuchsjahren für die beiden Standorte bestimmt. Diese Expressionswerte wurden mittels eines t – Testes für jeden Klon auf mögliche Signifikanz in der differentiellen Expression zwischen den beiden Standorten zu allen Entwicklungsstadien und zwischen den beiden Versuchsjahren getestet. Die Signifikanzschwelle liegt bei  $t = 0,05$ . In den folgenden Abbildungen sind die

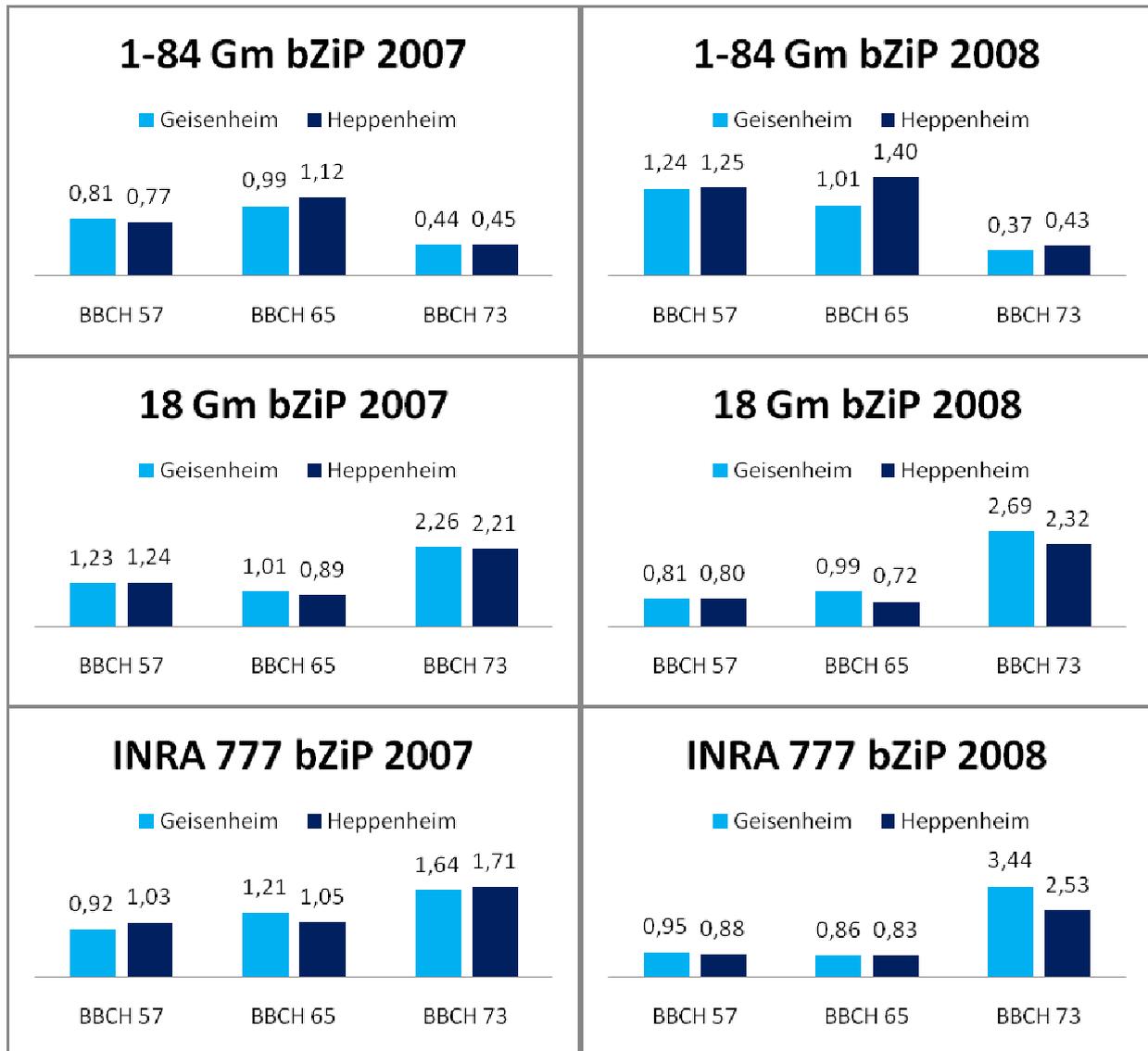
Expressionswerte graphisch dargestellt (Abbildung 61 bis 66). Alle t – Test Werte sind im Anhang aufgelistet.



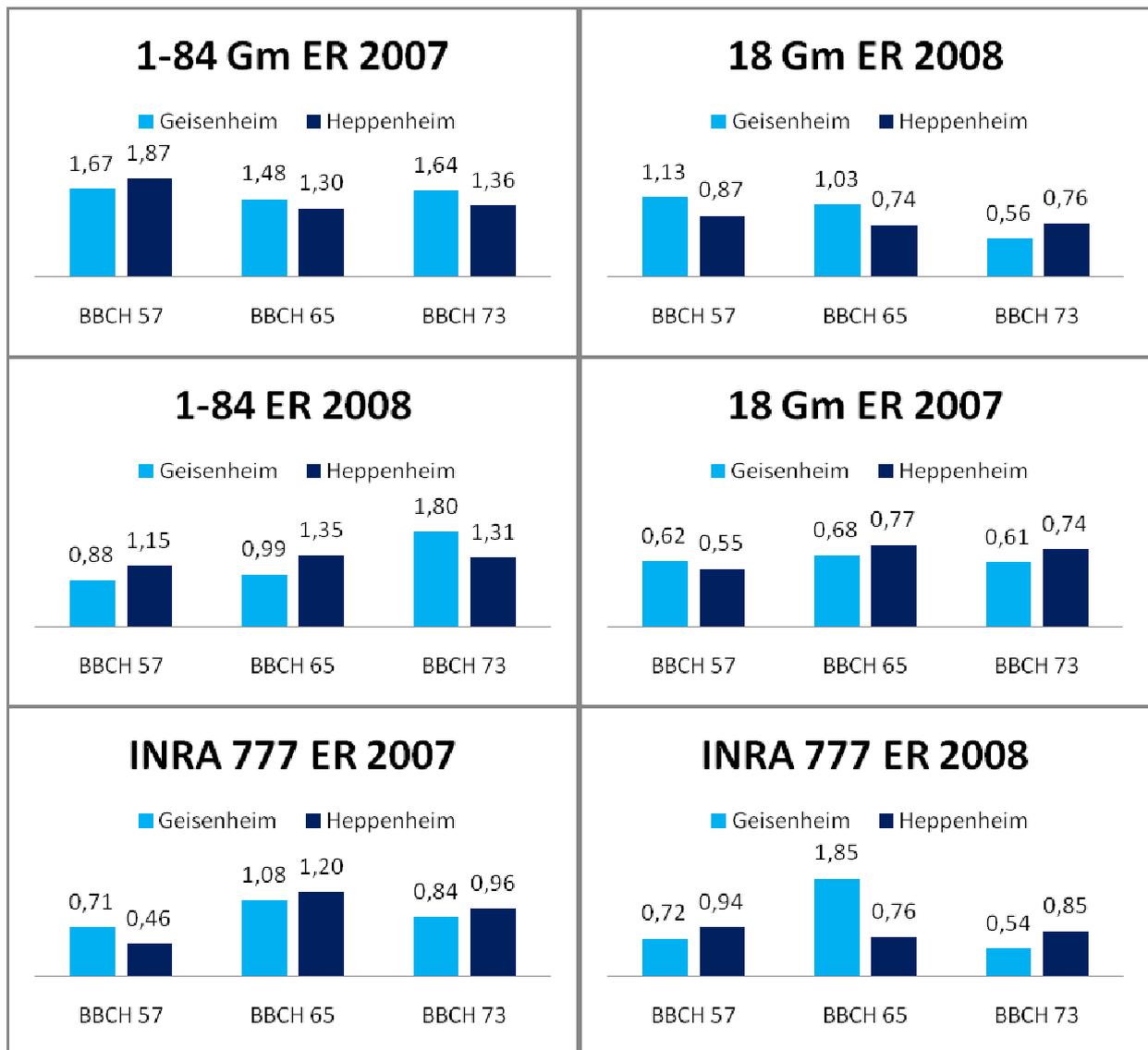
**Abbildung 61:** Expressionswerte für das Kandidatengen LAS aus Tomate für den lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und für die beiden kompakten Klone 18 Gm und INRA 777. Auf der linken Seite stehen die Werte für die drei Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 im Versuchsjahr 2007, auf der rechten die Werte für das Versuchsjahr 2008. Hellblau ist der Standort Geisenheim, dunkelblau der Standort Heppenheim. Im Vergleich der beiden Standorte konnte im Entwicklungsstadium BBCH 65 ( $t = 0,027$ ) im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm eine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden Standorten detektiert werden. Für die beiden anderen Entwicklungsstadien des Klons und in allen drei Entwicklungsstadien der beiden kompakten Klone 18 Gm und INRA 777 konnten keine signifikant differentielle Expression festgestellt werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 mit 2008 konnte in den drei Entwicklungsstadien aller Klone keine signifikant differentielle Expression festgestellt werden.



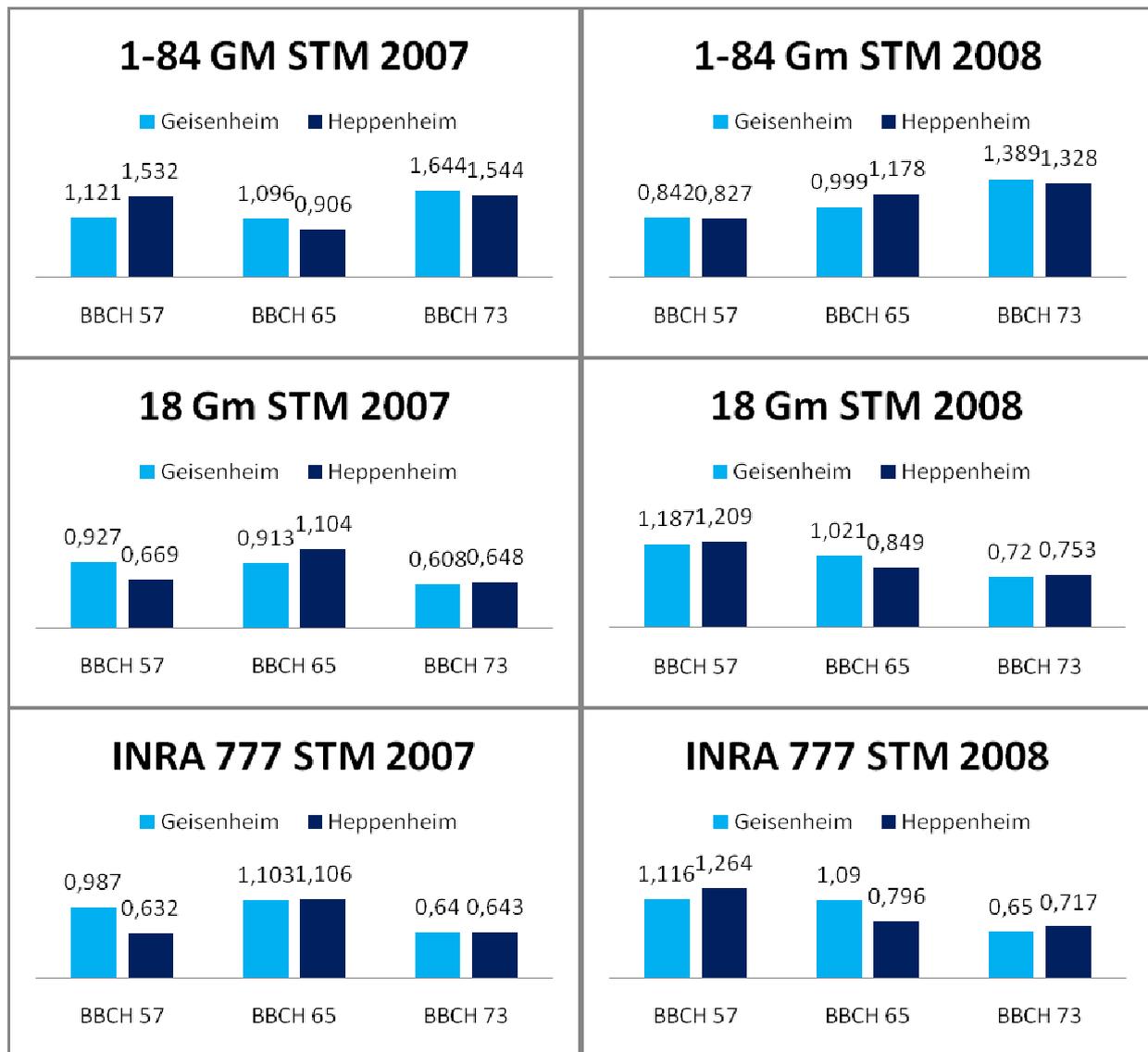
**Abbildung 62:** Expressionswerte für das Kandidatengen SPS aus Arabidopsis für den lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und für die beiden kompakten Klone 18 Gm und INRA 777. Im Vergleich der beiden Standorte konnte in keinem der drei Entwicklungsstadien aller Klone eine unterschiedliche Expression zwischen den beiden Standorten detektiert werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 mit 2008 konnte ebenfalls in den drei Entwicklungsstadien aller Klone keine unterschiedliche Expression festgestellt werden.



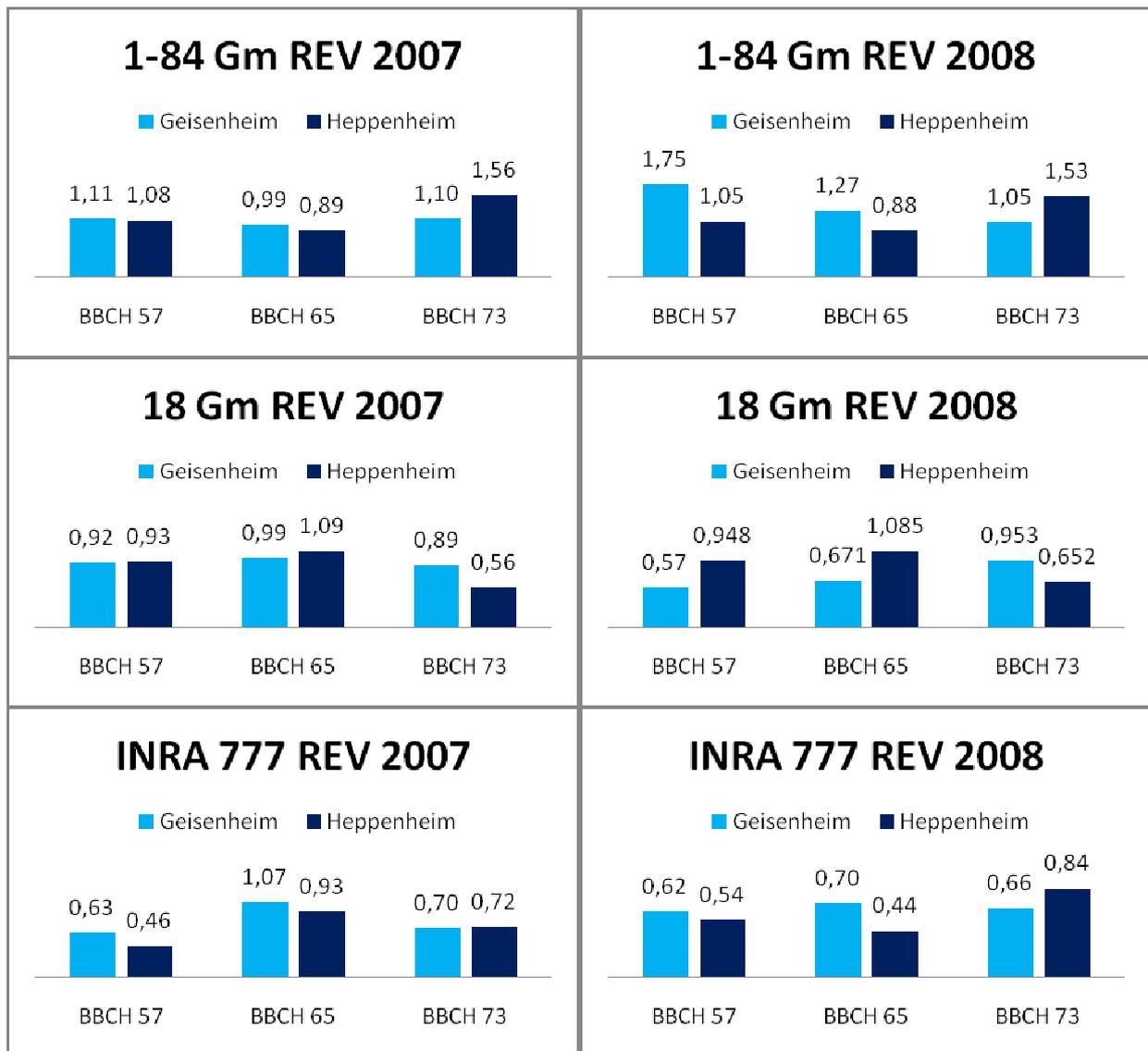
**Abbildung 63:** Expressionswerte für das Kandidatengen bZIP aus den Microarray Hybridisierungen für den lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und für die beiden kompakten Klone 18 Gm und INRA 777. Im Vergleich der beiden Standorte konnte in keinen der drei Entwicklungsstadien aller Klone eine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden Standorten detektiert werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 mit 2008 konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t = 0,002$ ) im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t = 0,0004$ ) im kompakten Klon 18 Gm detektiert werden. In den anderen Entwicklungsstadien der beiden Klone und im Klon INRA 777 konnte keine unterschiedliche Expression zwischen den beiden Versuchsjahren detektiert werden.



**Abbildung 64:** Expressionswerte für das Kandidatengen ER aus Arabidopsis für den lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und für die beiden kompakten Klonen 18 Gm und INRA 777. Zwischen den beiden Standorten gab es deutliche Expressionsunterschiede im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t = 0,046$ ) im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und eine signifikant differentielle Expression Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t = 0,032$ ) im kompakten Klon 18 Gm detektiert werden. In den anderen Entwicklungsstadien der beiden Klone und im Klon INRA 777 konnte keine signifikant differentielle Expression zwischen den beiden Standorten detektiert werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 mit 2008 konnte eine signifikante differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t = 0,46$ ) im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm detektiert werden. In den anderen Entwicklungsstadien des Klons und in den beiden kompakten Klonen 18 Gm und INRA 777 konnte keine unterschiedliche Expression zwischen den beiden Versuchsjahren detektiert werden.



**Abbildung 65:** Expressionswerte für das Kandidatengen STM aus Arabidopsis für den lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und für die beiden kompakten Klonen 18 Gm und INRA 777. Im Vergleich der beiden Standorte konnte in keinen der drei Entwicklungsstadien aller Klone eine unterschiedliche Expression zwischen den beiden Standorten detektiert werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 mit 2008 konnte in den drei Entwicklungsstadien aller Klone keine unterschiedliche Expression festgestellt werden.

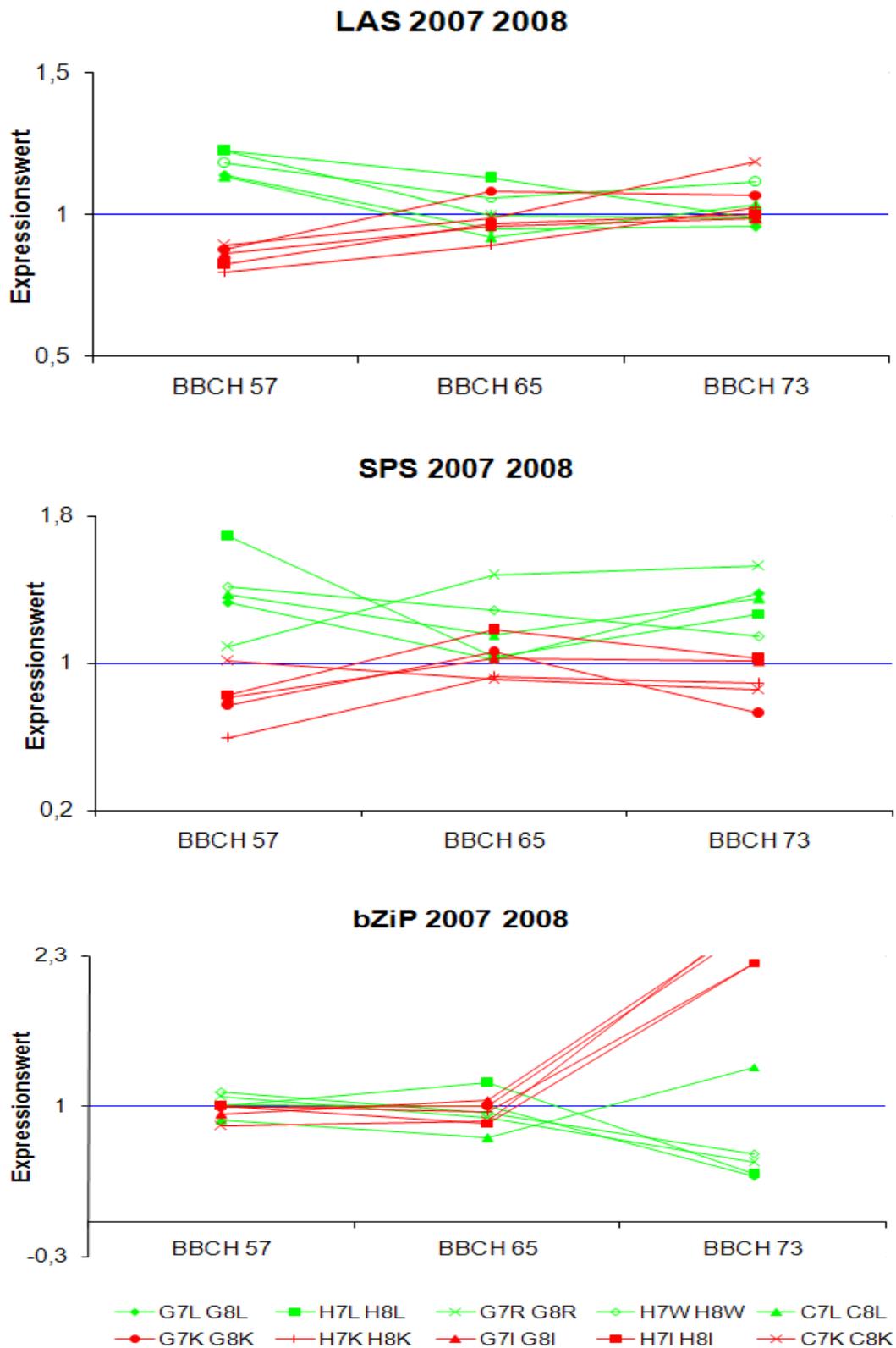


**Abbildung 66:** Expressionswerte für das Kandidatengen REV aus Arabidopsis für den lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und für die beiden kompakten Klone 18 Gm und INRA 777. Zwischen den beiden Standorten konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t = 0,004$ ) im lockerbeerigen Klon 1–84 Gm und eine signifikant differentielle Expression Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t = 0,030$ ) im kompakten Klon 18 Gm detektiert werden. In den anderen Entwicklungsstadien der beiden Klone und im Klon INRA 777 konnte keine unterschiedliche Expression zwischen den beiden Standorten detektiert werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 mit 2008 konnte in den drei Entwicklungsstadien aller Klone unterschiedliche Expression festgestellt werden.

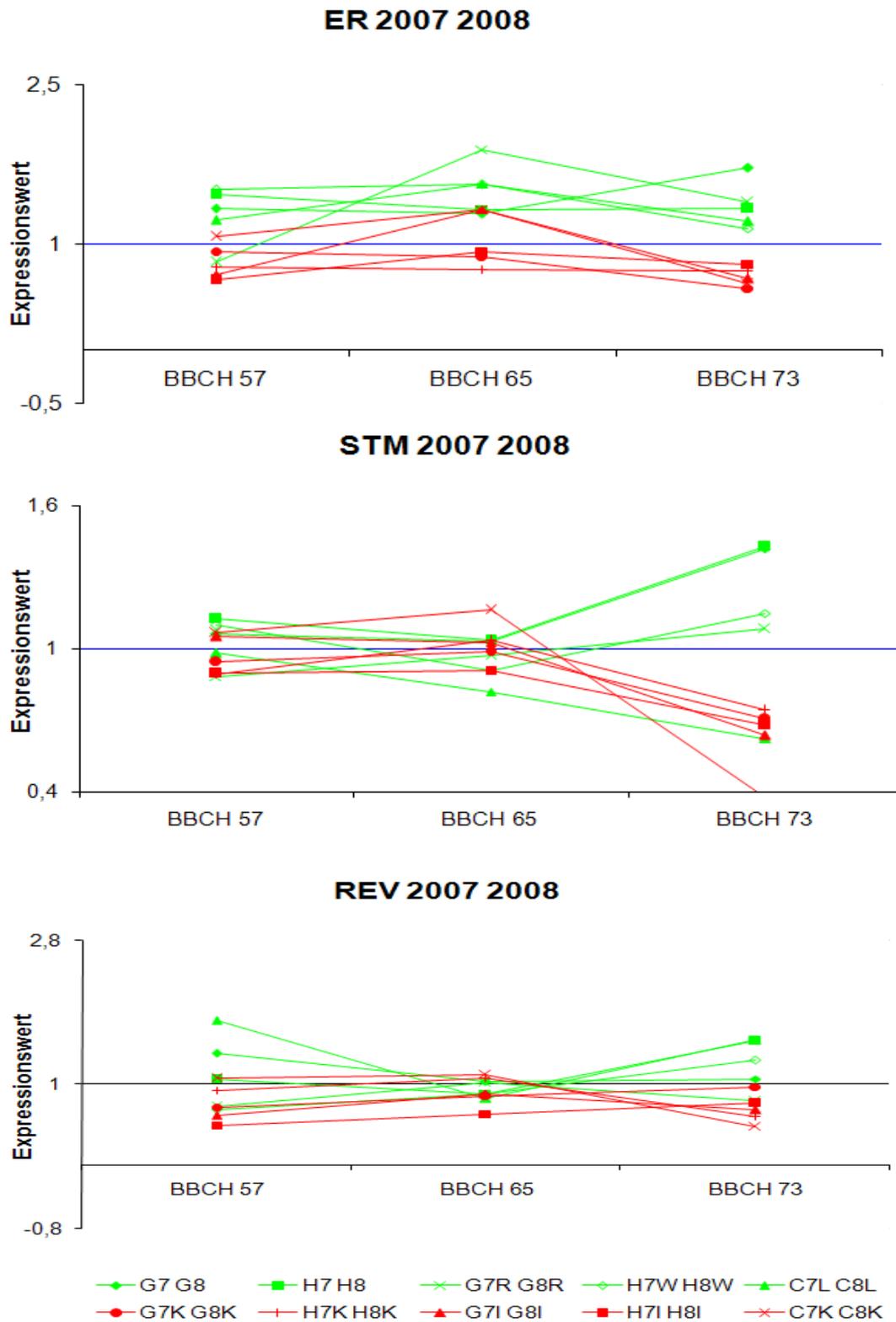
Im lockerbeerigen 'Spätburgunder'- Klon 1-84 Gm wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Standorten Geisenheim und Heppenheim in den drei Kandidatengenen ER BBCH 73 ( $t = 0,046$ ), LAS BBCH 65 ( $t = 0,027$ ) und REV BBCH 77 ( $t = 0,004$ ) gefunden. Zwischen den beiden Versuchsjahren 2007 und 2008 wurden in diesem Klon signifikante Unterschiede in den beiden Kandidatengenen ER BBCH 57 ( $t = 0,046$ ) und bZiP BBCH 57 ( $t = 0,002$ ) gefunden. Im kompakten 'Spätburgunder'- Klon 18 Gm wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Standorten Geisenheim und Heppenheim in den zwei Kandidatengenen ER BBCH 73 ( $t = 0,032$ ) und REV BBCH 77 ( $t = 0,030$ ) gefunden. Zwischen den beiden Versuchsjahren 2007 und 2008 wurden in diesem Klon signifikante Unterschiede im Kandidatengen bZiP BBCH 57 ( $t = 0,0004$ ) gefunden. Für den kompakten 'Spätburgunder'- Klon INRA 777 konnten für alle Kandidatengene keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Standorten Geisenheim und Heppenheim und den beiden Versuchsjahren detektiert werden. Insgesamt konnten in den drei Kandidatengenen SPS, STM und bZiP in allen drei Klonen keine Unterschiede zwischen den beiden Standorten gefunden werden. Im Vergleich der beiden Versuchsjahre konnten keine signifikanten Unterschiede in den Kandidatengenen STM, SPS, LAS und REV gefunden werden.

#### **3.1.4.9 Vergleich der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008**

Nachdem die Ergebnisse der drei 'Spätburgunder'- Klone für beide Standorte und Jahre auf eine mögliche signifikant differentielle Expression untersucht worden waren, war der nächste Schritt die Ergebnisse der beiden Gruppen, kompakte Klone und lockerbeerige Klone aus den Versuchsjahre 2007 und 2008 miteinander zu vergleichen. Ziel dieses Vergleiches war es, die Kandidatengene zu identifizieren, die eine signifikant differentielle Expression zwischen den kompakten und lockerbeerigen Klonen zu mindestens einem Entwicklungsstadium aufweisen. In den folgenden Abbildungen sind die sechs Kandidatengene, die in den Versuchsjahre 2007 und 2008 zu mindestens einem Entwicklungsstadium signifikant differentiell exprimiert waren, als Verrechnung von 2007 mit 2008 dargestellt.



**Abbildung 67:** Ergebnisse der Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008 für die Kandidatengene LAS, SPS und bZiP. Bei SPS sind in zwei Entwicklungszeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klongruppen festzustellen. Bei LAS und bZiP konnte in einem Entwicklungszeitpunkt eine signifikante Genaktivität zwischen den kompakt und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.



**Abbildung 68:** Ergebnisse der Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008 für die Kandidatengene ER, STM und REV. In allen Genen konnte zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt eine signifikant differentielle Genexpression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.

Nach Verrechnung der beiden Versuchsjahre 2007 und 2008 konnten bei allen sechs Genen zu mindestens einem Entwicklungsstadium eine signifikant differentielle Genexpression zwischen den beiden Gruppen der Klone detektiert werden. Für das Entwicklungsstadium BBCH 57 konnte für die Gene LAS ( $t = 0,000002$ ), SPS ( $t = 0,001$ ) und ER ( $t = 0,015$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den lockeren und den kompakten Klonen aufgezeigt werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 65 konnte im Gen ER ( $t = 0,017$ ) ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Im Entwicklungsstadium BBCH 73 konnten signifikante Unterschiede in der Genaktivität zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen SPS ( $t = 0,008$ ), bZiP ( $t = 0,00002$ ), ER ( $t = 0,0002$ ), STM ( $t = 0,012$ ) und REV ( $t = 0,01$ ) festgestellt werden.

### **Zwischenfazit**

Es kann aus diesen Ergebnissen festgestellt werden, dass Unterschiede in der Genexpression der sechs Kandidatengene zwischen den beiden Gruppen, der kompakten und lockerbeerigen Klone stabil in zwei Versuchsjahren zu detektieren sind. Mit den Ergebnissen aus den Vergleichen der beiden Standorte Geisenheim und Heppenheim ließ sich absichern, dass die Unterschiede in der Genexpression nicht Standort – oder Jahres – abhängig sind.

### **3.1.5 Sequenzierung**

#### **3.1.5.1 Bestimmung der möglichen Promotorenbereiche**

Da die Genexpression durch Promotorenbereiche und regulatorische Bereiche gesteuert wird, war der logische nächste Schritt die Bestimmung und die Sequenzierung der Promotorenbereiche. Für die sechs Kandidatengen, LAS, SPS, bZiP, ER, STM und REV wurde mit der Software VectorNTI (Invitrogen, Karlsruhe) *in silico* der mögliche Promotorbereich bestimmt. Mit diesem Programm ist es möglich, eine Vorhersage für die Position der 5'-UTR („Untranslated Region“) und des Promotorbereichs zu erhalten. Für den möglichen Promotorbereich jedes Kandidatengenes wurde ein flankierendes Oligonukleotidpaar entwickelt. Wenn es möglich war, wurde darauf geachtet, dass ein Oligonukleotid in der codierenden Sequenz des Genes lag und die Gesamtlänge des amplifizierten DNA – Fragmentes 1000 bp nicht überschritt. Die Promotorenbereiche der sechs Kandidatengene wurden im erstellten Satz 'Lockerbeerigkeit' an Rebsorten und Klonen (siehe Kapitel 2.1.2) mittels PCR

amplifiziert. Die DNA – Fragmente wurden anschließend im Auftrag von GATC (Koblenz) direkt sequenziert.

### 3.1.5.2 Ergebnisse PCR – Produkt Sequenzierung

Bei vier der sechs Promotorenbereiche konnte eine eindeutige Sequenz für die sequenzierten DNA – Fragmente gelesen werden. Bei den Kandidatengenen bZiP und LAS konnte das DNA – Fragment nicht erfolgreich direkt sequenziert werden, weil sich zwei Sequenzen überlagerten, was auf deutlich ausgeprägte Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen hindeutet. In Abbildung 69 ist 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. Über alle erhaltenen Sequenzen konnten zwei deutliche SNP („Single Nucleotide Polymorphism“) detektiert werden. An Position 246 war ein Basenaustausch zwischen den lockeren und den kompakten Klonen deutlich. Alle lockerbeerigen Klone besitzen an dieser Stelle in der Sequenz die Base Thymin, die kompakten Klone die Base Cytosin.

```

201
1-84 Gm Gm (201) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
1-84 Gm Hm (201) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
M242 Hm (201) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
1-30 Gm Gm (163) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
1-45 Gm Gm (154) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
18 Gm Gm (82) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
18 Gm Hm (94) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
INRA 777 Gm (98) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA
54 Gm Gm (96) CCGACTGGAGGTGATCTTCTCATGTTGCTGGCCCTATAGATCCATCTCTGGAGAAAACACCAGTTGAAAATATCCACTGAAGCCAAGTGTCACTTGTCCA

301
1-84 Gm Gm (301) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
1-84 Gm Hm (301) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
M242 Hm (301) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
1-30 Gm Gm (263) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
1-45 Gm Gm (254) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
18 Gm Gm (182) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
18 Gm Hm (194) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
INRA 777 Gm (198) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA
54 Gm Gm (196) CGGAAGTTCGAGCACCAGCATACCCCGATTGGTGGTTTGGAAATATAGGTTTGAAGAGTTTGATGGGTGTGCAAGGTGTAGACATGGGGCATTAATAGCAA

```

**Abbildung 69:** Ausschnitt aus der Sequenz des möglichen Promotorbereiches des Kandidatengens SPS. Grün dargestellt sind die lockerbeerigen Klone, rot die kompakten Klone. Ein deutlich SNP besteht zwischen den lockeren und den kompakten Klonen an Position 246. Der zweite SNP an Position 393 differenziert die lockeren von den kompakten Klonen.

Ein zweiter SNP an Position 393 unterscheidet nicht zwischen den lockeren und den kompakten Klonen. Es konnten noch zwei weitere SNPs in der Sequenz identifiziert werden. An Position 632 besitzen alle lockerbeerigen Klone die Base

Thymin, die kompakten Klone die Base Adenin. Der SNP an Position 808 unterscheidet wie der SNP an Position 393 nicht zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen. In der folgenden Tabelle 11 sind alle SNPs aufgelistet, die in den vier Arabidopsis Kandidatengenen, SPS, STM, ER und REV identifiziert werden konnten. Insgesamt wurden in den Sequenzen der vier Kandidatengene 14 SNPs gefunden. Die SNP – Frequenz in den einzelnen Sequenzen liegt zwischen 1/200 bp (STM) und 1/500 bp (ER). Man kann des Weiteren die SNPs in zwei Gruppen einteilen, in SNPs, die eindeutig mit den beiden Klengruppen assoziiert sind, und in die SNPs, die nicht zwischen den beiden Gruppen differenzieren. Beige sind die SNPs markiert, die mit einem eindeutigen Unterschied zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen gekoppelt erscheinen.

**Tabelle 11:** SNPs in den möglichen Promotorsequenzen der der Gene aus *Vitis vinifera* die Homologien zu den aus Arabidopsis abgeleiteten Kandidatengene SPS, ER, STM und REV zeigten.

	SPS	ER	STM	REV
<b>SNP1</b>	T/C	_/C	A/C	C/T
<b>Position</b>	246	187	183	241
<b>SNP2</b>	G/A	_/A	A/_	_/T
<b>Position</b>	393	188	193	487
<b>SNP3</b>	T/A		C/_	C/T
<b>Position</b>	632		194	592
<b>SNP4</b>	G/A		G/A/R	
<b>Position</b>	808		670	
<b>SNP5</b>			A/W/T	
<b>Position</b>			694	

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 70 ist derselbe Abschnitt des möglichen Promotobereichs des Arabidopsis Kandidatengens SPS für diesen kleineren Probensatz abgebildet. Neben den oben bereits beschriebenen SNPs, konnte in diesem Teil der Sequenz ein weiterer SNP (Position 201) gefunden werden. Insgesamt waren nun sechs SNPs in der mutmaßliche Promotorsequenz

aufzufinden. An Position 201 besitzen die drei Sorten `Räuschling`, `Silvaner` und `Grauburgunder` ein Thymin anstelle eines Cytosins und an Position 401 besitzen `Räuschling` und `Silvaner` ein Guanin anstelle eines Adenins. Im Satz `Pinot` wurden insgesamt in allen vier Promotorenbereiche zehn weitere SNPs gefunden. Es konnten aber keine weiteren eindeutigen SNPs gefunden werden, die zwischen locker und kompakt unterscheiden (siehe Anhang).

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

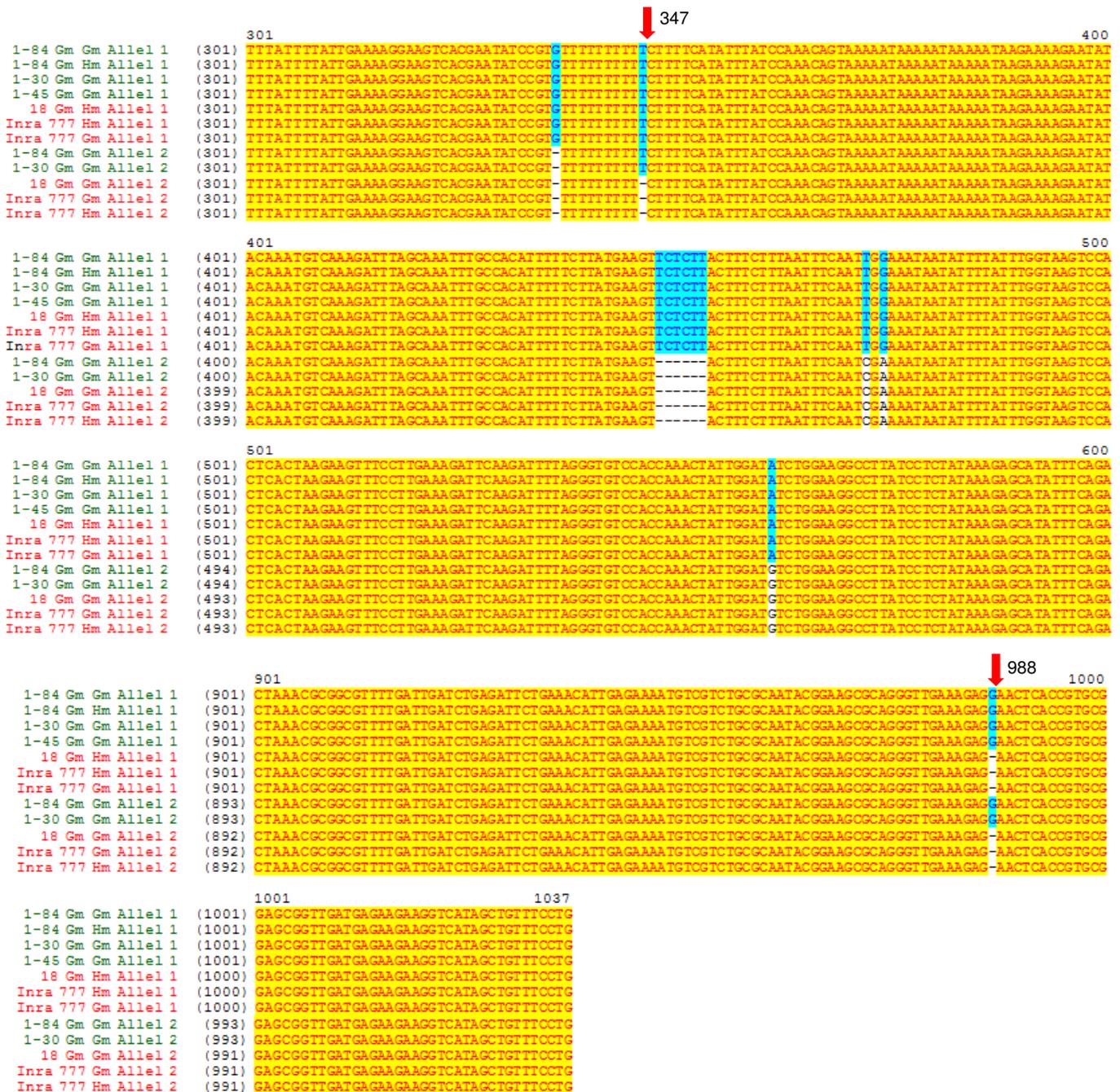
**Abbildung 70:** Ausschnitt aus der Sequenz des mutmaßlichen Promotorbereiches des Kandidatengens SPS für den Probensatz `Pinot`. Grün markiert sind die lockerbeerigen Klone und Sorten, lila die intermediären Sorten und rot die kompakten Klone und Sorten. Neben den bereits zuvor identifizierten SNPs an Position 246 und 393 wurde ein weiterer SNP an Position 201 gefunden werden.

Im Vergleich der Sequenzen über den ganzen Probensatz zur Repräsentation unterschiedlicher Ausprägung der Lockerbeerigkeit sahen die Ergebnisse ähnlich aus wie im Probensatz `Pinot`. Es konnten zusätzliche SNPs in gefunden werden, die aber nicht zwischen kompakt und locker zu differenzieren scheinen.

### 3.1.5.3 Ergebnisse der Sequenzierung nach klonierter allelischer Varianten

Für die Kandidatengene bZiP und LAS konnte das PCR – Amplifikat nicht erfolgreich direkt sequenziert werden. Dies deutet auf eine ausgeprägte Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen hin. Aus diesem Grund wurden die PCR – Produkte unter Verwendung des Klonierungskits „TOPO TA Cloning® for Sequencing“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) kloniert. Anschließend wurden die Insert – haltigen Klone im Auftrag von GATC (Konstanz) sequenziert. Für beide

Kandidatengene konnten beide Allele analysiert werden. Beim Kandidatengen bZiP wurden im Vergleich der Allele zwei Deletionen detektiert (Abbildung 71). Diese Differenzen eindeutig die beiden Allele der kompakten Klone von den beiden Allelen der lockerbeerigen Klone. Beim Kandidatengen LAS konnten keine Unterschiede in den allelischen Sequenzen zwischen den beiden Klongruppen gefunden werden.



**Abbildung 71:** Sequenzausschnitt des angenehmen Promotorbereiches des Kandidatengen bZiP im Probenatz über den der lockerbeerigen Klone (grün) im Vergleich zu den kompakten Klonen (rot). An Position 347 ist eine Deletion im Allel 2 der kompakten Klone zu finden. An Position 988 ist eine Deletion in beiden Allelen der kompakten Klone zu beobachten.

### 3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Durch die Untersuchungen der phänologischen und genetischen Daten der Klone vom 'Blauen Spätburgunder' und 'Chardonnay' konnten eindeutige Unterschiede innerhalb der Rebsorte gefunden werden. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Entwicklungsstadien der Gescheine und die Architektur der sich im folgenden über die Vegetationsperiode entwickelnden Traubenstrukturen.

Der wichtigste Aspekt dieses Projektes war die molekulare Untersuchung der Lockerbeerigkeit, welche ein morphologisches Merkmal des Fruchtstandes ist, und die Dichte der Traube beschreibt. Ein lockerer Gerüstaufbau der Traube ist ein wichtiges Ziel in der Rebenzüchtung, um Abquetschungen der Beeren zu verhindern. Durch einen lockereren Aufbau der Trauben können diese schneller abtrocknen, da sie besser durchlüftet werden können. Dadurch kann eine erhöhte Qualität und Quantität des Lesegutes erreicht werden, da für Pathogene, wie z.B. *Botrytis* keine optimalen Bedingungen gegeben sind. Lockerbeerige Klone zeigen einen deutlich verringerten Befall von *Botrytis*.

Vom Projektpartner P1 wurde das Pflanzenmaterial für die Analysen zur Verfügung gestellt. Im ersten Projektjahr konzentrierten sich die Untersuchungen auf zwei Klone, die bekanntermaßen unterschiedliche Traubenstrukturen ausbilden. Durch intensive molekulare Untersuchungen an diesen beiden Klonen konnten einige Kandidatengene identifiziert werden, die möglicherweise die Architektur der Trauben beeinflussen. In Absprache mit P1 wurden für die beiden Folgejahre weitere Klone ausgewählt, die sich durch die durchgeführten Bonituren von P1 besonders interessant im Bezug auf die Lockerbeerigkeit erwiesen. An diesen wurden die besten Kandidatengene getestet. Insgesamt konnten die vier Kandidatengene bZIP, SUERSHOOT, ERECTA und SHOOT MERISTEMLESS identifiziert werden, die sich zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen sowohl in ihrer Genexpression als auch in den Sequenzen der möglichen Promotorenbereiche unterscheiden.

#### 3.2.1 Anwendung der Ergebnisse

Auf Basis der hier identifizierten Sequenzunterschiede könnten molekulare Marker für das Merkmal Lockerbeerigkeit entwickelt werden. Hierfür müssten flankierende Oligonukleotide um die differenzierenden SNPs gelegt werden.

Anschließend könnten die mittels PCR amplifizierten PCR – Produkte auf Längenpolymorphismen untersucht werden. Um zu klären, ob die vier Kandidatengene tatsächlich die Architektur der Trauben beeinflussen, könnte in Transformationsversuchen der Einfluss dieser Kandidatengen auf die Lockerbeerigkeit untersucht werden. Ziel wäre es hierbei, die Allele, die in den lockerbeerigen Klonen gefunden werden konnten, in kompakte Klone zu transferieren und überexprimieren, um einen möglichen Effekt auf die Traubenstruktur zu untersuchen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in diesem Projekt eingesetzten Methoden (Microarray Hybridisierungen und quantitative Real Time PCR) dazu geeignet sind, molekulare Unterschiede in Klonmaterial zu detektieren. Mittels dieser Methoden sollte es möglich sein, Informationen über die genetische Variation für interessante Merkmale zu erlangen, und somit bei der Selektion von Reben aus genetischen Ressourcen gezielt Klone mit solchen Merkmalen auswählen, die noch nicht in einem Klonsortiment vorhanden sind. Da es sehr zeit – und kostenintensiv ist, genetisches Material zu erhalten, wäre es möglich mit diesen Methoden, interessantes Material von uninteressantem Material zu unterscheiden. Somit könnte für die Nachwelt nur einzigartiges genetisches Material erhalten werden.

## 4 Zusammenfassung

### 4.1 Versuchsjahr 2006

Mit der Bearbeitung des Teilprojektes 04HS023 „Analyse der Gen-Expression mittels Profilingtechniken“ wurde zum 01.01.2006 begonnen. Da das Pflanzenmaterial abhängig von der Vegetationsperiode erst vollständig Mitte August zur Verfügung stand, konnten die Optimierung und Etablierung der RNA – Extraktionsmethode erst nach der letzten Probennahme abgeschlossen werden. Die RNA – Proben wurden in Genexpressionsstudien mit Hilfe der Hybridisierung auf Affymetrix GeneChip® *Vitis vinifera* Genome Array im Auftrag beim RZPD in Berlin untersucht. Auf dem GeneChip® *Vitis vinifera* von Affymetrix sind 14,000 Transkripte von *V. vinifera* und 1,700 Transkripte von anderen *Vitis* Arten gespottet.

Insgesamt wurden Genexpressionsanalysen bei vier verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. Zu den drei Stadien BBCH 57, 73 und 71 wurde die Genexpression der beiden `Spätburgunder´– Klone 18 Gm und 1–84 Gm miteinander verglichen, zum Stadium BBCH 65, d.h. zur Vollblüte, wurden die beiden `Spätburgunder´– Klone zusätzlich mit der Tafeltraube `Cardinal´ verglichen.

### 4.2 Versuchsjahr 2007

Nach Auswertung der Microarray Hybridisierungen wurden ausgewählte differentiell exprimierte Gene durch quantitative Real Time PCR validiert. Diese wurde mit dem 7500 Fast Real Time PCR System von Applied Biosystems durchgeführt. Zusätzlich zu den Kandidatengenen der Microarray Hybridisierung wurden Kandidatengene von anderen Pflanzen, die in ihrer Funktion Merkmale, die ähnlich der Lockerbeerigkeit bei der Weintraube sind, beeinflussen, mit quantitativer Real Time PCR an den `Spätburgunder´– Klonen getestet. Die Ergebnisse der Microarray Hybridisierung konnten bestätigt werden. Zusätzlich konnten Unterschiede in der Genexpression der Kandidatengene aus der Literatur zwischen den beiden `Spätburgunder´– Klonen detektiert werden.

Für 35 Kandidatengene wurden Kinetiken ihres Expressionsmusters erstellt, um genauere Informationen über das Expressionsverhalten der einzelnen Gene über die Vegetationsperiode hinweg zu erlangen. Hierfür wurden die Genexpression jedes Genes in sechs Entwicklungsstadien zwischen den beiden 'Spätburgunder'-Klonen 1–84 Gm und 18 Gm untersucht. Nach Auswertung aller Ergebnisse wurden neun Kandidatengene für die weiteren Untersuchungen ausgesucht. Diese zeigten die größten Unterschiede in ihrem Expressionsverhalten zwischen den beiden Klonen.

In der Vegetationsperiode 2007 wurde Probenmaterial von fünf kompakten und fünf lockerbeerigen Klonen an den Standorten Geisenheim und Heppenheim zu den Entwicklungsstadien BBCH 57, BBCH 65 und BBCH 73 gesammelt. In diesem Material konnten bei sieben Kandidatengenen eine differentielle Expression in mindestens einem Entwicklungsstadium zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.

### **4.3 Versuchsjahr 2008**

Im dritten Versuchsjahr wurde wiederum Pflanzenmaterial von denselben fünf kompakten und den fünf lockerbeerigen Klonen an den zwei Standorten Geisenheim und Heppenheim zu den selben Entwicklungsstadien gesammelt. In den sechs Kandidatengenen bZip, SPS, STM, ER, LAS und REV konnten die Ergebnisse aus dem Versuchsjahr 2007 bestätigt werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die differentielle Genexpression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen stabil waren, und nicht wesentlich durch den Standort oder durch das Versuchsjahr beeinflusst wurden.

Nach Auswertung aller qRT PCR Ergebnisse, wurden die 5'-UTR („Untranslated Region“) und der vermuteten Promotorbereiche dieser sechs Kandidatengene *in silico* ermittelt. Für diese Bereiche wurden spezifische Oligonukleotide entwickelt, um den vermuteten möglichen Promotorbereich zu amplifizieren. Die PCR – Produkte wurden direkt sequenziert.

Für die diese Sequenzierung wurde ein Probensatz zusammengestellt, der neben den kompakten und den lockerbeerigen Klonen, die in den Genexpressionsanalysen untersucht worden waren, weitere „kompakte“, „intermediäre“ und „lockerbeerige“ Rebsorten enthält. Die amplifizierten DNA –

Fragmente wurden für alle 32 Rebklone und Rebsorten von GATC (Konstanz) direkt sequenziert. Bei den vier Kandidatengen SPS, STM, ER und REV konnten die DNA – Fragmente erfolgreich sequenziert werden. Nach Auswertung der Sequenzen konnten in den drei Kandidatengen SPS, ER und STM SNPs gefunden werden, die sich zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen differenzieren.

Die Promotorbereiche der beiden Kandidatengene bZIP und LAS, die nicht erfolgreich direkt sequenziert werden konnten, wurden kloniert und anschließend erneut sequenziert. Für beide Promotorenbereiche konnten beide Allele erfolgreich identifiziert werden. In den beiden Allelen des Kandidatengens bZIP konnten zwei Deletionen identifiziert werden, die die beiden Allele der kompakten Klone von den beiden Allelen der lockerbeerigen Klone eindeutig unterscheiden. Beim Kandidatengen LAS konnten keine Unterschiede in den beiden Allelen zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen detektiert werden.

#### **4.4 Zusammenfassung Gesamtergebnisse**

Zuerst wurde erfolgreich eine geeignete RNA – Extraktionsmethode entwickelt. In den anschließenden Microarray Hybridisierungen konnten die differentiell exprimierten Gene zwischen den beiden `Spätburgunder` – Klonen 1–84 Gm und 18 Gm erfasst werden. Da das Hauptaugenmerk auf das Merkmal Lockerbeerigkeit im Vergleich der kompakten Struktur der Trauben bei `Spätburgunder` gelegt wurde, wurden dementsprechend Kandidatengene aus den Microarray Hybridisierungen und der Literatur ausgewählt, die das Merkmal "Lockerbeerigkeit" beeinflussen könnten. Diese wurden mittels quantitativer Real Time PCR Experimente genauer untersucht. Insgesamt konnten bei den sechs Kandidatengen bZIP, SUPERSHOOT, LATERAL SUPPRESSOR, ERECTA, SHOOT MERSYSTEMLESS und REVOLUTA, ein stabile differentielle Genexpression zwischen den kompakten und den lockerbeerigen Klonen gefunden werden, die unabhängig von Standort und Jahr war.

Für diese sechs Kandidatengene wurde der mögliche Promotorbereich *in silico* bestimmt. Es wurden flankierende Primer für diese Bereich entwickelt, und das amplifizierte PCR – Produkt wurde direkt sequenziert. Die Promotorbereiche der Kandidatengene bZiP und Las wurden kloniert, da es nicht möglich war, das PCR – Produkt erfolgreich direkt zu sequenzieren. Für beide Gene konnten erfolgreich zwei Allele sequenziert werden.

In den Kandidatengenen SPS, ER und STM konnten in den vermuteten Promotorbereichen Sequenzunterschiede gefunden werden, die die kompakten Klone von den lockerbeerigen Klonen klar unterscheiden. Für diese werden noch flankierende Primerpaare entwickelt, um diese als molekularen Marker einsetzen zu können.

In den beiden Allelen des Kandidatengens bZiP konnten in den kompakten Klonen zwei Deletionen erfasst werden. Diese unterscheiden die kompakten Klone eindeutig von den lockerbeerigen Klonen. Auch für diese beiden Deletionen sollen flankierende Primerpaare entwickelt werden, um an Hand der Längenpolymorphismen die getesteten Allele klar kompakt oder lockerbeerig zuordnen zu können.

## 5 Gegenüberstellung geplanter und tatsächlich erreichter Ziele

Hauptziel des Teilprojektes 04HS023 war es, an ausgewählten Klonen vom `Blauen Spätburgunder` Untersuchungen zur Genexpression mittels geeigneter Profilingtechniken (z.B.: Microarray Analyse, quantitativer Real Time PCR) durchzuführen. Das Hauptaugenmerk lag auf dem Merkmal Lockerbeerigkeit / kompakte Struktur der Trauben bei `Spätburgunder`.

Vom Projektpartner P1 wurde Pflanzenmaterial für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Durch die Zusammenarbeit mit P1 war die exakte Bestimmung der Probennahmezeitpunkte zur Sammlung optimalen Probenmaterials möglich.

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 der möglichen Promotorsequenz dieser vier Gene konnten eindeutige Sequenzunterschiede zwischen kompakten und lockerbeerigen Klonen gefunden werden. Die hier dargestellten Ergebnissen des Projektes können als Grundlage zur Entwicklung molekularer Marker für Lockerbeerigkeit genutzt werden.

Es konnte im Projekt eindeutig gezeigt werden, dass ein gewisses Maß an genetischer Diversität innerhalb einer Sorte vorhanden ist. Mit den Methoden der Microarray Hybridisierungen und der qRT PCR konnten eindeutige Unterschiede in der Genexpression einzelner Gene nachgewiesen werden. Ebenso konnten Sequenzunterschiede in den vermuteten Promotorbereichen ausgewählter Gene gefunden 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.

## 6 Literaturverzeichnis

**Becker, H.; Sievers, E. (1978):** Leistungssteigerung durch Klonenselektion. Die Geisenheimer Riesling-Klone. Anbauwert und Leistung. Der Deutsche Weinbau. 33, 1092-1095.

**Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (2001):** Entwicklungsstadienmono- und dikotyle Pflanzen – BBCH Monografie, 2. Auflage [www.bba.bund.de](http://www.bba.bund.de)

**Bouchez, D and Höfte, H (1998):** Functional Genomics in Plant. Plant Physiol. 118, 725-732

**Chang, S.; Puryear, J. and Cairney, J. (1993):** A simple method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol Biol Rep 11: 113-116

**Cirami, R.M. (1993):** Clonal selection of Chardonnay grapevines. Australian Grapegrower & Winemaker. (52), 61, 63-65, 67.

**Cirami, R.M.; MacCarthy, M.G.; Furkaliev, D.G.J. (1984):** Pinot noir – clones suitable for champagne or red wine styles. Australian Grapegrower & Winemaker. (251), 16-17.

**Cirami, R.M.; MacCarthy, M.G.; Furkaliev, D.G.J. (1985):** Clonal selection and comparison in South Australia. Australian Grapegrower & Winemaker. (262), 18-19.

**Cirami, R.M.; MacCarthy, M.G.; Furkaliev, D.G.J. (1993):** Clonal selection and evaluation to improve production of Cabernet Sauvignon grapevines in South Australia. Australian Journal of Experimental Agriculture. 33, 213-220.

**Credi, R.; Babini, A.R. (1997):** Effects of virus and virus-like infections on growth, yield, and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 48 (1), 7-12

**Desprez, T.; Amselem, J.; Caboche, M. and Höfte, H (1998):** Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *P. Journal* 14, 643-652

**Forneck, A.; Konradi, J.; Blaich, R. (2003):** Über die genetische Diversität der Burgunderreben und ihrer Klone. *Deutsches Weinbaujahrbuch 2004*. Ulmer Verlag. 54, 71-78

**Iandolino, A.B.; Goes da Silva, F.; Lim, H.; Choi, H.; Williams, L.E. and Cook, D.R. (2004):** High-Quality RNA, cDNA, and Derived EST Libraries From Grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Plant Mol Biol Rep* 22: 269–278

**Junk, C. (2002):** Erfassung und Evaluierung von züchterisch nicht bearbeitetem Rieslingpflanzgut. Diplomarbeit Fachhochschule Wiesbaden

**Konrad, H.; Lindner, B.; Bleser, E.; Rühl, E.H. (2003):** Strategies in the genetic selection of clones and the preservation of genetic diversity within varieties. *Acta Horticulturae*. 603, 105-110.

**Konradi, J.; Forneck, A.; Blaich, R. (2003):** Eine Bande macht den Unterschied. *Das Deutsche Weinmagazin*. 24, 13-15

**Lindner, B.; Schönhals, E.M.; Konrad, H. (2008):** Passend zum Weintyp – Klonenvielfalt aus Geisenheim. *Das Deutsche Weinmagazin*. 4, 10-13.

**Lorenz, D.H.; Eichhorn, K.W.; Bleiholder, H.; Klose, R.; Meier, U. und Weber, E. (1994):** Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *Vinifera*). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-Skala. *Wein-Wissenschaft*. 49 (2), 66-70

**Mannini, F.; Aragamante, N.; Credi, R. (1996):** Improvements in quality of grapevine Nebiolo clones obtained by sanitation. *Acta Horticulturae* (427), 319-324

**Mannini, F.; Grebi, V.; Credi, R. (1998):** Heat-treated virus-infected grapevine clones: Agronomical and enological modifications. *Acta Horticulturae* (473), 155-163

**Maul, E.; Jung, A. (2003):** Alte Rebsorten früher und heute. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau. Wädenswil.* 139, 11-13.

**Pérez-Hugalde, C.; Júdez, L.; Litago, J.; Yuste, J.; Fuentes-Pila, J. (2004):** Statistical Procedure for clonal preselection of *Vitis Vinifera* L. cv. Tempranillo in the Duero Vallay, Spain. *American Journal of Enology and Viticulture.* 55 (4), 335-345.

**Pfaffl, M.W.; Horgen, G.W. and Dempfle, L. (2002):** Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nuc Aci Res* 30 (9): e36

**Ramakers, C.; Ruijter, J.M.; Lekanne Deprez, R.H. and Moorman, A.F.M. (2003):** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339: 62-65

**Rühl, E.H.; Konrad, H.; Lindner, B. (2002):** Möglichkeiten der Qualitätssteigerung durch Klonenselektion bei Reben am Beispiel des Blauen Spätburgunders. *Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung XXXVII. Vortragstagung Hannover 2002,* 197-200.

**Rühl, E.H.; Konrad, H.; Schmitt, K.; Pfeiffer, W. (2000):** Clonal variation in Pinot Noir. 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology. 16-20 January 2000. Technical Paper.

**Schöffling, H.; Stellmach, G. (1993):** Klonen-Züchtung bei Weinreben in Deutschland. *Waldkircher Verlag. Waldkirchen.*

**Schönhals, E.M.; Konrad, H.; Lindner B. (2008):** Erfassung, Selektion und Sicherung genetischer Vielfalt von traditionellen Rebsorten. *Deutsches Weinbaujahrbuch 2009. Ulmer Verlag – im Druck*

**Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A. and Speleman, F. (2002):** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3 (7):research0034.1–0034.11

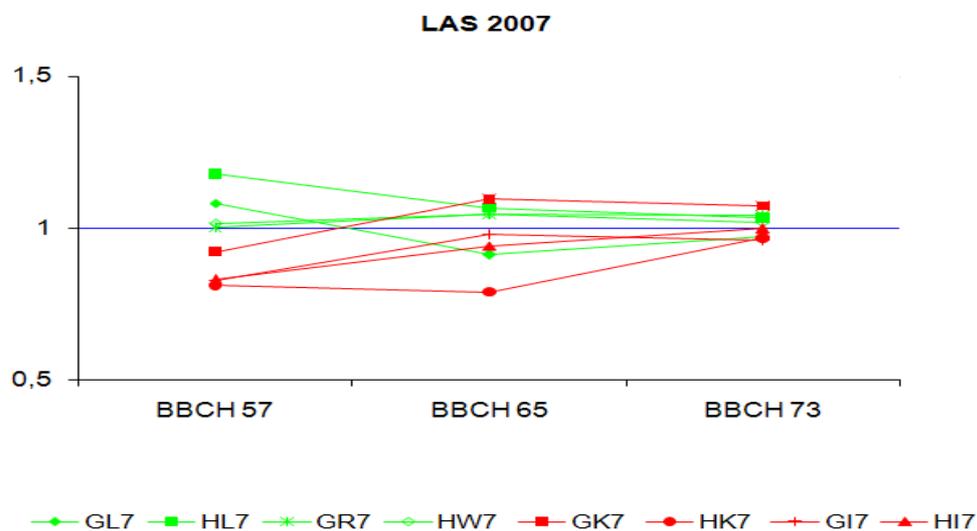
**Wang, Y. and Li, J. (2006):** Genes controlling plant architecture. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 1-7

**Zeng, Y. and Yang, T. (2002):** RNA Isolation From Highly Viscous Samples Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep* **20**: 417a-417e.

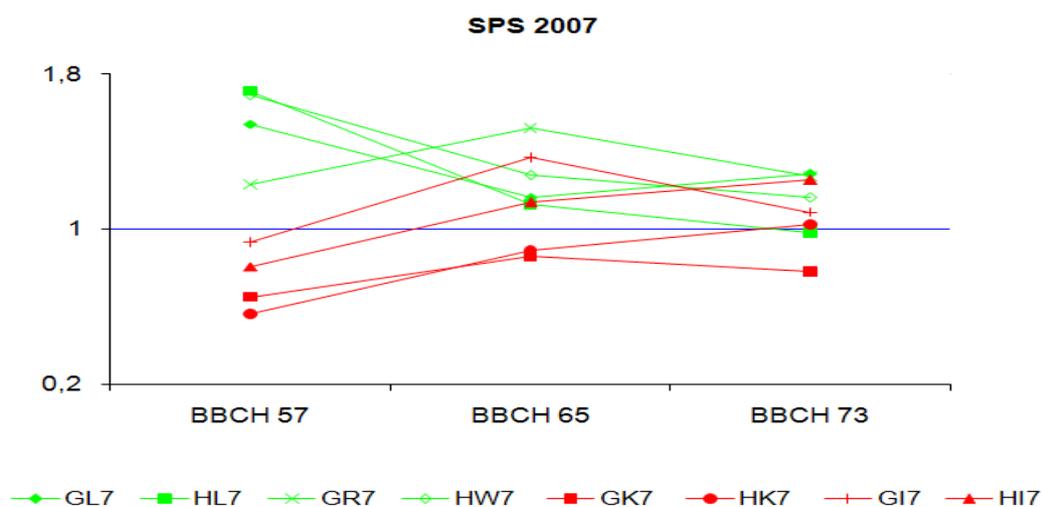
**Zhao, N.; Hashida, H.; Takahashi, N.; Misumi, Y.; Sakaki, Y. (1995):** High-Density cDNA filter analysis: a noval approach for large-scale, quantitative analysis of gene expressiojn. *Gene* 156, 207-213

## 7 Anhang

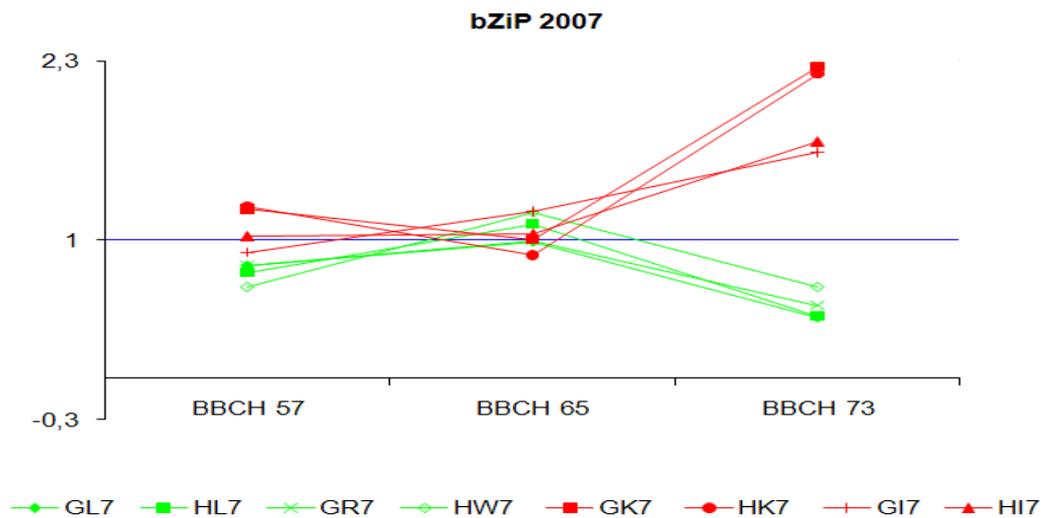
### 7.1 Kinetiken für das Versuchsjahr 2007 ohne die beiden 'Chardonnay'-Klone 1-45 Gm und 54 GM



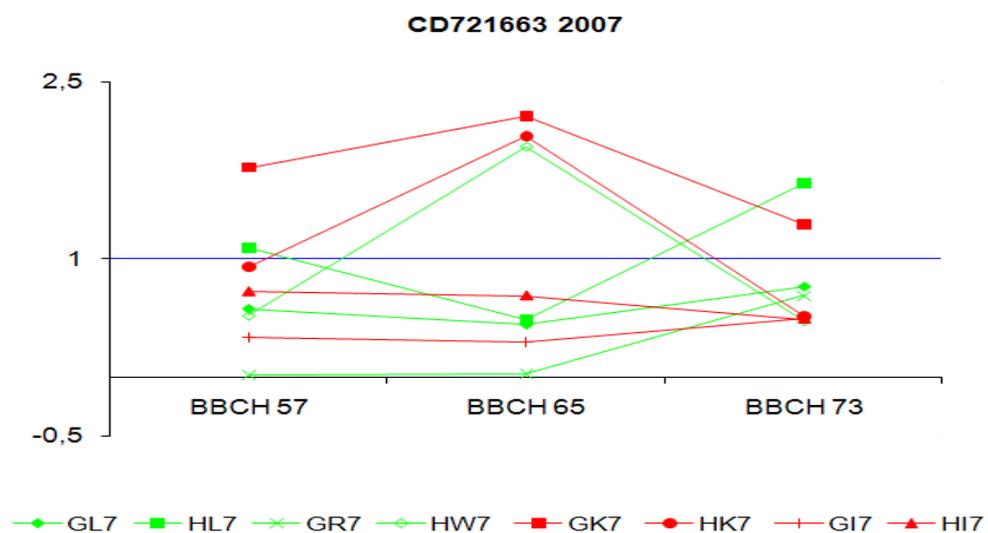
**Abbildung A1:** Kinetiken für LAS. Es konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,003$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,392$ ) und BBCH 73 ( $t=0,590$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



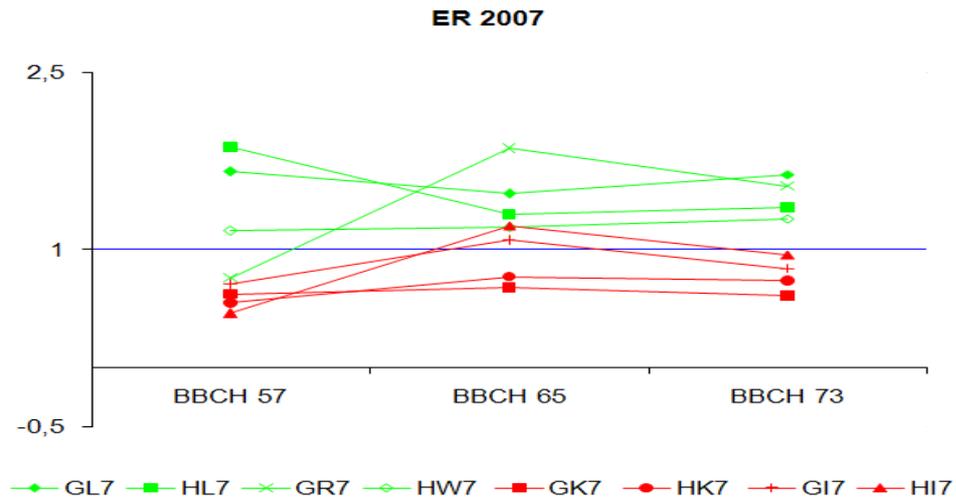
**Abbildung A2:** Kinetiken für SPS. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,001$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,206$ ) und BBCH 73 ( $t=0,294$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



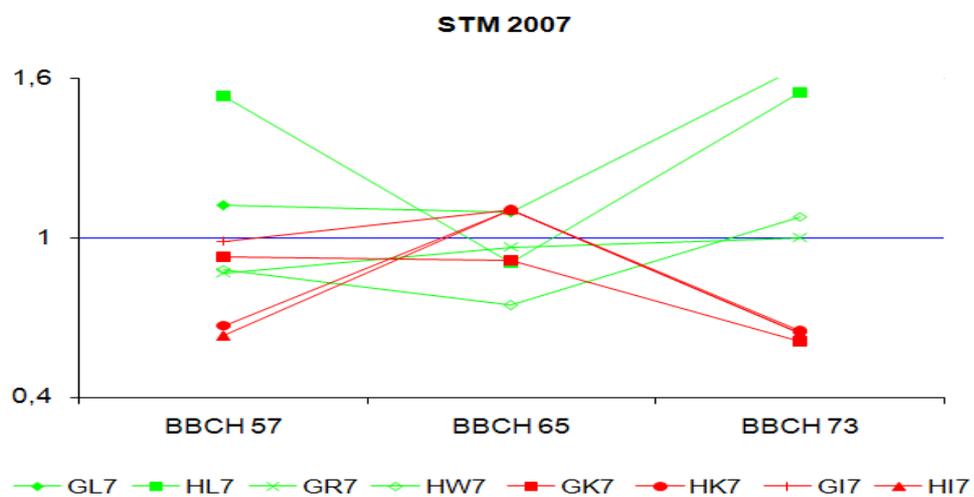
**Abbildung A3:** Kinetiken für bZIP. Es konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,008$ ) und eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,0002$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,677$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



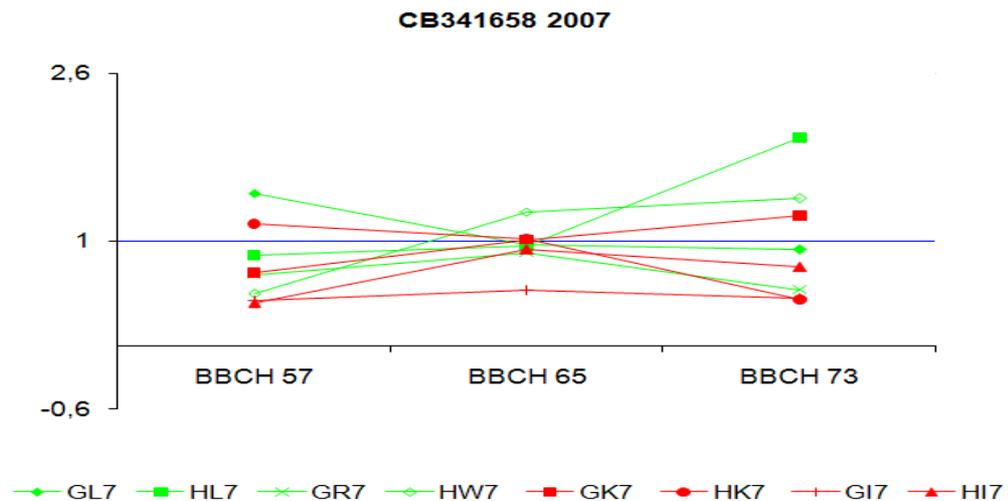
**Abbildung A4:** Kinetiken für CD721663. Für BBCH 57 ( $t=0,336$ ), BBCH 65 ( $t=0,397$ ) und BBCH 73 ( $t=0,566$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



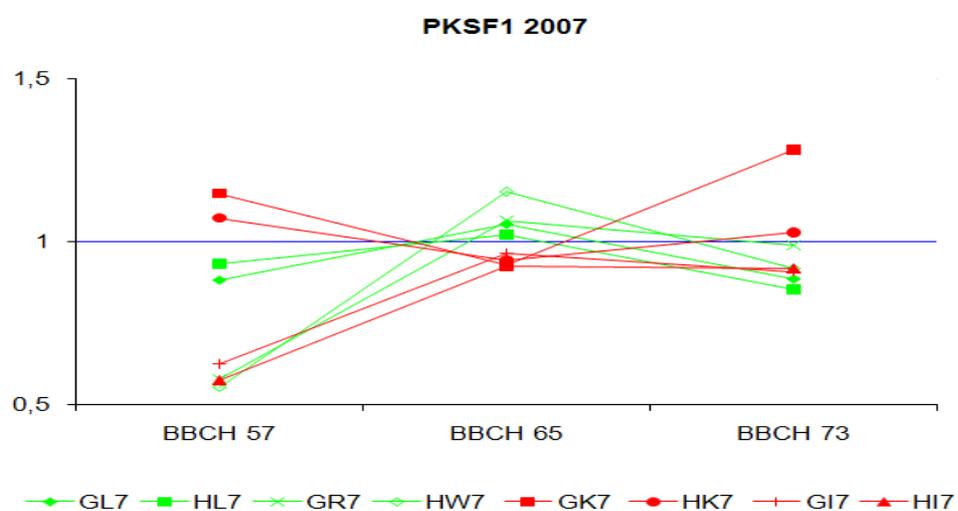
**Abbildung A5:** Kinetiken für ER. Es konnte eine signifikant differentielle Expression in den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 ( $t=0,023$ ) und BBCH 65 ( $t=0,034$ ) und eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,001$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden.



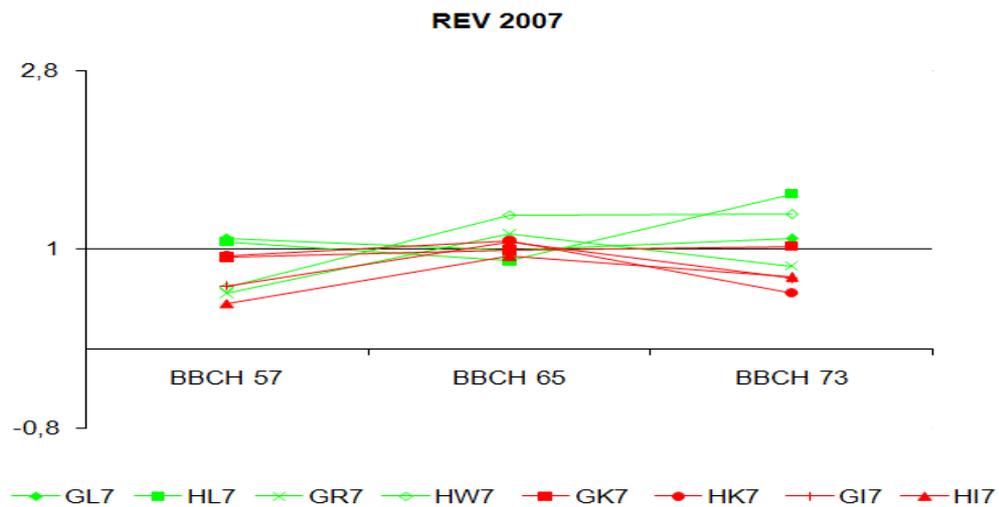
**Abbildung A6:** Kinetiken für STM. Es konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,006$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,149$ ) und für BBCH 65 ( $t=0,190$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



**Abbildung A7:** Kinetiken für CB341658. Für BBCH 57 ( $t=0,490$ ), BBCH 65 ( $t=0,355$ ) und BBCH 73 ( $t=0,227$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

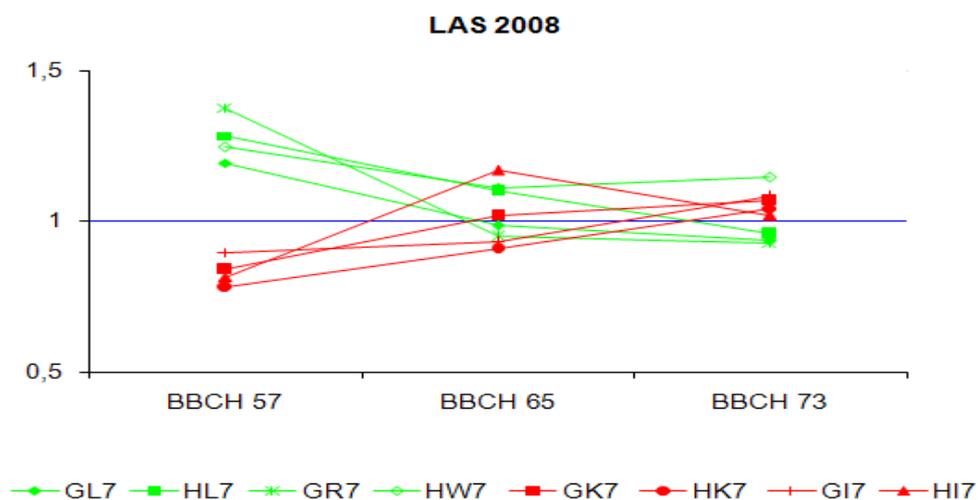


**Abbildung A8:** Kinetiken für PKSF1. Es konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 65 ( $t=0,004$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,534$ ) und für BBCH 73 ( $t=0,233$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

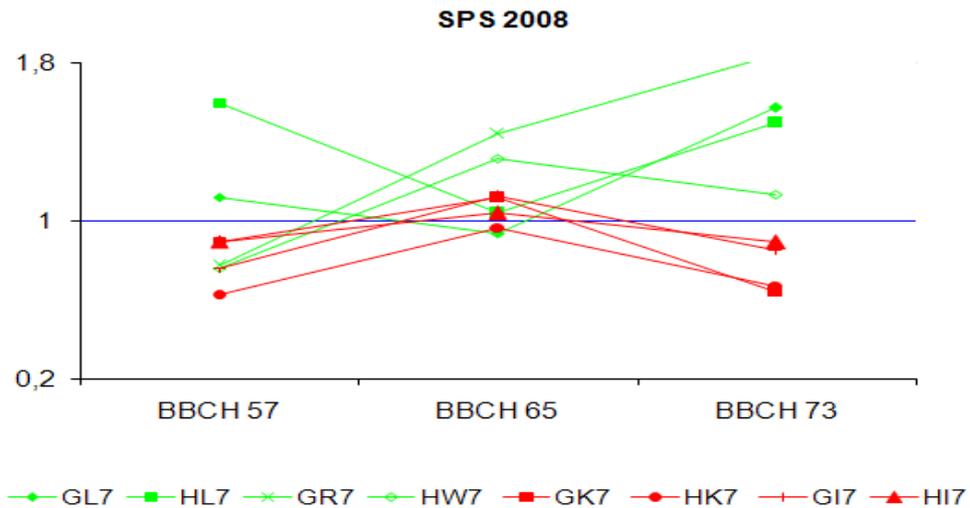


**Abbildung A9:** Kinetiken für REV. Es konnte eine signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,028$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,595$ ) und für BBCH 65 ( $t=0,500$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

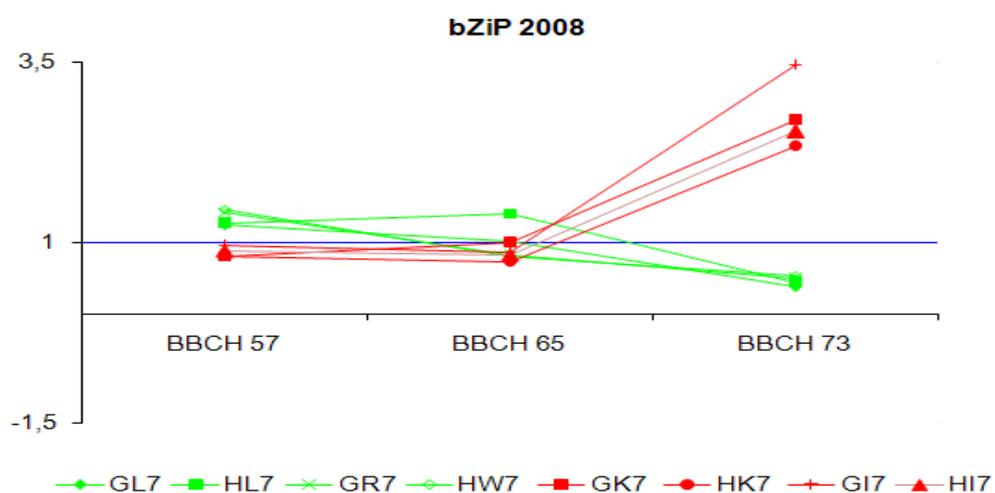
## 7.2 Kinetiken für das Versuchsjahr 2008 ohne die beiden 'Chardonnay'-Klone 1-45 Gm und 54 GM



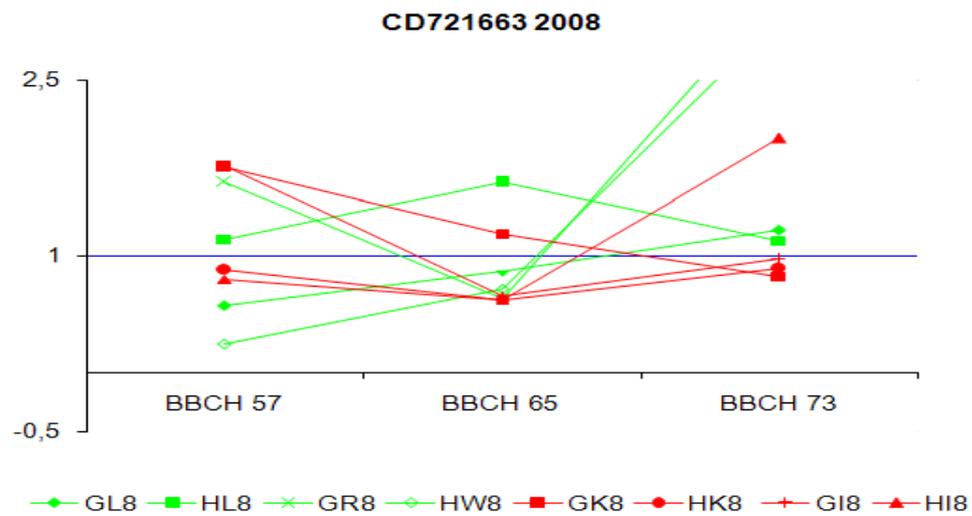
**Abbildung A10:** Kinetiken für LAS. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,0001$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,687$ ) und BBCH 73 ( $t=0,293$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



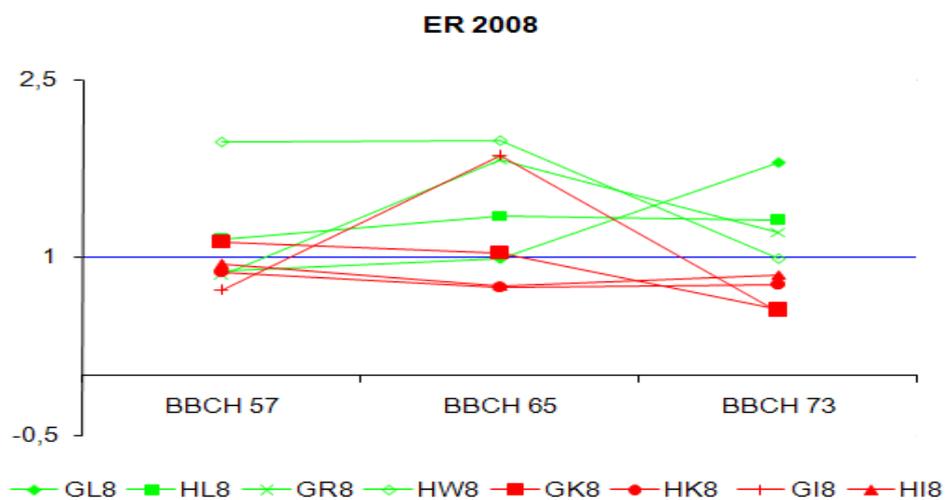
**Abbildung A11:** Kinetiken für SPS. Es konnte eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,003$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,242$ ) und BBCH 65 ( $t=0,356$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



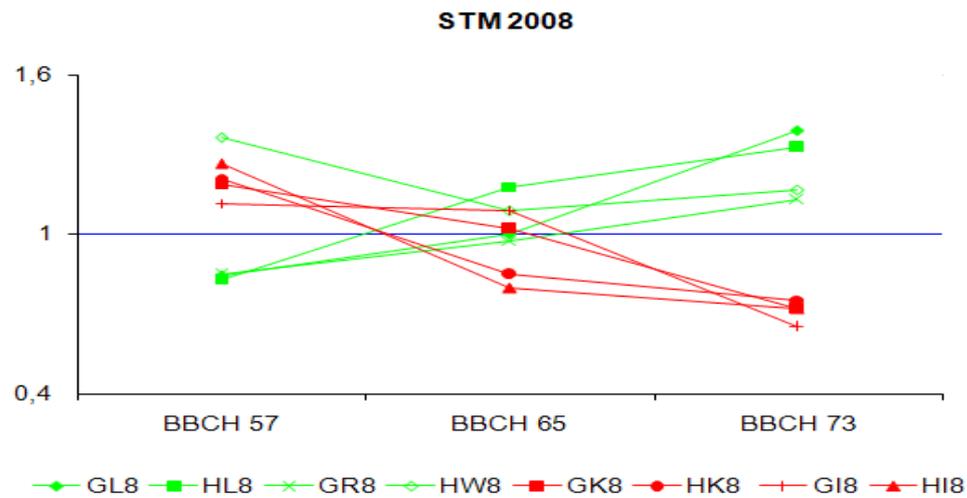
**Abbildung A12:** Kinetiken für bZiP. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,0003$ ) und eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,001$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,329$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



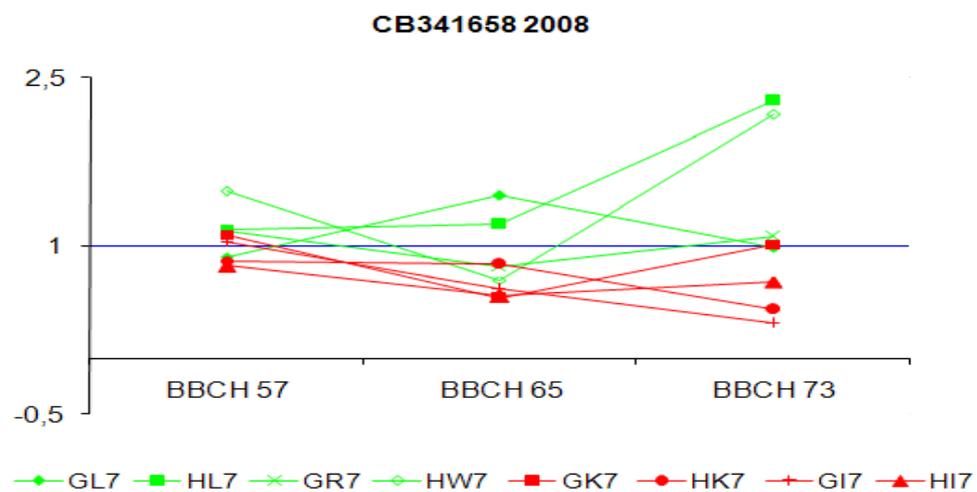
**Abbildung A13:** Kinetiken für CD721663. Für BBCH 57 ( $t=0,357$ ), BBCH 65 ( $t=0,513$ ) und BBCH 73 ( $t=0,171$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



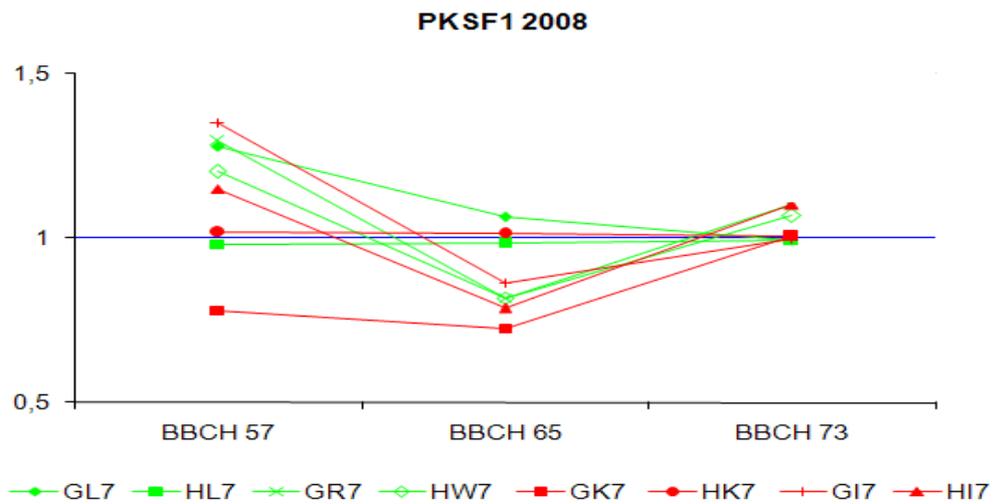
**Abbildung A14:** Kinetiken für ER. Es konnte eine signifikant differentielle Expression in den beiden Entwicklungsstadien BBCH 73 ( $t=0,013$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,320$ ) und BBCH 65 ( $t=0,251$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



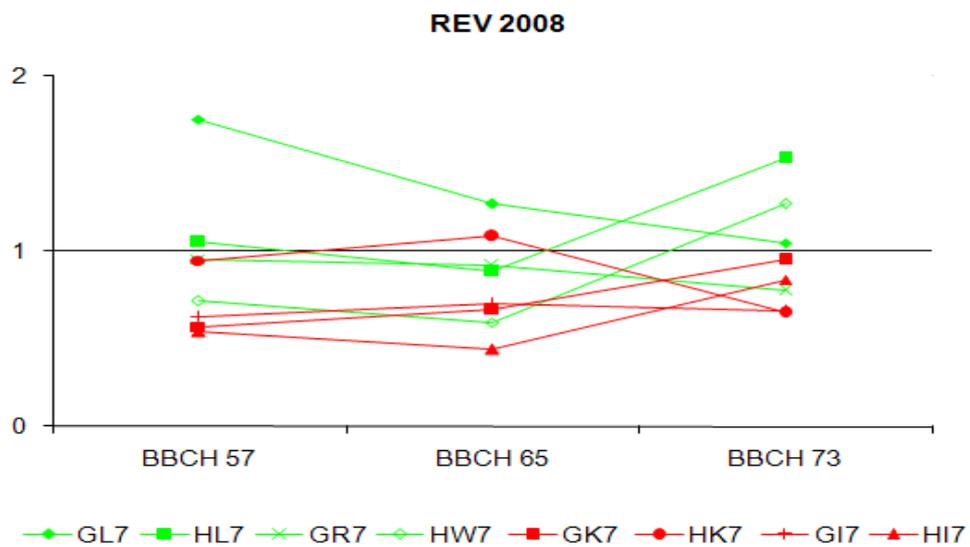
**Abbildung A15:** Kinetiken für STM. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,0002$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,148$ ) und für BBCH 65 ( $t=0,200$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



**Abbildung A16:** Kinetiken für CB341658. Es konnte eine signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,036$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,171$ ) und BBCH 65 ( $t=0,075$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



**Abbildung A17:** Kinetiken für PKSF1. Für BBCH 57 ( $t=0,443$ ), BBCH 65 ( $t=0,434$ ) und BBCH 73 ( $t=0,336$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



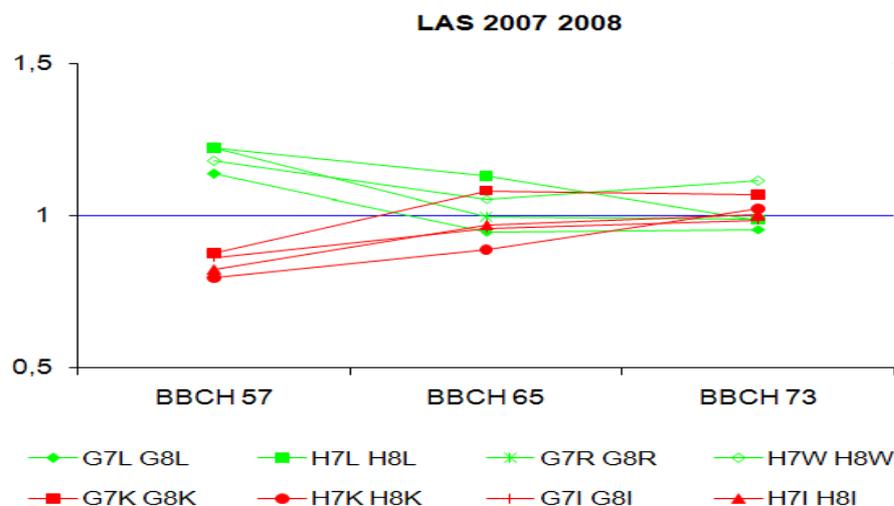
**Abbildung A18:** Kinetiken für REV. Für BBCH 57 ( $t=0,111$ ), BBCH 65 ( $t=0,352$ ) und BBCH 73 ( $t=0,075$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

### 7.3 Standort- und Jahresvergleiche der drei 'Spätburgunder' – Klone 1–84 Gm, 18 Gm und INRA 777

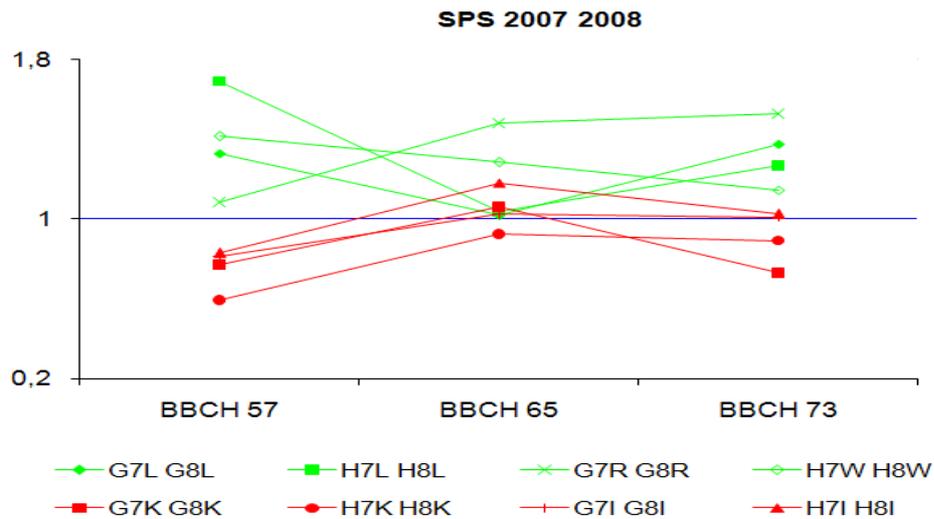
**Tabelle T1:** t-Werte der Standort- und Jahresvergleiche der drei 'Spätburgunder' – Klone 1–84 Gm, 18 Gm und INRA 777. Rot unterlegt sind die t-Werte, die sie sich signifikant unterschiedlich.

Gen	Klon	Standorte			Jahr		
		BBCH 57	BBCH 65	BBCH 77	BBCH 57	BBCH 65	BBCH 77
LAS	1-84 Gm	0,352	0,027	0,419	0,239	0,837	0,415
	18 Gm	0,201	0,171	0,587	0,455	0,440	0,221
	Inra 777	0,376	0,479	0,874	0,600	0,541	0,188
SPS	1-84 Gm	0,129	0,407	0,292	0,400	0,100	0,124
	18 Gm	0,147	0,347	0,273	0,385	0,165	0,178
	Inra 777	0,478	0,183	0,345	0,671	0,285	0,068
bZIP	1-84 Gm	0,965	0,203	0,444	0,002	0,549	0,270
	18 Gm	0,993	0,158	0,439	0,0004	0,586	0,287
	Inra 777	0,830	0,686	0,732	0,483	0,075	0,103
ER	1-84 Gm	0,703	0,744	0,046	0,046	0,395	0,860
	18 Gm	0,634	0,633	0,032	0,091	0,401	0,922
	Inra 777	0,966	0,390	0,310	0,273	0,793	0,348
STM	1-84 Gm	0,075	0,973	0,678	0,139	0,572	0,057
	18 Gm	0,732	0,952	0,681	0,091	0,625	0,053
	Inra 777	0,779	0,447	0,447	0,186	0,387	0,337
REV	1-84 Gm	0,376	0,217	0,004	0,467	0,669	0,918
	18 Gm	0,374	0,245	0,030	0,480	0,536	0,759
	Inra 777	0,100	0,588	0,266	0,721	0,098	0,725

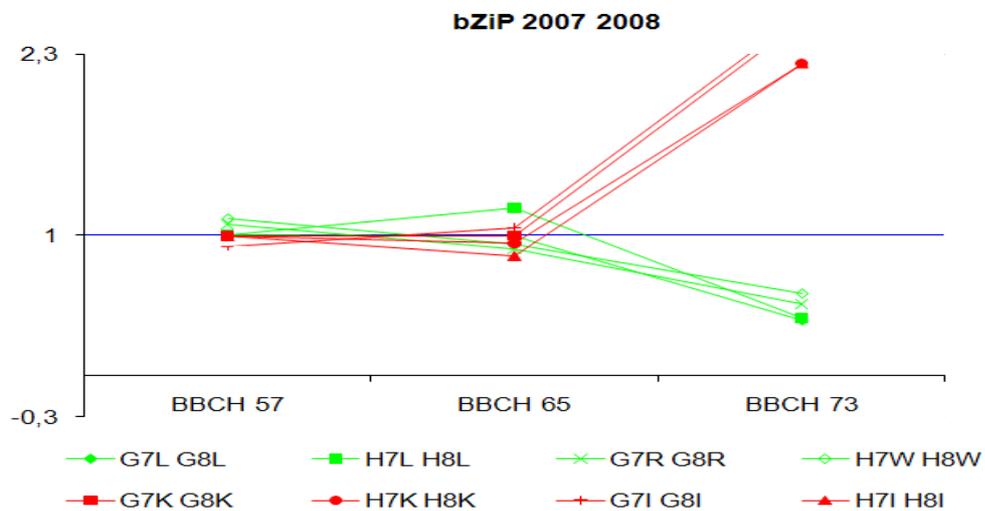
### 7.4 Kinetiken für das Versuchsjahr 2007 und 2008 ohne die beiden 'Chardonnay' – Klone 1-45 Gm und 54 GM



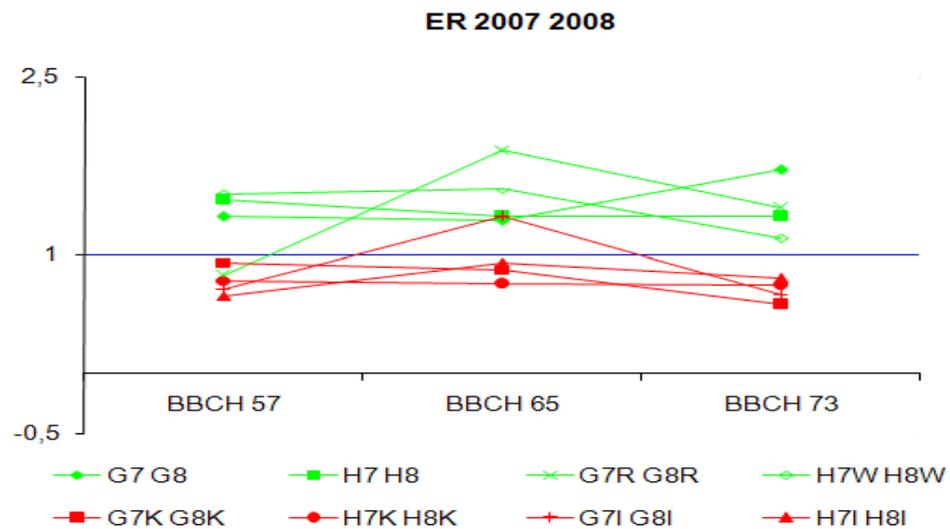
**Abbildung A19:** Kinetiken für LAS. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,00001$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,347$ ) und BBCH 73 ( $t=0,823$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



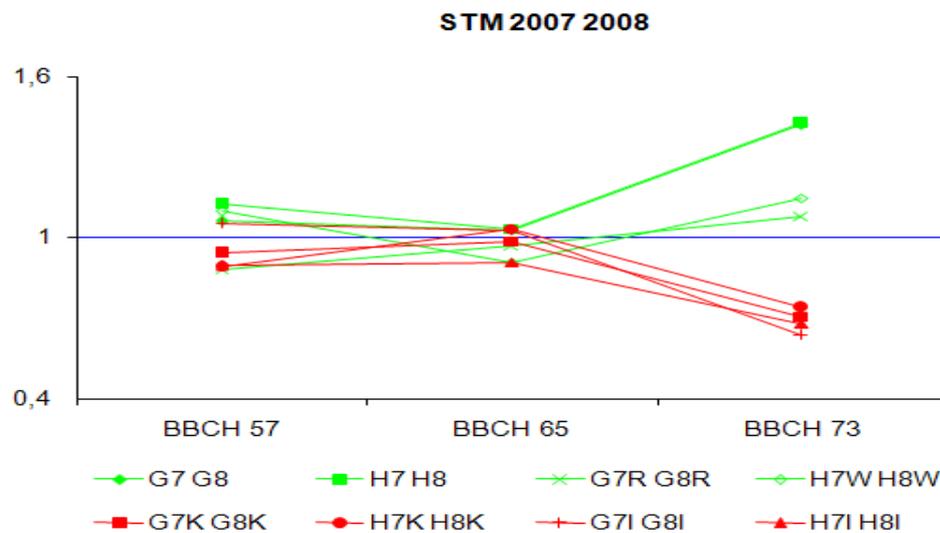
**Abbildung A20:** Kinetiken für SPS. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,00003$ ) und eine hoch signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 57 ( $t=0,003$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 65 ( $t=0,243$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.



**Abbildung A21:** Kinetiken für bZiP. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,00002$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,230$ ) und BBCH 65 ( $t=0,329$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

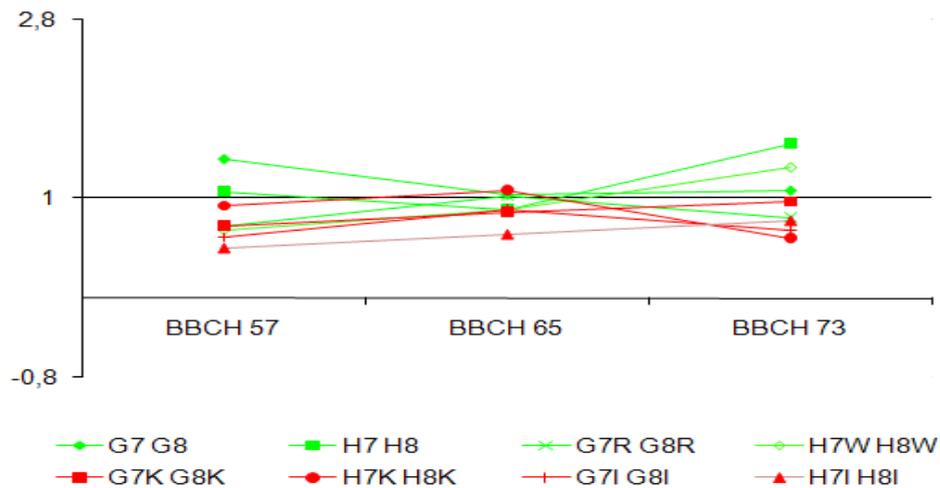


**Abbildung A22:** Kinetiken für ER. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,001$ ) und eine signifikant differentielle Expression in den beiden Entwicklungsstadien BBCH 57 ( $t=0,022$ ) und BBCH 65 ( $t=0,026$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden.



**Abbildung A23:** Kinetiken für STM. Es konnte eine höchst signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,0008$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,193$ ) und für BBCH 65 ( $t=0,939$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

REV 2007 2008



**Abbildung A24:** Kinetiken für REV. Es konnte eine signifikant differentielle Expression im Entwicklungsstadium BBCH 73 ( $t=0,010$ ) zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Für BBCH 57 ( $t=0,160$ ) und BBCH 65 ( $t=0,855$ ) konnte keine signifikant differentielle Expression detektiert werden.

7.5 Sequenzen für das Kandidatengen SUPERSHOOT

		1			100
Harslevelue	(1)	-----CAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Arbane	(1)	ATTACCCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Räuschling	(1)	-----			ATCAGTTTCATGGC
Black Rose	(1)	-----			GGC
1-84 Gm Gm	(1)	ATTACCCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
1-84 Gm Hm	(1)	ATTACCCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
M242 Hm	(1)	ATTACCCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
1-30 Gm Gm	(1)	-----GG			TAGCATT
1-45 Gm Gm	(1)	-----TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC		
Müller-Thurgau	(1)	-----CCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Muskateller	(1)	---CACCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Riesling	(1)	-----CAACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Dunkelfelder	(1)	-----TCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Traminer rot	(1)	-----			TAGCATT
Silvaner	(1)	ATTACCCATGCTCCTCCAAGAAATAACCAACAACACTAGG	TAGCATT	TCCAATT	CACCTTCACGACCTTGGAAATGAGCAGTTGCTTTATCAGTTTCATGGC
Grauburgunder	(1)	-----			TAGCATT
Schwarzriesling	(1)	-----			TTTGC
Dakapo	(1)	-----			TTTGC
St. Laurent	(1)	-----			
18 Gm Gm	(1)	-----			
18 Gm Hm	(1)	-----			
Inra 777 Gm	(1)	-----			
54 Gm Gm	(1)	-----			
		101			200
Harslevelue	(85)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Arbane	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Räuschling	(15)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Black Rose	(4)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
1-84 Gm Gm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
1-84 Gm Hm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
M242 Hm	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
1-30 Gm Gm	(63)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
1-45 Gm Gm	(54)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Müller-Thurgau	(89)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Muskateller	(98)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Riesling	(71)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Dunkelfelder	(90)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Traminer rot	(60)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Silvaner	(101)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Grauburgunder	(61)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Schwarzriesling	(23)	AGAGGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Dakapo	(1)	-----ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
St. Laurent	(1)	-----ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
18 Gm Gm	(1)	-----TTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
18 Gm Hm	(1)	-----SAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
Inra 777 Gm	(1)	-----GGATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC
54 Gm Gm	(1)	-----ATGAGCACTGGAGCTTTCCTCTTGA	CAACACTTT	TAACCTGGAAAAGC	GGAGAGTGGATACCGGTAATCCATGATAAAATAGAAAACCTCCCACTTTTC





## 7.6 Sequenzen für das Kandidatengen SHOOT MERISTEMLESS

	1	100
Harslevelue	(1)	-----CACTGTTAGTTC
Arbane	(1)	-----TC
Koshu	(1)	-----
Räuschling	(1)	-----
Black Rose	(1)	-----
Cardinal	(1)	-----TC
1-84 Gm Gm	(1)	-----TC
1-84 Gm Hm	(1)	-----TC
M242 Hm	(1)	-----TC
1-30 Gm Gm	(1)	-----TTAGTTC
1-45 Gm Gm	(1)	-----TC
Regent	(1)	-----TC
Dornfelder	(1)	-----CGCCTTACRCSRCMAYIGITYWCYSACTGTTAGTTC
Kerner	(1)	-----TTAGTTC
Müller-Thurgau	(1)	-----
Muskateller	(1)	-----ACGCCACTGTTCTCTCACTGTTAGTTC
Riesling	(1)	-----TTAGTTC
Dunkelfelder	(1)	-----TC
Traminer rot	(1)	-----CGCCTTACACCGCCACTGTTCTCTCACTGTTAGTTC
Silvaner	(1)	-----TC
Felicia	(1)	-----
Grauburgunder	(1)	-----
Schwarzriesling	(1)	-----
Dakapo	(1)	-----GTCCCGTATGACCCCTGCTTACCTAAAAGCCTAATCTCCGCTTACACCGCCACTGTTCTCTCACTGTTAGTTC
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(1)	-----TC
18 Gm Gm	(1)	-----
18 Gm Hm	(1)	-----TC
INRA 777 Gm	(1)	-----
INRA 777 Hm	(1)	-----
54 Gm Gm	(1)	-----
	101	200
Harslevelue	(13)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Arbane	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Koshu	(1)	-----TGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Räuschling	(1)	-----ACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Black Rose	(1)	-----ACTCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Cardinal	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
1-84 Gm Gm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
1-84 Gm Hm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
M242 Hm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
1-30 Gm Gm	(8)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
1-45 Gm Gm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Regent	(38)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Dornfelder	(4)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Kerner	(8)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Müller-Thurgau	(1)	-----CTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Muskateller	(29)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Riesling	(8)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Dunkelfelder	(4)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Traminer rot	(38)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Silvaner	(4)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Felicia	(1)	-----CATCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Grauburgunder	(1)	-----CTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Schwarzriesling	(1)	-----CTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Dakapo	(74)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
St. Laurent	(1)	-----TGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
Villaris	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
18 Gm Gm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
18 Gm Hm	(3)	TACCACTTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
INRA 777 Gm	(1)	-----CATCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
INRA 777 Hm	(1)	-----CATCTGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
54 Gm Gm	(1)	-----TGACCTCTACACTCTCTTTAATGGCCGCTTTTGTAAAGCTTTGTGTAAGCTTTGTTAGTGTACCTGTACCGCCATCTTCTTTAACACACACACACACAAAGGA
	201	300
Harslevelue	(113)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Arbane	(103)	CWSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Koshu	(93)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Räuschling	(100)	CWSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Black Rose	(97)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Cardinal	(103)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-84 Gm Gm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-84 Gm Hm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
M242 Hm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-30 Gm Gm	(108)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
1-45 Gm Gm	(103)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Regent	(138)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Dornfelder	(104)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Kerner	(108)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Müller-Thurgau	(96)	CWSTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Muskateller	(129)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Riesling	(108)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Dunkelfelder	(102)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Traminer rot	(138)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Silvaner	(104)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Felicia	(98)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Grauburgunder	(93)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Schwarzriesling	(94)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Dakapo	(174)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
St. Laurent	(93)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
Villaris	(101)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
18 Gm Gm	(101)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
18 Gm Hm	(101)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
INRA 777 Gm	(96)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
INRA 777 Hm	(96)	CASTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG
54 Gm Gm	(91)	CTGTCATTCTCCGGCAITTTACACACACCTAGTACCAGAGTCGAGGAATCTCAAGACTCCCAACCCAAAGTCAAGTCTTACAGTCCCAACACTGTAGG



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

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

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

## 7.7 Sequenzen für das Kandidatengen ERECTA

	1	100
Harslevelue	(1)	-----
Arbane	(1)	-----AGT
Koshu	(1)	-----
Räuschling	(1)	-----
Black Rose	(1)	-----
Cardinal	(1)	-----TT CAGT
1-84 Gm Gm	(1)	-----TT CAGT
1-84 Gm Hm	(1)	-----TT CAGT
M242 Hm	(1)	-----
1-30 Gm Gm	(1)	-----TT CAGT
1-45 Gm Gm	(1)	-----TT CAGT
Regent	(1)	-----TT CAGT
Dornfelder	(1)	-----TT CAGT
Kerner	(1)	-----TT CAGT
Müller-Thurgau	(1)	-----
Muskateller	(1)	-----
Riesling	(1)	-----TT CAGT
Dunkelfelder	(1)	-----
Traminer rot	(1)	-----CAGT
Silvaner	(1)	-----
Felicia	(1)	-----CAGT
Grauburgunder	(1)	-----CAGT
Portugieser	(1)	-----TT CAGT
Schwarzriesling	(1)	-----TT CAGT
Dakapo	(1)	-----
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(1)	-----CAGT
18 Gm Gm	(1)	-----CAGT
18 Gm Hm	(1)	-----CAGT
INRA 777 Gm	(1)	-----
INRA 777 Hm	(1)	-----
54 Gm Gm	(1)	-----ST
	101	200
Harslevelue	(1)	-----CA - SITGTTTC
Arbane	(4)	-----RKKTTTCY
Koshu	(1)	-----WMA - RTRTTTCY
Räuschling	(2)	-----TGA - SITGTTTC
Black Rose	(2)	-----CA - SITGTTTC
Cardinal	(7)	-----CA - SITGTTTC
1-84 Gm Gm	(7)	-----CA - SITGTTTC
1-84 Gm Hm	(7)	-----CA - SITGTTTC
M242 Hm	(1)	-----CA - SITGTTTC
1-30 Gm Gm	(7)	-----CA - SITGTTTC
1-45 Gm Gm	(7)	-----CA - SITGTTTC
Regent	(7)	-----CA - SITGTTTC
Dornfelder	(7)	-----CA - SITGTTTC
Kerner	(7)	-----CA - SITGTTTC
Müller-Thurgau	(1)	-----CA - SITGTTTC
Muskateller	(1)	-----CA - SITGTTTC
Riesling	(7)	-----CA - SITGTTTC
Dunkelfelder	(1)	-----
Traminer rot	(1)	-----CA - SITGTTTC
Silvaner	(1)	-----
Felicia	(5)	-----CA - SITGTTTC
Grauburgunder	(7)	-----CA - SITGTTTC
Portugieser	(5)	-----CA - SITGTTTC
Schwarzriesling	(7)	-----CA - SITGTTTC
Dakapo	(1)	-----TGTATA TTCTGATTT TTTT TTTT TGA
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(5)	-----CA - SITGTTTC
18 Gm Gm	(5)	-----CA - SITGTTTC
18 Gm Hm	(5)	-----CA - SITGTTTC
INRA 777 Gm	(1)	-----CA - SITGTTTC
INRA 777 Hm	(1)	-----CA - SITGTTTC
54 Gm Gm	(3)	-----CA - SITGTTTC
	201	300
Harslevelue	(94)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Arbane	(100)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Koshu	(67)	-----
Räuschling	(98)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Black Rose	(97)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Cardinal	(102)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
1-84 Gm Gm	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
1-84 Gm Hm	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
M242 Hm	(90)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
1-30 Gm Gm	(92)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
1-45 Gm Gm	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Regent	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Dornfelder	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Kerner	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Müller-Thurgau	(72)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Muskateller	(63)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Riesling	(92)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Dunkelfelder	(1)	-----
Traminer rot	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Silvaner	(94)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Felicia	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Grauburgunder	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Portugieser	(105)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Schwarzriesling	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
Dakapo	(34)	-----
St. Laurent	(1)	-----
Villaris	(101)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
18 Gm Gm	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
18 Gm Hm	(103)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
INRA 777 Gm	(99)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
INRA 777 Hm	(99)	-----GATGGCTGAGGGCAIT
54 Gm Gm	(101)	-----GATGGCTGAGGGCAIT











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

## 7.9 Sequenzen für das Kandidatengen bZiP

	1	100
1-84 Gm Gm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-84 Gm Hm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-30 Gm Gm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-45 Gm Gm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
18 Gm Hm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Hm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Gm Allel 1	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-84 Gm Gm Allel 2	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
1-30 Gm Gm Allel 2	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
18 Gm Gm Allel 2	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Gm Allel 2	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	
Inra 777 Hm Allel 2	(1) TGTAAACGACGCCAGTCTTCAAGTTTCCACTACAAGTGTTTAACTAATTITTTTAAACTCTATTATTAAATATCTCTAAAATTTTAAAAAC	

	101	200
1-84 Gm Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
1-84 Gm Hm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
1-30 Gm Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
1-45 Gm Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
18 Gm Hm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Hm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Gm Allel 1	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
1-84 Gm Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
1-30 Gm Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
18 Gm Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Gm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	
Inra 777 Hm Allel 2	(101) AATTTTCAAACACATAAANGAACAAAGTGTTTGAACCCGATACTAGTAAAGGAGGCCAACCCTTTAAAGGGAGAAAATCTCTAATAATTTTATAA	

	201	300
1-84 Gm Gm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-84 Gm Hm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-30 Gm Gm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-45 Gm Gm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
18 Gm Hm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Hm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Gm Allel 1	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-84 Gm Gm Allel 2	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
1-30 Gm Gm Allel 2	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
18 Gm Gm Allel 2	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Gm Allel 2	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	
Inra 777 Hm Allel 2	(201) ATAAGAAATTAGGTAATTAAGAGGAATATAATTAAGAGGATGGCCAGGAGAGAGAAATGAAA TACTAATTAAGAANGAAATATAAATTTTATTTAT	

	301	400
1-84 Gm Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
1-84 Gm Hm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
1-30 Gm Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
1-45 Gm Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
18 Gm Hm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
Inra 777 Hm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
Inra 777 Gm Allel 1	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
1-84 Gm Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
1-30 Gm Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
18 Gm Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
Inra 777 Gm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	
Inra 777 Hm Allel 2	(301) TTTATTTTATGAAGGAAAGTCACGAAATATCCGGT-----CTTTTTCATTTTATCCAAACAGTAAAAATAAAAATAAAAATGAAGAAAGAAATAT	





