

**Untersuchungen zur genetischen Differenzierung von
Vitis Genotypen und Unterlagsrebsorten
sowie deren Klone mit Hilfe der
RAPD-, AFLP- und SAMPL-Analyse.**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tatjana Wolf
geboren in Eltville am Rhein

Mainz, 2001

Dekan:

Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2001

Die vorliegende Arbeit wurde
in der Zeit von Dezember 1996 bis Februar 2001
im Institut für Rebenzüchtung und Rebenveredlung
der Forschungsanstalt Geisenheim
angefertigt

Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Rühl danke ich für die Überlassung des Themas, die Übernahme des ersten Gutachtens und das entgegengebrachte Interesse bezüglich der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Wernicke danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereiches Biologie und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. R. Ries danke ich für die entgegengebrachte Unterstützung und seine unkonventionellen Ideen, die oftmals den richtigen Ansatz brachten.

Herrn Dr. K. Eimert danke ich für das wissenschaftliche Gespräch und den Austausch.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. M. Cervera für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Unterstützung, weiterhin den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. J.-M. Martinez-Zapater für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft. Zudem möchte ich dem DAAD danken, ohne dessen finanzielle Unterstützung dieses Projekt nicht durchführbar gewesen wäre.

Frau Dr. E. Bleser danke ich für den Austausch und Dr. J. Schmid für ein immer offenes Ohr.

Herrn R. Kirchner-Ness danke ich für die Hilfe und Unterstützung in Bezug auf die mathematischen Berechnungen.

Herrn H. Konrad danke ich für die geduldige Beantwortung meiner Fragen bezüglich Standort und Ampelographie der Unterlagsrebsorten.

Mein Dank gilt ebenso Frau Ortlieb und insbesondere Frau Nilsson, deren Diplomarbeiten ich betreute. Sie leisteten wichtige Vorversuche zu einigen der hier dargestellten Ergebnisse.

Danken möchte ich außerdem Frau Dietzel und Frau Walbert für die sehr gute Zusammenarbeit, die extrem nette Atmosphäre und ihre bereitwillige Hilfe, vor allem am Ende dieser Arbeit.

Frau Dohr möchte ich für die lange und gute Zeit der Zusammenarbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den übrigen Mitarbeitern des Fachgebietes für Rebenzüchtung und Rebenveredlung, für die Bereitstellung und Beschaffung des nötigen Pflanzenmaterials und das nette Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, die mich während der gesamten Zeit unermüdlich und tatkräftig unterstützte. Meinem jüngsten Bruder möchte ich ganz herzlich für den von ihm geleisteten zeitweiligen doppelten Einsatz danken.

Herrn Perabo möchte ich besonders für seine moralische und aktive Unterstützung, vor allem am Ende der Arbeit, sehr danken.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ATP	Adenosintri-phosphat
Aqua bidest.	deionisiertes zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	deionisiertes einfach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
c	Konzentration
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothriol ¹
dNTP	Desoxyribonukleotid-tri-phosphat
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Geisenheim
Gm	Geisenheim
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
K-Acetat	Kalium-Acetat
KCl	Kalium-Chlorid
KI	Klon
KV	Kilovolt
M	Molar
M (in Abb.)	Molekulargewichtsmarker
Mg-Acetat	Magnesium-Acetat
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
<i>Mse</i> I	<i>Micrococcus species</i> (NEB 446)
μ	Mykro-
n	Nano-
N	Neustadt
Na	Naumburg
NW	Neustadt Weinstraße
OD	Optische Dichte
OIV	Office international de la vigne et du vin (Paris)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
RAMP	Zeit die der Thermocycler zum Aufheizen und Abkühlen der Heizblöcke benötigt, angegeben in °C/sek
RAPD	Random amplified polymorphic DNA

¹ 1,4-Dithio-DL-threit(ol), Cleland's Reagenz

RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
SAMPL	Single amplified microsatellite polymorphic loci
SCAR	Sequence characterized amplified region
sek	Sekunden
STS	Sequence tagged site
Tab.	Tabelle
TAE	Tris, Acetat , EDTA
TBE	Tris, Borat, EDTA
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UBC	University of British Columbia
UPGMA	Unweighted pair group method average
UPOV	Union for the protection of new varieties of plants
VF	Verdünnungsfaktor
W	Watt

Abkürzungen der Unterlagssorten

<i>berl.</i>	<i>berlandieri</i>
<i>cin.</i>	<i>cinerea</i>
<i>rip.</i>	<i>riparia</i>
<i>rup.</i>	<i>rupestris</i>
<i>5 BB</i>	<i>Kober 5 BB</i>
<i>5 C</i>	<i>Geisenheim 5 C</i>
<i>8 B</i>	<i>Teleki 8 B</i>
<i>23 G</i>	<i>Geisenheim 23</i>
<i>26 G</i>	<i>Geisenheim 26</i>
<i>41 B</i>	<i>Millardet et de Grasset 41 B</i>
<i>106-8 M.G</i>	<i>Millardet et de Grasset 106-8</i>
<i>125 AA</i>	<i>Kober 125 AA</i>
<i>127 BB</i>	<i>Kober 127 BB</i>
<i>1202 C</i>	<i>Couderc 1202</i>
<i>1616 C</i>	<i>Couderc 1616</i>
<i>1616 Tr</i>	<i>1616 Trier</i>
<i>3309 C</i>	<i>Couderc 3309</i>
<i>SO 4</i>	<i>Selektion Oppenheim 4</i>
<i>Tel</i>	<i>Teleki</i>
<i>V.</i>	<i>Vitis</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Sortenunterscheidung von Unterlagsreben	1
1.1.1 Die Ampelographie	2
1.1.2 Biochemische/molekularbiologische Marker zur Unterscheidung von Rebsorten	3
1.1.2.1 Isoenzyme	3
1.1.2.2 <u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism (RFLP)-Analyse	4
1.1.2.3 <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (PCR) gestützte Methoden	4
1.2 Problemfälle	13
1.2.1 Fremdholz in Bündeln von Unterlagen	13
1.2.2 Untersuchungen zur genetischen Varianz von Klonen	14
1.3 Problemstellung – Thema der Arbeit	15
2. Material und Methode	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.3 Holzmaterial	18
2.1.4 Wurzelmaterial	18
2.2 Methode	19
2.2.1 Verwendete Lösungen	19
2.2.1.1 DNA-Extraktion	19
2.2.1.2 Pufferlösungen zur Durchführung der RAPD-Analyse	20
2.2.1.3 Pufferlösungen zur Durchführung der AFLP- und SAMPL-Analyse	20
2.2.1.4 Polyacrylamidgellösung	21
2.2.1.5 Laufpuffer	21
2.2.1.6 Färbelösungen	22
2.2.2 DNA-Extraktion	22
2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Holz	22
2.2.2.2 Extraktion von DNA aus Wurzeln von Freilandreben	23
2.2.2.3 DNA-Extraktion von großen Holzvolumina	23
2.2.3 Quantitative DNA-Bestimmung	24

2.2.4 Durchführung der Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse	24
2.2.4.1 Primer zur Durchführung der RAPD-Analyse	24
2.2.4.2 Herstellen der Desoxyribonukleotidtriphosphat-Arbeitslösung	26
2.2.4.3 Herstellen des Reaktionsansatzes für die RAPD-Analyse	26
2.2.4.4 Programme zur Durchführung der RAPD-Analyse	27
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.6 Durchführung der Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Analyse	29
2.2.6.1 Herstellen der Nukleotid-Arbeitslösungen	29
2.2.6.2 Restriktion der extrahierten DNA	30
2.2.6.3 Verbinden der Adaptoren mit den DNA-Fragmenten – Ligation	31
2.2.6.4 Durchführung der ersten selektiven Amplifikation (Präamplifikation)	32
2.2.6.5 Radioaktive Markierung des <i>Eco</i> RI Primer mit ^{33}P	34
2.2.6.6 Durchführung der zweiten selektiven Amplifikation	35
2.2.7 Durchführung der Selektive Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (SAMPL)-Analyse	37
2.2.8 Auftrennung der AFLP- und SAMPL-Proben in einem Sequenziergel	39
2.2.8.1 Gießen des Polyacrylamidgeles	39
2.2.8.2 Vorbereiten der Proben	39
2.2.8.3 Starten des Sequenziergels	39
2.2.9 Silberfärbung	40
2.2.10 Auswertung	40
2.2.11 Direkte Isolierung der DNA aus einem Polyacrylamidgel	41
3. Ergebnisse	43
3.1 DNA-Extraktion aus Holz und Freilandwurzeln	43
3.1.1 DNA-Extraktion aus Wurzelgewebe von Freilandpflanzen	47
3.2 Sortenunterscheidung von Unterlagsreben mit Hilfe der Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analyse	50
3.2.1 Erweiterung der Dekamer Primer #722, #726 und #751 zu 12mer Primer ...	53
3.2.2 Untersuchungen zur Vermischung von Unterlagsorten in einem Unterlagenbündel	61
3.2.2.1 Vermischungen der DNA	62

3.2.2.2	Extraktion von DNA aus Holz von gebündelten Unterlagsreben.....	64
3.2.2.3	Vermischungen des Unterlagenholzes	66
3.2.3	Vergleich von Unterlagssorten unterschiedlicher Herkunft.....	68
3.2.4	Trennung von Unterlagssorten mit RAPD-Primer #751.....	69
3.2.5	Genetische Divergenz der Wildreben	77
3.2.6	Unterscheidung der Unterlagssorten <i>Kober 5 BB</i> und <i>Teleki 5 A Goseck</i>	79
3.2.7	Praktisches Beispiel der Sortentrennung anhand eines 30 Jahre alten Weinberges	80
3.3	Ähnlichkeitsverhalten der 7 in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten.....	81
3.4	Identifikation von Unterlagssorten durch die RAPD-Analyse – Darstellung eines mathematischen Modells	83
3.5	Untersuchungen zur genetischen Varianz von Unterlagenklonen.....	90
3.5.1	Die RAPD-Analyse zum Nachweis genetischer Varianzen.....	91
3.5.2	AFLP- und SAMPL-Analyse zum Nachweis von genetischen Varianzen der Klone der Unterlagssorten <i>SO 4</i> , <i>5 C</i> und <i>5 BB</i> sowie der Unterlagssorte <i>Binova</i>	94
3.5.2.1	Auswertungen der AFLP- und SAMPL-Analysen.....	96
3.5.2.2	Spezifische Banden der Unterlagssorten <i>SO 4</i> , <i>5 BB</i> und <i>5 C</i> und deren Klone	103
3.5.2.3	Diversität der Unterlagssorten <i>SO 4</i> , <i>5 C</i> und <i>5 BB</i> und deren Klone sowie der Sorte <i>Binova</i> unter Berücksichtigung der Werte der AFLP- und SAMPL-Analysen	105
3.6	Betrachtung der <i>5 C</i> Einzelstöcke.....	110
4.	Diskussion.....	115
4.1	Die Extraktion von DNA aus Holz und Wurzeln von Freilandreben.....	115
4.2	Holzvermischungen in Unterlagenbündeln	117
4.3	PCR-gestützte Methoden zur Untersuchung von genetischen Unterschieden von Pflanzensorten.....	118
4.3.1	Die Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse	119
4.3.1.1	Unterscheidung der Unterlagssorten <i>Kober 5 BB</i> und <i>Teleki 5 A</i> <i>Goseck</i>	122
4.3.1.2	Stabilität und Reproduzierbarkeit der RAPD-Primer.....	124

4.3.1.3 Identifikation von Unterlagssorten mit Hilfe der RAPD-Analyse	125
4.3.2 Genetischer Zusammenhang der Unterlagssorten <i>5 C</i> , <i>5 BB</i> , <i>8 B</i> , <i>125 AA</i> , <i>SO 4</i> sowie <i>Börner</i> und <i>3309 C</i>	127
4.3.3 Untersuchungen zur genetischen Varianz der Unterlagenklone der Sorten <i>SO 4</i> , <i>5 BB</i> und <i>5 C</i> sowie der Unterlagssorte <i>Binova</i>	129
4.3.3.1 Die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analyse	130
4.3.3.2 Die Unterlagssorten <i>SO 4</i> und <i>Binova</i>	131
4.3.3.3 Untersuchungen zur genetischen Varianz von Unterlagenklonen mit der AFLP- und SAMPL-Analyse	132
5. Ausblick	137
6. Zusammenfassung	138
7. Literatur	140
8. Anhang	152

1. Einleitung

Das Einschleppen der Reblaus von Amerika nach Europa Mitte des 19. Jahrhunderts veränderte die gesamte traditionelle europäische Rebkultur. Der Weinbau war niemals frei von Krankheiten und Schädlingen, jedoch führte die Reblaus den Weinbau Europas in kürzester Zeit an den Rand seiner Existenz.

Erst die Erkenntnis, dass einige amerikanische Rebartensorten der Reblaus widerstehen können, führte zur allgemeinen Verwendung der Pfropfrebe. Reblauswiderstandsfähige amerikanische Unterlagen dienten als Wurzelbildner und wurden mit den empfindlichen europäischen Ertragsreben veredelt. Daraus entwickelte sich die heute übliche Pfropfrebe.

1.1 Sortenunterscheidung von Unterlagsreben

Jede Unterlagsorte besitzt spezifische Eigenschaften bezüglich ihrer Adaption an Boden- und Umweltbeschaffenheiten, sowie Unterschiede in ihrer Affinität zum Edelreis. Weiterhin weisen sie Unterschiede in ihrer Toleranz oder Resistenz gegenüber verschiedenen Krankheiten und Schädlingen auf.

Mit der Vielzahl verschiedenster Unterlagsorten, darunter auch Wildformen und durch Züchtung entstandene Kulturformen, stellte sich die Problematik der exakten Klassifizierung und späteren Identifizierung der einzelnen Sorten.

Jährlich werden in Deutschland ca. 30 Millionen Unterlagen gehandelt (BUNDESVERBAND DER REBENPFLANZGUTERZEUGER pers. Mitteilungen). Um Fehlplantagen und damit finanzielle Verluste zu vermeiden, ist eine eindeutige Sortenbestimmung der Unterlagen unerlässlich.

Es gibt verschiedene Ansätze, die zur Unterscheidung und Identifizierung der Unterlagsorten führen sollten:

- Phänotypische Bestimmung (Ampelographie)
- Bestimmung durch biochemische oder molekularbiologische Marker

1.1.1 Die Ampelographie

Die Ampelographie (lat.: ampelos = Weinstock, graphie = beschreiben) war die erste Form der Unterscheidung bzw. Bestimmung der verschiedenen Rebsorten. Sie beschäftigt sich mit der systematischen Zuordnung der Rebsorten und –arten, ihrer Synonyme, Abstammung, Herkunft und Verbreitung. Traditionell werden Rebsorten anhand der klassischen Kriterien der Systematik, der Morphologie und Anatomie unterschieden. Zur Identifikation der einzelnen Sorten werden morphologische Merkmale wie das Aussehen von Trieb, Blättern, Blüten, Trauben, Beeren und Samen herangezogen. Weiterhin werden auch die für den Züchter wichtigen Merkmale, wie Phänologie, Physiologie und die Resistenzeigenschaften beschrieben (BUNDESSORTENAMT 2000).

Messbare Merkmale, wie die Länge der Blattrippen, Einschnitttiefe der Blattseitenbuchten, die Öffnungsweise bzw. Überlappung der Stielbucht, Zahnbreite und –länge, Beerenbreite und –länge sind einfach zu erfassen und liefern vergleichbare Ergebnisse. Auf diesem Weg wurde versucht, Sortenvergleiche anzustellen, bzw. Sortenidentitäten zu klären (GALET 1988).

Die Messung der Merkmale ist einfach, setzt aber Training voraus. Dazu kommt die Veränderung der Merkmale durch Umwelteinflüsse (Modifikationen). Morphologische Abweichungen aufgrund wechselnder klimatischer Bedingungen, sowie verschiedener Standorte stellen eine hohe Anforderung an den Beurteiler der Rebsorten. Ein hohes Maß an Erfahrung und Fachkenntnis ist erforderlich, um eine exakte Einteilung unter der Berücksichtigung aller verfügbaren Merkmale zu leisten.

Die ampelographische Sortenbestimmung stößt an ihre Grenzen, wenn zur Sortenbeurteilung nur Holz einer Unterlage zur Verfügung steht bzw. die Unterlage bereits veredelt und in einem Weinberg gepflanzt ist.

Unterlagen werden auf dem Rebenmarkt als 40 cm lange Holzstücke verkauft. Ein großer Anteil dieser Hölzer liegt geblendet vor, das bedeutet die Knospen dieser Pflanzen wurden vorher entfernt. Die ampelographische Sortenbestimmung mit Hilfe von gezogenen Stecklingen entfällt, da durch das Entfernen der Knospen keine grünen Pflanzenteile vorhanden sind.

Bereits veredelte oder gepflanzte Unterlagen könnten nur noch anhand ihrer Wurzel identifiziert werden. Dies ist jedoch mit der Ampelographie ebenfalls nicht zu leisten.

Somit wurden Alternativen gesucht, die eine Ergänzung zur Ampelographie darstellten.

1.1.2 Biochemische/molekularbiologische Marker zur Unterscheidung von Rebsorten

Mit der Verwendung von biochemischen bzw. molekularbiologische Methoden sollten die Grenzen der Ampelographie überwunden werden. Dies setzte voraus, dass die idealen Marker stabil und nachweisbar in allen Pflanzengewebe sind, unabhängig von Wachstum und Pflanzenorgandifferenzierung. Zudem sollten sie nicht sensitiv auf Umweltbedingungen reagieren (FOWLER et al. 1994, CAETANO-ANOLLÈS 1998).

Zu den ersten Methoden, die diesem Problem begegneten, zählten die Isoenzym-Analytik (WEEDEN et al. 1988, WALKER und BOURSQUOT 1992) und die Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-Analyse (WALTERS und POSLUSZNY 1989, PARFITT und ARULSEKAR 1989, BECKMANN und SOLLER 1983, YAMAMOTO et al. 1991, MAURO et al. 1992).

1.1.2.1 Isoenzyme

Die Isoenzym-Analyse beruht darauf, dass aus einzelnen Gewebeteilen der Pflanze verschiedene Isoenzyme extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Anhand der unterschiedlichen Proteinmuster wurde versucht, verschiedene Rebsorten voneinander abzugrenzen. Die hierbei auftretenden Probleme waren, dass die Isoenzyme weder innerhalb der Pflanze, noch innerhalb der Zellen gleich verteilt waren (WEEDEN et al. 1988, WALKER und BOURSQUOT 1992). WALKER und BOURSQUOT konnten innerhalb einer Studie, kombiniert aus Ampelographie und Isoenzym-Analyse, die Falschbenennung der Unterlagssorte *5 C* als *SO 4* klären. Weiterhin testeten WALKER und LIU (1995) mit sieben Isoenzymen 60 Unterlagssorten. Der Vergleich und damit die Auswertung der einzelnen Isoenzymmuster erwiesen sich als schwierig, wenn die Proben auf unterschiedlichen Gelen liefen. Es war nicht möglich, eng verwandte Sorten voneinander abzugrenzen, beispielsweise *Teleki 5 A* und *Kober 5 BB*. Die Isoenzym-Analyse findet weiterhin ihren Einsatz auch bei anderen Kulturpflanzen, z. B. in Gerste (PAPA et al. 1998) und Reis (DEVANAND et al. 1999).

1.1.2.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-Analyse

Die RFLP-Analyse macht sich die Eigenschaft der Restriktionsenzyme zu Nutze, den DNA-Doppelstrang an exakt definierten Restriktionsenzym-Bindungsstellen zu schneiden. Dadurch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, welche in einem Agarose-Gel aufgetrennt und mittels Southern-Blotting auf einer Membran immobilisiert werden. Zum Nachweis dieser Fragmente bedient man sich spezifischer Nukleinsäuren, sogenannte Sonden. Diese sind entweder mit radioaktiven Isotopen, mit fluoreszierenden Agenzien oder Digoxigenin markiert. Die mit der RFLP erzielten Ergebnisse zeigen, dass diese Methode durchaus zur Sortendifferenzierung geeignet ist (BOURQUIN et al. 1992, BOURQUIN et al. 1993). BOURQUIN et al. (1991) testeten 10 Unterlagssorten und eine Edelreissorte mit RFLP. Durch verschiedene Kombinationen von Restriktionsenzymen und Sonden war es ihm möglich, alle 11 Pflanzen zu identifizieren.

GUERRA und MEREDITH (1995) untersuchten die Nachkommenschaften der Kreuzung *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*. Dabei waren allerdings die Unterlagen *Teleki 5 A* und *Kober 5 BB* nicht voneinander abtrennbar.

Die Nachteile dieser Methode beruhen auf dem großen zeitlichen, technischen und kostenmäßigen Aufwand. Dies erschwert den routinemäßigen Einsatz dieser Methode. Weiterhin werden hohe DNA-Mengen benötigt und es existiert nur eine begrenzte Anzahl verwendbarer Marker (WINTER und KAHL 1995).

1.1.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) gestützte Methoden

Eine andere Gruppe von molekularbiologischen Markern basiert auf der Verwendung der Polymerasekettenreaktion. Die Methode der PCR (Polymerase chain reaction) wurde 1986 von K.B. Mullis eingeführt und durch den Einsatz von thermostabilen Polymerasen, wie zum Beispiel der Taq-Polymerase, gewonnen aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, automatisierbar (SAIKI et al. 1988).

Die PCR ermöglicht durch eine Abfolge von Reaktionen die fragmentarische Vermehrung und dadurch den Nachweis kleinster Mengen an DNA (Schema: Abbildung 1). Prinzipiell lagert sich zunächst ein Primer (Starter, Startpunkt der DNA-Synthese) bekannter Sequenz an einen komplementären Bindungsort von nicht bekannter Position auf dem Genom an.

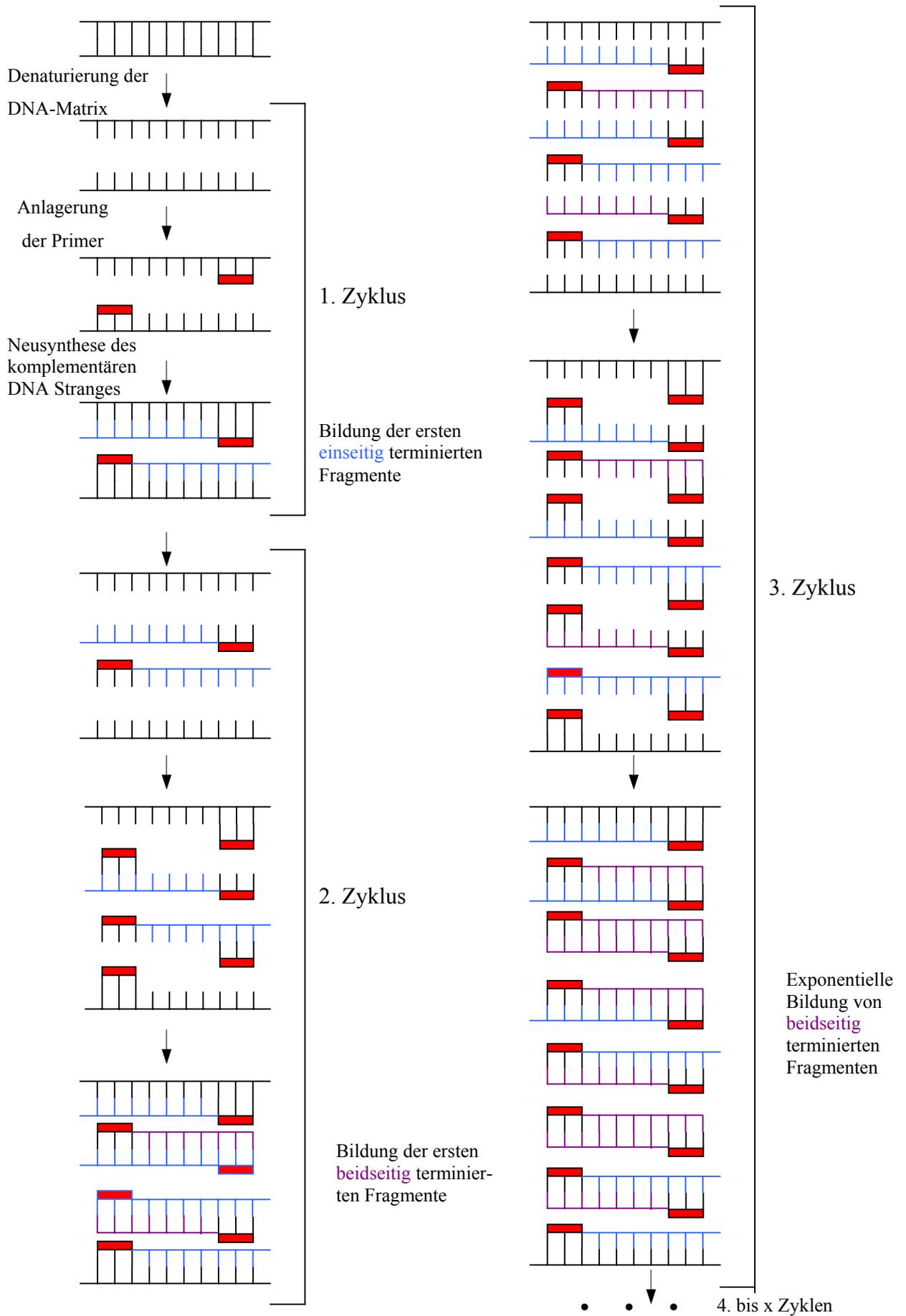


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Polymerasekettenreaktion (PCR).

Durch Hitze (Temperatur 94°C) wird im ersten Schritt der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge zerlegt (denaturiert). Ein nachfolgendes schnelles Abkühlen verhindert die Reassoziierung der einzelsträngigen DNA (siehe Abbildung 1). An die denaturierte, einzelsträngige DNA lagert sich der Primer komplementär an die Zielstellen der DNA an. Die Anzahl der zwischen diesen Bindungsorten liegenden Basen bestimmt, ob der durch die Primer eingegrenzte Bereich amplifiziert wird. Weiterhin hat die für die Synthese vorgegebene Zeit einen Einfluss darauf, ob ein eingegrenzter Bereich vervielfältigt wird.

Es gibt verschiedene Arten von Amplifikations-Produkten: einseitig terminierte Fragmente und beidseitig terminierte Fragmente. Diese unterschiedlichen Fragmente werden unterschiedlich häufig amplifiziert. Während die Konzentration der Ausgangs-DNA immer gleich bleibt, steigt der Gehalt an einseitig terminierten Fragmenten linear, die Konzentration an beidseitig terminierten Fragmenten exponentiell (LINZ und DEGENHARDT 1990). Man erhält ein extrem verstärktes Signal der beidseitig terminierten Fragmente, die durch Auftrennung innerhalb einer Gelelektrophorese ein Bandenmuster ergeben. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation dieser DNA-Fragmente können auch Spuren von DNA nachgewiesen werden.

Folgende Methoden machen sich dieses Verfahren zu Nutze:

- a) STS (Sequence tagged site) / STMS (Sequence-tagged microsatellite site) - Analyse
- b) RAPD (Random amplified polymorphic DNA) - Analyse
- c) SCAR (Sequence characterized amplified region) - Analyse
- d) AFLP (Amplified fragment length polymorphism) – Analyse
- e) SAMPL (Selective amplification of microsatellite polymorphic loci) - Analyse

a) Die Sequence Tagged Site (STS)-Analyse

Die STS-Analyse beruht darauf, dass in jedem Genom eine bestimmte Anzahl an repetitiven Strukturen auftreten, die in Gruppen oder Tandem-Strukturen über das gesamte eukaryotische Genom verteilt sind. Die hier verwendeten Satellitenstrukturen sind Mikrosatelliten, die von hochkonservativen Sequenzen flankiert sind. Diese Sequenzen werden als Primer eingesetzt, um die Mikrosatelliten-Strukturen zu amplifizieren. Mikrosatelliten zeigen einen individuellen, hochgradigen Polymorphismus und weisen codominante Vererbungscharakteristika auf.

Diese Analyse findet ihren Einsatz bei den verschiedensten Kulturpflanzen, wie beispielsweise im Rahmen der Kartierung des Genoms von Reis (WU und TANKSLEY 1993,

McCOUCH et al. 1997) und Zitrus (KIJAS et al. 1995), sowie zur Sortenunterscheidung beispielsweise der Kichererbse (HÜTTEL et al. 1999) und der Weinrebe (THOMAS et al. 1993). So zeigten erstmals THOMAS und SCOTT (THOMAS und SCOTT 1993, THOMAS et al. 1994) den Einsatz von STS-Markern zur Sortenidentifizierung von Ertragsreben. BOWERS et al. (1996) charakterisierten STS-Marker zur Identifizierung verschiedener Ertragsreben- und Tafeltraubensorten. SEFC et al. (1997) untersuchten 51 Rebsorten mit Hilfe von STS-Markern, unter anderem um Kreuzungsgruppen der Sorten Neuburger, Blauburger, Zweigelt und Müller-Thurgau zu klären. Weiterhin charakterisierten SÁNCHEZ-ESCRIBANO et al. (1999) 43 verschiedene Tafeltraubensorten.

Aufgrund ihrer hohen Spezifität müssen sie für jede Spezies identifiziert werden. Dies ist mit hohem Kosten- und Zeitaufwand aufgrund der Herstellung dieser Marker verbunden.

b) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analyse

Die RAPD-Analyse wurde 1990 unabhängig voneinander in zwei verschiedenen Laboratorien entwickelt (WELSH and McCLELLAND 1990, WILLIAMS et al. 1990). Diese Methode detektiert Nukleotidsequenzpolymorphismen mit einem einzigen oder auch mit paarweise genutzten Primern, die eine zufällig gewählte Nukleotidsequenz aufweisen (WELSH und McCLELLAND 1991). Die RAPD-Fingerprinting Methode gliedert sich in die Arbeitsschritte: DNA Isolierung, Polymerasekettenreaktion (PCR), Submarine Gelelektrophorese und Nachweis der amplifizierten Banden.

In der Regel werden Dekamer-Primer eingesetzt, deren Basensequenz zufällig gewählt wird. Die Anzahl und Größe der amplifizierten DNA-Fragmente ist abhängig von der eingesetzten Primer-Sequenz und der zu untersuchenden DNA-Matrize. Die RAPD-Marker sind dominante Marker. Mit ihnen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Genom hetero- bzw. homozygot ist (DEVOS und GALE 1992).

Die Methode ist wenig arbeitsaufwendig und erzielt schnelle Ergebnisse zur Untersuchung der genetischen Variabilität innerhalb und zwischen Populationen. Zudem werden nur geringe Mengen an DNA benötigt.

Der Vorteil der Methode, neben dem relativ niedrigen Arbeitsaufwand und den relativ niedrigen Kosten, ist, dass keine Notwendigkeit besteht, die DNA Sequenz zu kennen. Zudem ist die Methode schnell und gut zu automatisieren.

So wurde die RAPD-Methode in den verschiedensten Kulturpflanzen dazu benutzt, Kartierungen des Genoms durchzuführen, wie zum Beispiel bei Tomate (KLEIN-LANKHORST et al. 1991), *Arabidopsis* (WILLIAMS et al. 1993), Pfirsich (CHAPARRO et al. 1994) und

Äpfeln (CONNER et al. 1997). Weiterhin wurde die RAPD-PCR dazu verwendet, zwischen verschiedenen Sorten zu unterscheiden, so beispielsweise zur Sortendifferenzierung von Sojabohnen (JIANHUA et al. 1996), der Klassifizierung von Knoblauch-Sorten (BRADLEY et al. 1996), der Unterscheidung von Rosen-Spezies (DEBENER et al. 1996) und der Differenzierung von Rebsorten (COLLINS und SYMONS 1993, GOGORCENA et al. 1993, GRANDO et al. 1995).

MULCAHY et al. (1995) differenzierten 15 italienische Edelreissorten mit 3 RAPD-Primern, wobei es jedem dieser Primer möglich war, zwischen allen 15 Sorten zu unterscheiden.

Zudem wurde die RAPD-PCR dazu genutzt, um phylogenetische Fragestellungen zu klären (DEMEKE et al. 1992, FEDERICI et al. 1998, RUAS et al. 1999), so auch bei den Ertragsrebsorten (REGNER und MESSNER 1993, BÜSCHER et al. 1994, TSCHAMMER und ZYPRIAN 1994). GRANDO et al. (1995) untersuchten *Vitis vinifera* Sorten und *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* Individuen in ihrer genetischen Diversität mit 44 RAPD Primern und befand die RAPD-PCR für gut, um damit phylogenetische Bestimmungen durchzuführen.

c) Die Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)–Analyse

Diese Methode wurde erstmals von PARAN und MICHELMORE (1993) eingesetzt. Als Grundlage dieser Marker dienen meist RAPD-Marker. Mit Hilfe von RAPD-Primer wird das gewünschte Genom untersucht und die für die Fragestellung interessanten Banden kloniert und sequenziert. Anhand der erhaltenen Sequenz werden Primer synthetisiert, die mindestens 20 bp lang und dementsprechend spezifisch sind. PARAN und MICHELMORE stellten auf diese Weise PCR-Marker her, die mit dem Resistenzgen für Falschen Mehltau verbunden waren. XU et al. (1995) testeten 9 verschiedene Unterlagssorten mit 77 RAPD-Primer, wobei sie neun RAPD-Marker von sechs RAPD-Primern für die Entwicklung von SCAR-Primern verwendeten. Im darauf folgenden Jahr, 1996, wendeten XU und BAKALINSKY die entwickelten SCAR–Primer auf diese 9 Unterlagssorten an (XU und BAKALINSKY 1996). Dabei stellten sie fest, dass von den 9 SCAR-Markern 8 polymorph waren. Bis auf *Riparia Gloire* und *1616 Couderc*, sowie *SO 4* und *5 C*, konnten die untersuchten Unterlagssorten differenziert werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass höhere Annealing-Temperaturen verwendet werden können. Damit steigt die Spezifität des einzelnen Primers. Aufgrund der Spezifität sollte es möglich sein, Sorten nicht nur zu unterscheiden, sondern auch zu identifizieren. Allerdings ist der Polymorphismus der einzelnen Marker nicht sehr hoch, so dass es nicht

sinnvoll ist, SCAR-Marker zur Differenzierung einer großen Anzahl verschiedener Sorten zu verwenden (PARAN und MICHELMORE 1995). Weiterhin bedarf es durch die separate Entwicklung eines höheren Kosten- und Zeitaufwandes zur Herstellung jedes einzelnen Primers.

d) Die Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Analyse

Die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analytik ist eine verhältnismäßig neue Methode. Von VOS (VOS et al. 1995) entwickelt bietet sie die Möglichkeit, kleinste genetische Variationen zu detektieren. Der methodische Ablauf kann in vier Schritte unterteilt werden:

- Verdauung der genomischen DNA mit zwei Restriktionsenzymen, einem selten schneidenden und einem verhältnismäßig oft schneidenden Enzym (Digestion)
- Verbinden von Adaptoren mit den Restriktionsschnittstellen der entstandenen Fragmente (Ligation)
- Erste Amplifikation, die sogenannte Präamplifikation, innerhalb derer Primer verwendet werden, die sich in ihrer Basenzusammensetzung aus den Restriktionsschnittstellen, den Adaptoren sowie einem selektiven Nukleotide zusammensetzen.
- Zweite Amplifikation, die sogenannte selektive Amplifikation, innerhalb derer die gleichen Primer wie in der Präamplifikation verwendet werden, allerdings mit zwei zusätzlichen selektiven Nukleotiden.

Das Prinzip dieser Methode liegt darin, dass die genomische DNA eines Organismus geschnitten wird, wobei nun viele kleine Einzelfragmente entstehen. An diese entstandenen Fragmente werden nun sogenannte Adaptoren gebunden. Diese dienen als Verlängerung der Schnittstellen und als spätere Erkennungsstelle der Primer. Die erste Vorausscheidung aus den vielen verschiedenen Einzelfragmenten liefert die Präamplifikation. Die hier eingesetzten Primer weisen eine zusätzliche Base auf, das sogenannte erste selektive Nukleotid. Die abschließende zweite Amplifikation weist zwei zusätzliche Basen auf, wobei die restliche Sequenz gleich der Sequenz der Primer im Präamplifikationsschritt ist. Auf diesem Weg entsteht eine große Anzahl verhältnismäßig kleiner Fragmente, die innerhalb eines Polyacrylamidgeles in der Größe eines Sequenziergeles aufgetrennt werden. In Abbildung 2 ist der schematische Ablauf der AFLP-Analyse dargestellt.

Wie die RAPD so zählen auch die AFLP Marker zu den dominanten Markern.

Die AFLP wird zur markergestützten Selektion genutzt. So identifizierten CERVERA et al. (1996) mit Hilfe der AFLP und Bulk Analyse drei molekulare Marker für das Resistenzgen gegen *Melampsora larici-populina* in der Pappel.

Weiterhin findet die AFLP ihre Anwendung in Untersuchungen zur genetischen Beziehungen innerhalb und zwischen Populationen (ELLIS et al. 1997, CAICEDO et al. 1999, PALACIOS et al. 1999, MULUVI et al. 1999), sowie in Identifizierungen von Sorten und Wildformen der verschiedensten Kulturpflanzen (BARCACCIA et al. 1999). So benutzten ZHU et al. (1998) AFLP Marker zur Identifizierung und Klassifizierung von 57 verschiedenen Reissorten. Zudem studierten sie die genetische Diversität zwischen und innerhalb der verschiedenen Gruppen.

CERVERA et al. (1998) verwendeten die AFLP-Analyse zur Charakterisierung von *Vitis vinifera* L. Sie testeten 67 verschiedene Ertragsrebsorten aus einem spanischen Sortiment getestet. Dabei stellte sich heraus, dass unterschiedliche Genotypen unter demselben Namen aufgeführt wurden (Homonyme), sowie gleiche Genotypen teilweise unterschiedliche Namen besaßen (Synonyme). Weiterhin war es dieser Gruppe möglich, Klone einer Sorte zu charakterisieren.

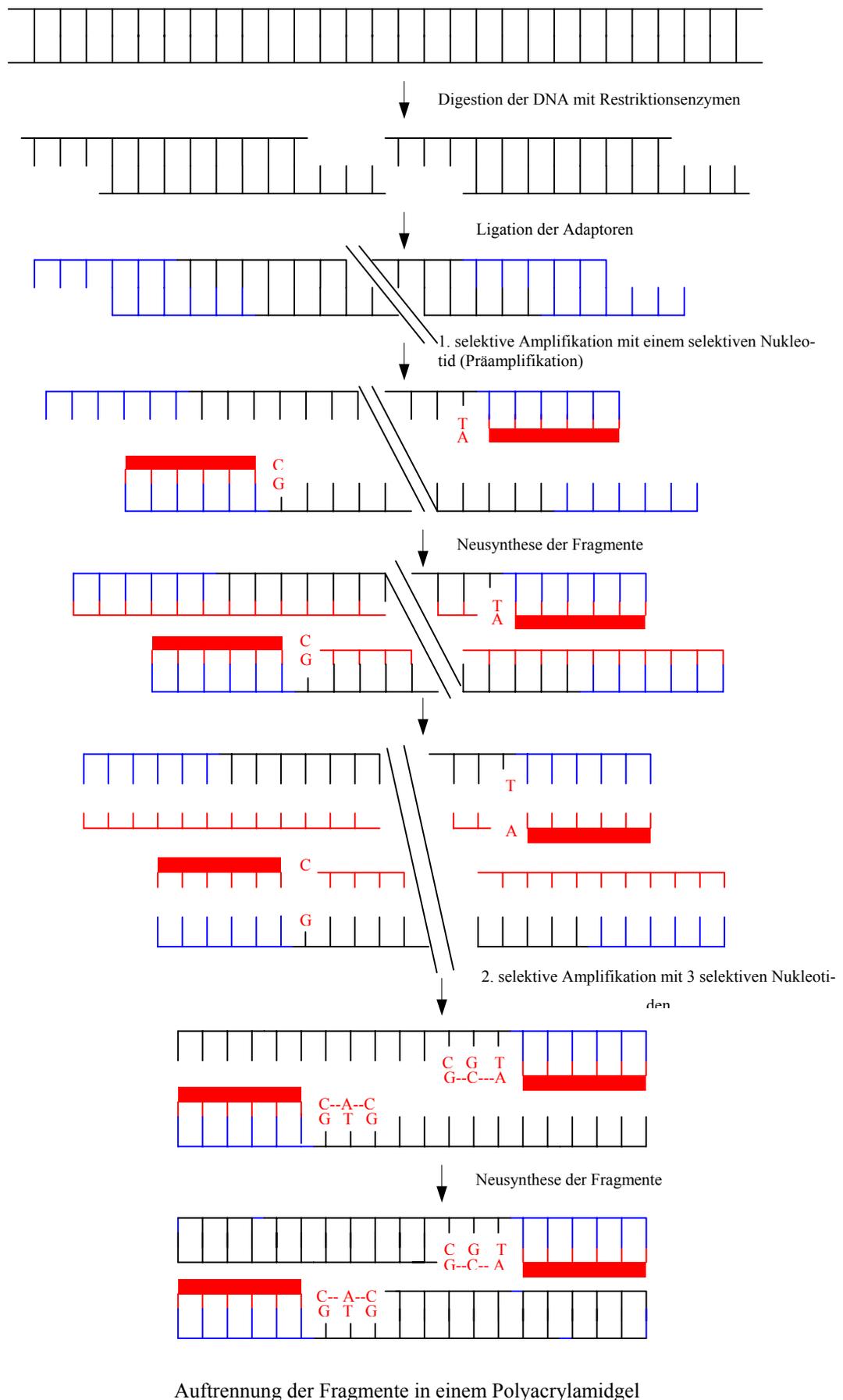


Abb. 2: Schematischer Ablauf der AFLP-Analyse.

e) Die Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (SAMPL)–Analyse

Die als SAMPL bezeichnete Methode stellt eine Kombination aus Mikrosatelliten- und AFLP-Analyse dar. Sie wurde erstmals von PAGLIA und MORGANTE eingeführt (PAGLIA und MORGANTE 1998). Sie nutzten diese Methode, kombiniert mit AFLP, zur Identifikation von molekularen Markern im Coniferen Genom.

Der Arbeitsablauf dieser Methode entspricht dem der AFLP-Analyse. Abbildung 3 stellt die Arbeitsabläufe der AFLP- und SAMPL-Analysen im Vergleich zueinander dar. Die Ziel-DNA wird mit einem selten und einem häufig schneidenden Restriktionsenzym geschnitten. An diese Schnittstellen werden Adaptoren gebunden, um Bindungsstellen für Primer zu schaffen. In einer ersten Amplifikation wird aufgrund eines selektiven Nukleotides eine Vorauswahl aus den entstandenen Einzelfragmenten getroffen. In der zweiten selektiven Amplifikation wird, im Gegensatz zur AFLP, ein Primer mit einer Dinukleotid-Mikrosatellitenstruktur verwendet, sowie ein AFLP-Primer mit drei selektiven Nukleotiden. Das Bandenmuster weist dem entsprechend auch Mikrosatellitenstrukturen auf.

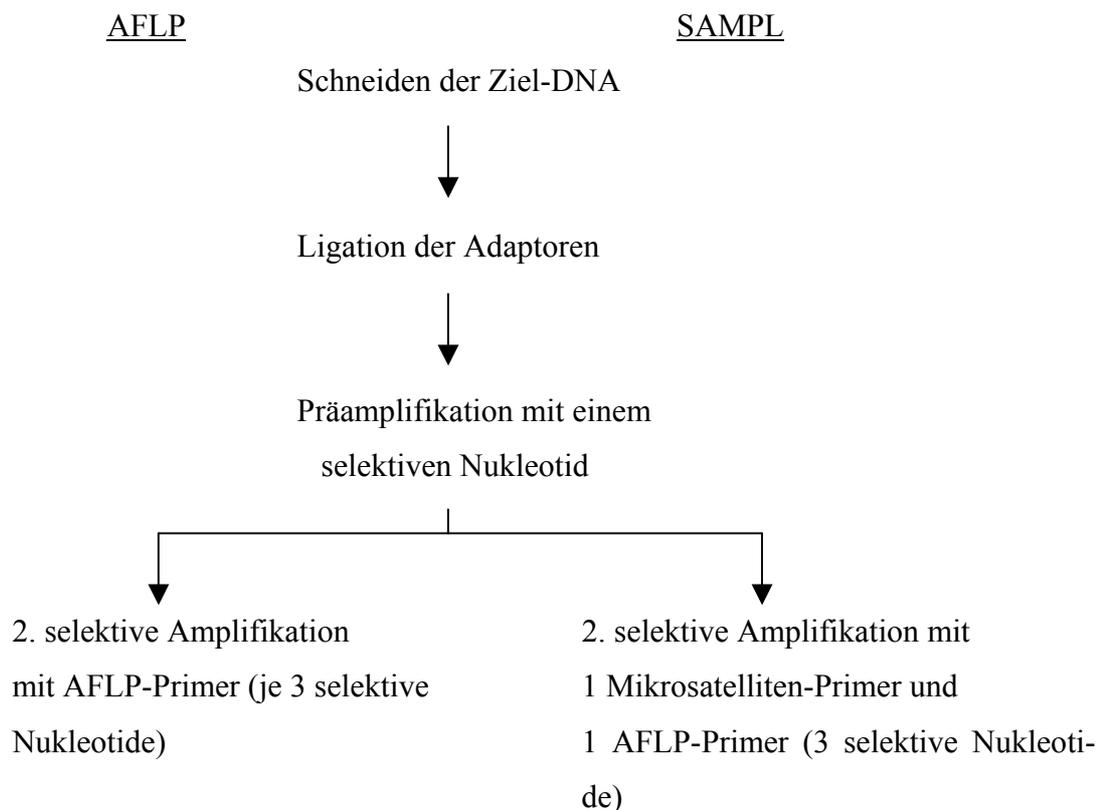


Abb. 3: AFLP- und SAMPL-Analyse im Vergleich der Arbeitsabläufe.

1.2 Problemfälle

1.2.1 Fremdholz in Bündeln von Unterlagen

Unterlagen werden zum größten Teil im europäischen Ausland wie Italien und Frankreich vermehrt. Bis in die 80er Jahre hinein wurde das in Deutschland benötigte Pflanzenmaterial zentral über die VO (Vermehrungsorganisation, damals Raiffeisen Frankfurt) in Italien und Frankreich eingekauft.

Die Kontrolle des Pflanzenmaterials erfolgte im Sommer und im Herbst innerhalb eines Jahres. Dabei wurden die Pflanzenbestände auf Gesundheit und Sortenreinheit, sowie auf Aufwuchsmenge und Qualität geprüft. Im Winter waren sogenannte Übernahmekontrolleure für den ordnungsgemäßen Zustand sowie für das vertragsgemäße Verladen des Materials verantwortlich. Zusätzlich wurden aus dem angelieferten Unterlagenmaterial einzelne Hölzer als Stecklinge herangezogen und zum Austrieb gebracht. Aufgrund der morphologischen Merkmale der aufgezogenen Pflanzen konnte die Sorte des Stecklings bestimmt und die Sortenechtheit überprüft werden.

Mit der Öffnung des europäischen Marktes wurde das System der VO auf europäischer Ebene unhaltbar und es wurden alle diesbezüglichen Verträge durch die Unterlagszüchter aufgekündigt. In der Folge mussten sowohl die Herbstkontrolle, als auch die Übernahmekontrolle während des Winters entfallen, da es keine zentralen Kaufverträge mehr gab und nur die EU-Grundanforderung gemäß EU-Richtlinie 192/68 zu erfüllen war.

Dies führt dazu, dass der Rebenveredler Unterlagenholzbündel mit je 200 Holzstücken pro Bündel erhält. Diese Bündel sind etikettiert und verplombt. Durch das Angebot von geblendeten Unterlagen wird die Form der stichprobenartigen Aufzucht zur Sortenkontrolle unmöglich, da das Entfernen der Knospen den Austrieb des Stecklings verhindert. Dies ist besonders kritisch im Falle der Unterlagssorte *Börner*. Seit dem vermehrten Wiederauftreten der Reblaus Anfang der 90er Jahre ist es gesetzlich vorgeschrieben, dass reblausverseuchte Flächen gerodet und ein Jahr brach liegen oder mit Ertragsreben, die auf *Börner* gepfropft sind, bepflanzt werden. Mögliche Verwechslungen des Materials zeigen sich erst im bereits bepflanzten Weinberg.

1.2.2 Untersuchungen zur genetischen Varianz von Klonen

Innerhalb der Rebenzüchtung ist Klonselktion ein Verfahren, leistungsfähiges Pflanzenmaterial zu gewinnen. Wenn von einem Klon (griechisch: Zweig) gesprochen wird, so ist darunter die vegetative Nachkommenschaft einer Rebe zu verstehen. Ein Klon bleibt so lange konstant und kann auf eine erbgleiche, unbegrenzt große Individuenzahl erweitert werden, solange keine Mutationen eintreten. Spontane Mutationen sind bei der Rebe keineswegs selten. Meist bleiben sie äußerlich unerkannt, bewirken aber physiologische Änderungen und beeinflussen damit die Leistung der Rebe. Bei verschiedenen Sorten haben sich über viele Jahrhunderte ihrer Kultur die unterschiedlichsten Typen gebildet, die im Extremfall sogar die Sortengrenze überschreiten und zu einer eigenen Sorte werden können. Auf diesen Variationen beruhen letztendlich die Möglichkeiten der Klonselktion (BECKER 1980, SCHÖFFLING und STELLMACH 1993).

Es wurde mit verschiedenen Methoden versucht, Klone von Ertragsrebsorten zu trennen.

So untersuchten beispielsweise REGNER et al. (1998) Burgunder-Klone mit Hilfe der RAPD- und Mikrosatelliten-Analyse. Sie fanden mit der Mikrosatelliten-Methode keine Polymorphismen zwischen den Burgunder-Farbtypen und Burgunder-Klonen. Dagegen wiesen diese Pflanzen innerhalb der RAPD-Analyse Unterschiede auf. Die jüngste Methode zur Differenzierung von Klonen von Ertragsreben wurden von GEUNA et al. (2000) eingeführt. Hier wurde die 5'untranslatierte Sequenz und der Promotor der Gene für die Enzyme Stilbene Synthase und Chalzon Synthase kloniert, sequenziert und entsprechende Primer synthetisiert. Diese Enzyme sind in den Metabolismus von Phenylpropanoiden involviert. Mit diesen Primern konnte die Gruppe Klone der Sorten *Sangiovese*, *Pinot noir* und *Chardonnay* differenzieren.

Klone von Unterlagsorten waren diesbezüglich noch nicht untersucht worden. Im Sinne des Wiedererkennens der vom Züchter selektionierten Klone wäre es wünschenswert, wenn die Möglichkeit der genetischen Differenzierung der Klone bestünde.

1.3 Problemstellung – Thema der Arbeit

Das Thema dieser Arbeit gliederte sich in drei Bereiche.

1. Da bei der Verarbeitung von Unterlagenhölzern kein grünes Pflanzenmaterial zur Verfügung steht und damit keine morphologischen Charakteristika zur Sortenunterscheidung herangezogen werden können, sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die Sorte einer Unterlagsrebe in jedem Entwicklungs- und Verarbeitungsstadium zu erkennen. Dies schloss Untersuchungen zur Extraktion von DNA aus Wurzelmaterial von Freilandpflanzen und Untersuchungen zu Sortenvermischungen in Unterlagenholz Bündeln mit ein.
2. Die Sortenunterscheidung von Unterlagsreben sollte auf eine breite Basis gestellt werden. Hierbei sollten die verschiedenen Wildrebenformen und Unterlagsorten auf ihre Differenzierbarkeit hin untersucht werden. Zudem sollte die Fragestellung der Identifizierung von Unterlagsorten durch die RAPD-Analyse untersucht werden. Aufgrund der oftmals angeführten unzureichenden Reproduzierbarkeit der RAPD-Banden wurde besonders auf die Stabilität und Optimierung der Methode geachtet.
3. Klone von Unterlagsorten sind ampelographisch nicht zu unterscheiden. Sie zeigen aber physiologische Unterschiede. Es sollten erste Untersuchungen zur genetischen Varianz innerhalb von Klonen von Unterlagsorten durchgeführt werden. Dazu wurden exemplarisch die Klone der Unterlagsorten *SO 4*, *5 BB* und *5 C* sowie die Unterlagsorte *Binova* untersucht.

2. Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Bezugsquellen</u>
Blender	Kenwood, Japan
Extraktionsbeutel	Bioreba, Reinach, Schweiz
Film	Kodak T400 CN
Geldokumentationsgerät	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	
- horizontal	Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
- vertikal	Biorad, München, Deutschland
Geltrockner	Biorad, München, Deutschland
Glasgeräte	Schott, Mainz, Deutschland
Homogenisator	Bioreba, Reinach, Schweiz
Hybridisierungssofen	Hybaid & AGS, Heidelberg, Deutschland
Hyperfilm, Röntgenfilm	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Netzgeräte	Schleicher und Schüll Dassel, Deutschland
	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
	Biorad, München, Deutschland
Schüttelwasserbad	Köttermann, Uetze-Hämigsen, Deutschland
- NTSYS-PC, Software 2.0	Exeter Software, Setanket, USA
- RFLPscan Plus 3.1	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Spektralphotometer	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Steril Filter, Porengröße 0,2 µm	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Thermocycler	
- Trio Block	Biometra, Göttingen, Deutschland
- Perkin Elmer 9600 thermocycler	Perkin Elmer, USA
- Perkin Elmer Thermocycler	Perkin Elmer, USA
- Robocycler	Stratagene, USA
UV-Lampe	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus)	Heraeus, Osterode, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

<u>Substanzen</u>	<u>Bezugsquellen</u>
Acrylamid	Biorad, München, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammonium Persulfat	Biorad, München, Deutschland
Bindesilane	Promega, Madison, USA
Borsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calcium-Hypochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
CTAB	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DDT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
dNTP-Set	MBI Fermentas, St.-Leon Rot, Deutschland
EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ficoll (Type 400)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gen Ruler™ DNA (Ladder Mix)	MBI Fermentas, St.-Leon Rot, Deutschland
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kalium Acetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesium Acetat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ -EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na CO ₃	J.T.Baker, Deventer Holland
Natrium-Thiosulfat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Octanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Oligonukleotide	University of British Columbia (UBC) MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
³³ P	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Olfendorf, Deutschland
PVPP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Biozym, Diagnostik GmbH, Hess. Olfendorf, Deutschland
Repelsilane	Biorad, München, Deutschland
Restriktionsenzyme	
- <i>Eco</i> RI	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
- <i>Mse</i> I	New England Biolabs, Frankfurt, a.M., Deutschland

SAMPL-Primer	urheberrechtlich geschützte Primersequenzen, DUPONT, USA
Silberfärbung, Kit	Promega, Madison, USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spermium	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St.-Leon Rot, Deutschland
	Boehringer, Mannheim, Deutschland
T4 Ligase	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
T4 Polynukleotidkinase	La Roche, Mannheim, Deutschland
TEMED	Biorad, München, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylene Cyanole	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.3 Holzmaterial

Das verwendete Holzmaterial wurde von Unterlagsreben in Gewächshäusern und im Freilandsortiment der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet für Rebenzüchtung und Rebenveredlung in den Feldern N und S geschnitten. Sorten, die im Fachgebiet derzeit nicht vorhanden waren, wurden aus Neustadt und Italien bezogen. Das Holz wurde zur Oberflächensterilisierung in Chinosol (0,5%ig) eingelegt, anschließend bei 0°C im Kühlraum in Plastiktüten verpackt und gelagert.

Alle untersuchten Unterlagsreben wurden ampelographisch auf Sortenreinheit und serologisch im Rahmen von ELISA-Test auf Virusbefall hin überprüft.

2.1.4 Wurzelmaterial

Das benötigte Wurzelmaterial wurde von Gewächshaus- wie auch Freilandpflanzen entnommen. Die Wurzeln wurden ausgeschüttelt, gewaschen, in Plastiktüten verpackt und bei 0 °C im Kühlraum aufbewahrt.

Das aus der In-Vitro entnommene Wurzelmaterial wurde sofort innerhalb der Extraktion weiterverwendet.

2.2 Methode

2.2.1 Verwendete Lösungen

2.2.1.1 DNA-Extraktion

CTAB-Extraktionspuffer:	20 mM	Na-EDTA
	100 mM	Tris
	1,4 M	NaCl
	2 %	CTAB
	→	pH 8,0

Zugabe von 33,6 % Urea (8 M) direkt vor Verwendung

TE-Puffer:	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	→	pH 8,0

Chloroform:Octanol 24:1

5 M NaCl

96 %EtOH

76 %EtOH

2.2.1.2 Pufferlösungen zur Durchführung der RAPD-Analyse

Taq Polymerase-Puffer:	20 mM	Tris-HCl
	1 mM	DDT
	0,1 mM	EDTA
	100 mM	KCl
	0,2 mg/ml	BSA
	0,5 %	Nonidet P40
	500 %	Glycerol
	→	pH 7,5
10* PCR Puffer:	750 mM	Tris-HCl
	200 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,1 %	Tween 20
	→	pH 8,8
Proben- /Stoppuffer:	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylene Cyanol FF
	10 %	Ficoll (Type 400)

2.2.1.3 Pufferlösungen zur Durchführung der AFLP- und SAMPL-Analyse

Digestion/Ligation Puffer:	100 mM	Tris
	100 mM	Mg-Acetat
	500 mM	K-Acetat
	50 mM	DTT
	500 µg/µl	BSA
	→	pH 7,5
	Kination-Puffer:	250 mM
100 mM		MgCl ₂
50 mM		DTT
5 mM		Spermium
→		pH 7,5

PCR Puffer 10*:	100 mM	Tris
	25 mM	MgCl ₂
	500 mM	KCL
	→	pH 8,3
Formamid-Puffer:	10 mM	NaOH
	95 %	Formamid
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylene Cyanol FF

2.2.1.4 Polyacrylamidgellösung

für 100 ml Gellösung :

10 %	APS
80 µl	TEMED
4,5 %	Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)
7,5 M	Urea
1x	TBE

2.2.1.5 Laufpuffer

10*TAE-Puffer:	2 M	Tris
	1 M	Essigsäure
	50 mM	EDTA (Na ₂ -EDTA)
	→	pH 8,3
10* TBE-Puffer:	107,8 g	Tris
	7,44 g	EDTA (Na ₂ -EDTA)
	55,0 g	Borsäure
	→	pH 8,0

2.2.1.6 Färbelösungen

Ethidium-Bromid: 1 % Stammlösung 10 mg/ml

Silberfärbung

Fixier-/Stopplösung: 0,5 % Eisessig
 95 % Ethanol
 2000 ml Aqua bidest.

Färbelösung: 2 g Silbernitrat
 3 ml 37 % Formaldehyd
 2000 ml Aqua bidest.

Entwicklerlösung: 60 g Natriumcarbonat
 3 ml 37 % Formaldehyd
 400 µl 10 mg/ml Natriumthiosulfat
 2000 ml Aqua bidest.

2.2.2 DNA-Extraktion

2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Holz

Die DNA wurde gemäß WOLF (1996), modifiziert nach LODHI et al. (1994), extrahiert. Zunächst wurde die Rinde des Holzes entfernt und dieses in 1-2 mm dünne Scheiben geschnitten. Davon wurden 0,5 g eingewogen und in einem Extraktionsbeutel sofort mit 5 ml Extraktionspuffer und einer Spatelspitze PVPP versetzt. Die Holzscheiben wurden zuerst grob mit einem Hammer zerklopft und anschließend in einem Flachbetthomogenisator zerrieben. Von der hierbei gewonnenen Suspension wurden 1,5 ml entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde im Wasserbad bei 65 °C für 30 min inkubiert. Nach anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur schloss sich eine Zentrifugation von 10 min bei 13000 rpm an. Der Überstand wurde abgezogen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,5 ml Chloroform:Octanol (24:1) zugesetzt, vorsichtig

gemischt und erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgezogen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,75 ml Chloroform:Octanol (24:1) versetzt. Nach wiederholtem Zentrifugieren für 10 min bei 13000 rpm wurde der wässrige Überstand zu gleichen Teilen auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die jetzt jedem Reaktionsgefäß zugesetzte Menge an 5 M NaCl-Lösung entsprach der Hälfte des enthaltenen Probenvolumens. Es wurde mit 4 °C kaltem 96 % EtOH aufgefüllt und die DNA bei 4 °C für 30 min ausgefällt.

Die DNA wurde bei 13000 rpm für 10 min pelletiert und das 96 %ige EtOH vom entstandenen Pellet abgezogen. Anschließend wurde das Pellet mit 0,5 ml 4°C kaltem 76 %igem EtOH gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 13000 rpm wurde das restliche EtOH möglichst vollständig abgezogen und das Pellet 30 min an der Luft getrocknet.

Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst und die getrennten Proben wieder vereinigt. Es entstand somit ein Endvolumen von 100 µl pro Probe.

Anschließend erfolgte photometrisch die quantitative DNA-Bestimmung.

2.2.2.2 Extraktion von DNA aus Wurzeln von Freilandreben

Die Wurzeln wurden zunächst gründlich von Erde gesäubert. Vor der Extraktion der DNA wurde eine Oberflächendesinfizierung der Wurzeln mit Calcium-Hypochlorid vorgenommen. Dabei wurde entsprechend WOLF et al. (2000) eine 2,5 %ige Calcium-Hypochloridkonzentration eingesetzt. Die Inkubationszeiten für dünne Wurzeln betragen 45 min, für dicke Wurzeln 60 min. Danach wurden die Wurzeln in sterilem Aqua dest. 5, 10 und 20 min gewaschen und die Rinde abgeschabt.

Die weitere Extraktion wurde wie unter 2.2.2.1 beschrieben durchgeführt.

2.2.2.3 DNA-Extraktion von großen Holzvolumina

Holzvolumina von 15 g wurden in einem Blender unter Zugabe von 150 ml CTAB-Extraktionspuffer und 1 g PVPP zerkleinert. Zur Ermittlung des optimalen Holzaufschlusses, wurden Zeiten von 1, 3, 5, 10, 15, 30 und 45 min. untersucht. Nach Ablauf der jeweiligen Zeiten wurden Doppelproben entnommen und die DNA wie unter 2.2.2.1 beschrieben extrahiert.

2.2.3 Quantitative DNA-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung wurde mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm durchgeführt. Der Gehalt an DNA wurde wie folgt berechnet:

$$C = OD_{260} \times 50 \mu\text{l} / \text{ml} \times \text{VF} / 40 \mu\text{l}$$

C : Konzentration der DNA

OD₂₆₀: Optische Dichte bei 260 nm

VF: Verdünnungsfaktor

1 OD₂₆₀ entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml.

Nach Errechnen des DNA-Gehaltes wurde die DNA auf eine Arbeitskonzentration von 5 ng/µl verdünnt.

2.2.4 Durchführung der Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)- Analyse

2.2.4.1 Primer zur Durchführung der RAPD-Analyse

Die Primer lagen in tiefgefrorenem, luftgetrocknetem Zustand vor. Sie wurden in TE-Puffer gelöst und mit steril gefiltertem Aqua bidest. auf eine Arbeitskonzentration von 0,2 mM verdünnt.

Die zur Untersuchung der Unterlagssorten verwendeten Primer waren #722, #726, #746, #751, #758 und #778 aus dem Set 100/7. In Tabelle 1 sind diese Primer mit ihren Sequenzen aufgeführt. Bei Primern #722b/c, #726b/c und #751b/c handelte es sich um 12mer Primer, die zur Ermittlung von sortenspezifischen Banden der Unterlagssorten *Börner*, *125 AA*, *SO 4*, *5 C*, *5 BB*, *8 B* und *3309 C* eingesetzt wurden (Tabelle 2). Für die Untersuchung zur genetischen Varianz der Klone von Unterlagssorten wurden Primer aus dem Set 100/1, #128, #125, #156, #171, #181 und #188, verwendet (Tabelle 3).

Primer	Sequenz
#722	CCT CTC CCT C
#726	GGT GTG GGT G
#746	GGG TGT TGG G
#751	CCC ACC ACA C
#758	GGT TGG GTG G
#778	CCA CAC CAC A

Tab. 1: Sequenzen der Primer, die zur Sortenunterscheidung verwendet wurden.

In Tabelle 2 sind die Sequenzen der 12mer Primer mit ihren Ursprungsprimern aufgeführt.

10er Primer	Sequenz	12er Primer	Sequenz
#722	CCT CTC CCT C	#722b	CCT CTC CCT CCT
		#722c	CCT CTC CCT CTC
#726	GGT GTG GGT G	#726b	GGT GTG GGT GGT
		#726c	GGT GTG GGT GTG
#751	CCC ACC ACA C	#751b	CCC ACC ACA CCA
		#751c	CCC ACC ACA CAC

Tab. 2: Sequenzen der 12mer Primer.

Für die Untersuchung zur genetischen Varianz von Unterlagenklonen wurden RAPD-Primer mit einem G/C-Verhältnis von 70 % und Tetranukleotidstruktur verwendet.

Primer	Sequenz
#123	CCC GCC TTC C
#125	ACA GGG CTC A
#156	TGC CCC GAG C
#171	GAG GGC GAG G
#181	GAG CAC GGG G
#188	CGG GGG ATG G

Tab. 3: Sequenzen der Primer, die zur Klonunterscheidung verwendet wurden.

2.2.4.2. Herstellen der Desoxyribonukleotidtriphosphat-Arbeitslösung

Die verschiedenen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), dATP, dTTP, dCTP und dGTP lagen tiefgefroren und in einer Stammlösung von je 100 mM/ μ l vor. Durch die Entnahme von je 10 μ l aus der Stammlösung eines jeden dNTP wurde eine Arbeitsverdünnung in der Konzentration von je 10 mM hergestellt.

Die dNTP wurden zusammen in 60 μ l Aqua dest. gelöst.

Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Arbeitsverdünnung bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.4.3 Herstellen des Reaktionsansatzes für die RAPD-Analyse

Bevor der Reaktionsansatz durchgeführt werden konnte, wurden alle benötigten Substanzen bei $0\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Für die RAPD-Analyse wurde die Taq-Polymerase von MBI FERMENTAS benutzt.

Substanz	Konzentration
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 mM
Primer	0,2 mM
BSA	0,1 mg/ml
10* Puffer	1*
Taq-Polymerase	4 U

Tab. 4: Durchführung des RAPD-Reaktionsansatzes.

Der Reaktionsansatz (Tabelle 4) wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 20 μ l pro Ansatz aufgefüllt.

Je 20 μ l des Ansatzes wurden auf die entsprechenden 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend wurden 25 ng der verdünnten genomischen DNA zugegeben. Das Endvolumen des gesamten Reaktionsansatzes betrug 25 μ l.

Die so vorbereiteten Proben wurden für 10 sek zentrifugiert und in den Thermocycler gegeben.

2.2.4.4 Programme zur Durchführung der RAPD-Analyse

Im Falle der Sortenunterscheidung der Unterlagsreben mit Hilfe der RAPD-Analyse wurde das folgende optimierte Programm (Tabelle 5) eingesetzt. Alle Programme wurden mit RAMP-Zeiten von 0,3 °C/sek programmiert. Die RAMP-Zeit ist die Zeit die der Thermocycler zum Aufheizen oder Abkühlen der Temperaturen benötigt.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	95	5 min
2	95	1 min
3	45	1 min
4	72	2 min
5	72	5 min
6	4	HOLD

} 37 x

Tab. 5: Programm zur Durchführung der RAPD-Analyse zur Sortenunterscheidung von Unterlagsreben.

Ab dem Schritt 4 erfolgte 37x eine Schleife zum Schritt 2.

Die zur Klontrennung durchgeführten RAPD-PCR Reaktionen erfolgten zusätzlich mit folgenden Programmen. Für Primer #156 stellte sich Programm 1 (Tabelle 6) als optimal heraus, für Primer #123, #125, #171, #181 und #188 Programm 2 (Tabelle 7).

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	95	5 min
2	95	1 min
3	35	30 sek
4	72	2 min
5	72	5 min
6	4	HOLD

} 34 x

Tab. 6: Programm 1 zur Durchführung der RAPD-PCR zur Klontrennung mit Primer #156.

Ab Schritt 4 erfolgte 34x eine Schleife zu Schritt 2.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	95	5 min
2	95	1 min
3	35	15 sek
4	40	15 sek
5	72	2 min
6	72	5 min
7	4	HOLD

34 x

Tab. 7: Programm 2 zur Durchführung der RAPD-PCR zur Klontrennung mit Primer #123, #125, #171, #181 und #188.

Ab Schritt 5 erfolgte 34x eine Schleife zu Schritt 2.

Alle Untersuchungen zur Sortentrennung der Unterlagen und deren Klone innerhalb der RAPD-Analyse wurden mit dem Trioblock von Biometra durchgeführt.

Nach Beendigung des Programms wurde die Reaktion mit Probenpuffer abgestoppt und die erhaltenen Fragmente in einem 1,3% igem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Fragmente fand in einer horizontalen Gelelektrophorese mit einem 1,3%igen Agarose-Gel statt. Die Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer angesetzt und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Nach Abkühlen der Agarose wurde diese in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und härtete für eine halbe Stunde aus. Die Begrenzungen des Gelschlittens wurden entfernt, der Schlitten mit dem Agarosegel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Laufpuffer überschichtet. Als Molekulargewichtsstandard für lineare, doppelsträngige DNA wurde der Gen Ruler™ DNA (Ladder Mix) von MBI FERMENTAS benutzt. Hierbei handelte es sich um ein synthetisiertes Marker-Gemisch mit folgenden Fragmentlängen (bp): 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 200, 1 031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. Es wurden 10 µl des Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Im Folgenden wurde der Molekulargewichtsstandard mit ‚M‘ gekennzeichnet.

Schließlich wurden 20 µl der Probe in die Taschen eingefüllt und ein Strom von 6 V/cm (120 V, 500 mA) angelegt. Nach 4 Stunden wurde der Gellauf beendet und das Gel mit Ethidiumbromid nach SAMBROOK et al. (1989) angefärbt.

2.2.6 Durchführung der Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Analyse

Die AFLP-Analyse (VOS et al. 1995) beinhaltet vier Arbeitsschritte: das Schneiden der DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (Digestion), die Bindung von Adaptoren an die Restriktionsschnittstelle der entstandenen DNA-Fragmente (Ligation), die Präamplifikation und schließlich die selektive Amplifikation. Es entsteht eine große Anzahl relativ kleiner Fragmente, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Alle verwendeten Primer innerhalb der AFLP-Analyse wurden mit freundlicher Genehmigung von CERVERA (pers. Mitteilungen 2000) im Rahmen des DAAD Programms Acciones-Integradas zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten bezüglich der AFLP- und SAMPL-Methoden wurden am Departamento de Genetica Molecular de Plantas, Madrid, Spanien durchgeführt. Die AFLP- sowie die SAMPL-Analyse wurden mit einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler durchgeführt.

2.2.6.1 Herstellen der Nukleotid-Arbeitslösungen

Zur Durchführung der AFLP-Analyse wurden verschiedene Nukleotid - Arbeitsverdünnungen hergestellt.

a) Das ATP lag in einer Stammlösung von 100 mM vor. Für die Ligation wurde eine 10 mM Verdünnung benötigt.

Die ATP-Arbeitsverdünnung wurde zu je 10 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

b) Die dNTP lagen in einer Stammlösung von 100 mM vor. Für die Präamplifikation und die selektive Amplifikation wurde eine Verdünnung von 5 mM benötigt.

Die dNTP-Arbeitslösungen wurden zu je 20 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 Restriktion der extrahierten DNA

Nach Quantifizierung der extrahierten genomischen DNA (siehe 2.2.3) wurden 250 – 500 ng DNA für die Digestion eingesetzt. Das Volumen eingesetzter DNA variierte aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der DNA-Proben. Das Endvolumen von 35 µl wurde durch Auffüllen des Ansatzes mit Aqua bidest. erreicht.

Für die AFLP-Analyse wurden zwei verschiedene Restriktionsenzyme genutzt, *Mse* I als häufig schneidendes und *Eco* RI als selten schneidendes Enzym.

Mse I erkennt Tetranukleotide mit der Sequenz TTAA, wobei *Mse* I mit 5'Überhang schneidet (5'... T'TAA ...3'). Die Zielsequenz von *Eco* RI ist ein Hexanukleotid mit der Sequenz GAATTC. Auch *Eco* RI schneidet mit 5'Überhang (5'... G'AATTC ...3').

Statistisch wird DNA von einem Enzym, das vier Nukleotide erkennt, jeweils nach 256 Nukleotiden (4^4) hydrolysiert. Ein Enzym, das ein Hexanukleotid erkennt, spaltet DNA statistisch nach jeweils 4096 Basenpaaren (4^6).

Damit Restriktionsendonukleasen ihre volle Spezifität entfalten können, müssen die Reaktionsbedingungen genau eingestellt werden, wobei die Salzkonzentration der wichtigste Parameter ist: Bei suboptimalen Salzkonzentrationen verlieren die Restriktionsendonukleasen häufig an Spezifität. Sie erkennen nicht mehr ihre exakte Erkennungssequenz, sondern hydrolysieren auch Stellen, die nur noch Teile der Erkennungssequenz repräsentieren. Derartige weniger spezifische Aktivitäten werden als ‚Sternaktivitäten‘ (star activity) bezeichnet. *Eco* RI neigt zur ‚Sternaktivität‘. Da mit beiden Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten wurde, musste die Salzkonzentration auf beide Enzyme gleichermaßen eingestellt werden. Aus diesem Grund wurde kein handelsüblicher Puffer verwendet, sondern ein Puffer, der sich für beide Restriktionsenzyme gleichermaßen eignete.

Substanz	Konzentration
<i>Eco</i> RI	0,3574 U
<i>Mse</i> I	0,171 U
Dig./Lig. Puffer	1*
DNA	?
Aqua bidest.	?

Tab. 8: Reaktionsansatz zum Schneiden der genomischen DNA mit *Eco* RI und *Mse* I. Die Volumina der eingesetzten DNA-Proben variieren zwischen den Reaktionsansätzen aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen. Deshalb ist das Volumen der DNA und die des Aqua bidest. von der jeweiligen DNA-Konzentration abhängig.

Die Reaktionsansätze (Tabelle 8) wurden 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.6.3 Verbinden der Adaptoren mit den DNA-Fragmenten - Ligation

Die für die Ligation notwendigen Adaptoren wurden in Aqua bidest. gelöst und auf eine Konzentration von 5 pmol/μl für Adaptor *Eco* RI und 50 pmol/μl für Adaptor *Mse* I in Aqua bidest. verdünnt (Tabelle 9).

	Name	Sequenz	benötigte Menge [μg]	Volumen [μl]
Adaptor für <i>Eco</i> RI	Ade 1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	11,89	400
	Ade 2	5'-AAT TGG TAC GCA GTC- 3'	10,5	
Adaptor für <i>Mse</i> I	Adm 1	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'	83,91	300
	Adm 2	5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'	73,425	

Tab. 9: Verdünnen der Adaptoren *Eco* RI und *Mse* I für die nachfolgende Ligation.

Der eigentliche Ligationsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen und wurde wie folgt pipettiert (Tabelle 10).

Substanzen	Konzentration
Adaptor <i>Eco</i> RI	1 U
Adaptor <i>Mse</i> I	10 U
ATP	1,6 mM
Puffer	1*
T4 DNA Ligase	0,24 U

Tab. 10: Herstellen des Ligations-Ansatzes.

Das Endvolumen des Ansatzes, aufgefüllt mit Aqua bidest., betrug 5 µl. Dieser wurde zu den 35 µl des Digestion-Ansatzes hinzupipettiert, so dass das Endvolumen 40 µl betrug. Der gesamte Reaktionsansatz wurde anschließend 3 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Abschließend wurde die geschnittene und ligierte DNA verdünnt, indem 160 µl Aqua bidest. zu dem Digestion-/Ligationansatz hinzupipettiert wurden. Schließlich lag ein Endvolumen von 200 µl vor.

2.2.6.4 Durchführung der ersten selektiven Amplifikation (Präamplifikation)

Die Sequenz der eingesetzten Primer wurde durch die Sequenz der Restriktionsschnittstellen und der eingesetzten und ligierten Adaptoren für *Eco* RI und *Mse* I bestimmt. Zusätzlich wurde jeweils ein Nukleotid an die Primersequenz angehängt (erstes selektives Nukleotid: *Eco* RI +1, *Mse* I +1). Dadurch wurde eine erste Selektion der zu vermehrenden Fragmente erreicht. In Tabelle 11 sind die verwendeten Primer dargestellt.

Primer	Sequenz
<i>Eco</i> RI +1	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3`
<i>Mse</i> I +1	5`-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3`

Tab. 11: Verwendete Primer für die Präamplifikation.

Für die Präamplifikation wurden der Polymerasen- (BOERHRINGER) und der Primer-Ansatz getrennt angesetzt (Tabelle 12, Tabelle 13).

Substanzen	Konzentration
PCR Puffer	1*
Taq Polymerase	0,024 U

Tab. 12: Herstellen des Polymerasen-Ansatzes (Taq-Mix).

Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua bidest auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Substanzen	Konzentration
Primer <i>Eco</i> RI +1	1,5 ng
Primer <i>Mse</i> I +1	1,5 ng
dNTPs	0,2 mM

Tab. 13: Herstellen des Primer-Ansatzes (Primer Mix).

Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 7 μ l aufgefüllt.

Für den Präamplifikations-Ansatz wurde die verdünnte DNA aus der Digestion/Ligation verwendet. Weiterhin wurden der Polymerasenansatz und der Primeransatz zusammenpipettiert (Tabelle 14).

Substanzen	Menge [μ l]
DNA	3
Taq Mix	10
Primer Mix	7
Endvolumen	20

Tab. 14: Durchführung des Präamplifikations-Ansatzes.

Folgendes Programm wurde zur Durchführung der Präamplifikation verwendet, wobei die jeweiligen Temperaturschritte 28x wiederholt wurden (Tabelle 15).

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	94	30 sek
2	60	60 sek
3	72	60 sek
4	4	HOLD

} 28 x

Tab. 15: Programm zur Durchführung der Präamplifikation.

Zur Überprüfung der Präamplifikation wurden nach Beendigung der Reaktion 3 µl des Präamplifikationsansatzes mit 4 µl Probenpuffer vermischt und auf ein 0,8 %iges Agarose-Gel (mit 1 % Ethidiumbromid) aufgetragen. Es wurde ein Strom von 9 V/cm angelegt. Nach 10 min wurde das Gel abgestoppt und die Präamplifikationsreaktion überprüft, sowie die Konzentration der präamplifizierten DNA visuell bestimmt (Abb. 4).

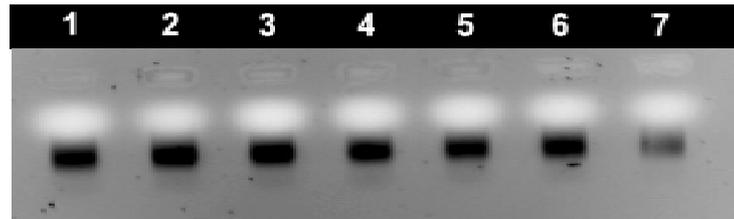


Abb. 4: Negativdarstellung der Präamplifikationsprodukte (Bahn 1-7) in einem 0,8 % Agarose-Gel, angefärbt mit Ethidiumbromid.

Je nach Intensität der entstandenen Bande erfolgte eine Verdünnung der Proben mit 100 µl, 160 µl oder 200 µl Aqua bidest.

2.2.6.5 Radioaktive Markierung des *Eco* RI Primer mit ^{33}P

Damit die Fragmente anschließend autoradiographisch nachgewiesen werden konnten, wurden die *Eco* RI Primer mit ^{33}P markiert (Tabelle 16).

Substanzen	Konzentration
Primer <i>Eco</i> RI +3	5 ng
Primer <i>Eco</i> RI +3	5 ng
[^{33}P] ATP	2 µCi
10* Puffer	1*
T4 Polynukleotidkinase	4 U

Tab. 16: Durchführung der Markierung der *Eco* RI +3 Primer (Kination).

Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua bidest auf ein Endvolumen von 0,625 µl aufgefüllt.

Es folgte eine Inkubation des Kination-Ansatzes bei 37 °C für 40 min. Durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 80 °C für 5 min wurde dieser abgestoppt und schließlich bei –20 °C gelagert.

2.2.6.6 Durchführung der zweiten selektiven Amplifikation

Die Primersequenzen für die zweite selektive Amplifikation setzten sich aus den Sequenzen der Primer der Präamplifikation und zwei zusätzlichen selektiven Nukleotiden zusammen (*Eco* RI +3, *Mse* I +3). In Tabelle 17 sind die Primer für die zweite selektive Amplifikation dargestellt.

Primer	Sequenz	Bezeichnung
<i>Eco</i> RI 1 +3	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAC C-3`	E 36
<i>Eco</i> RI 2 +3	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3`	E 38
<i>Mse</i> I 1 +3	5`-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3`	G 24
<i>Mse</i> I 2 +3	5`-GAT GAG TCC TGA GTA ACT C-3`	G 29
<i>Mse</i> I 3 +3	5`-GAT GAG TCC TGA GTA ACT T-3`	G 30
<i>Mse</i> I 4 +3	5`-GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3`	G 31

Tab. 17: Darstellung der innerhalb der selektiven Amplifikation verwendeten Primer.

Wie bereits für die Präamplifikation erfolgte der Ansatz der Komponenten des Polymerasenansatzes und des Primeransatzes getrennt (Tabelle 18, Tabelle 19).

Substanzen	Konzentration
PCR Puffer	1*
Taq Polymerase	0,02 U

Tab. 18: Herstellen des Polymerasen-Ansatzes.

Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Substanzen	Konzentration
Primer <i>EcoRI</i> +3	1,25 ng
Primer <i>MseI</i> +3	1,5 ng
dNTPs	0,1 mM

Tab. 19: Herstellen des Primeransatzes.

Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 5 μ l aufgefüllt.

In einem neuen Reaktionsgefäß erfolgte der endgültige Reaktionsansatz der zweiten selektiven Amplifikation durch das Zusammenpipettieren der beiden Ansätze und der Zugabe der verdünnten DNA aus dem Präamplifikationsansatz (Tabelle 20).

Substanzen	Menge [μ l]
DNA	5
Taq Mix	10
Primer Mix	5
Endvolumen	20

Tab. 20: Durchführung des Ansatzes der selektiven Amplifikation.

Die selektive Amplifikation wurde mit dem unter Tabelle 21 beschriebenen Programm durchgeführt.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeitdauer	
1	94	30 sek	13 x
2	65	30 sek	
3	72	1 min	
4	94	1 min	23 x
5	56	30 sek	
6	72	1 min	
7	4	HOLD	

Tab. 21: Programm zur Durchführung der selektiven Amplifikation.

Der erste Zyklus umfasste die Schritte 1-3. Diese Temperaturabfolge wurde 13 mal wiederholt. Danach schlossen sich die Schritte 4-6 an mit 23 maliger Wiederholung. Abschließend wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

Die Reaktion wurde nach Beendigung des Programmes mit Formamid-Puffer abgestoppt und die Proben in einem Sequenziergel aufgetrennt.

2.2.7 Durchführung der Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (SAMPL)-Analyse

Parallel zu der AFLP-Analyse wurde die SAMPL-Analyse durchgeführt. Die ersten Schritte entsprechen denen der AFLP-Analyse. Es wurden die gleichen Restriktionsenzyme benutzt, *Eco* RI und *Mse* I, sowie die gleichen Primer für die Präamplifikation. Das verwendete Temperaturprogramm entsprach ebenfalls der Präamplifikation der AFLP-Analyse. Innerhalb der 2. selektiven Amplifikation werden Primer mit Mikrosatellitenstruktur eingesetzt (Tabelle 22)

Name	Primerkombination	
	SAMPL	<i>Eco</i> RI +3
SAMPL1/E+AC	SAMPL 1	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3`
SAMPL1/E+AG	SAMPL 1	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3`
SAMPL2/E+AC	SAMPL 2	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3`
SAMPL2/E+AG	SAMPL 2	5`-GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3`

Tab. 22: Zusammenstellung der Primerkombinationen für die SAMPL-Analyse.

Die Sequenzen der SAMPL Primer sind urheberrechtlich von DUPONT geschützt und die Sequenzen dürfen deshalb nicht ohne Genehmigung veröffentlicht werden. Die Primer wurden mit freundlicher Genehmigung von JULY VOGEL (pers. Mitteilungen 2000) im Rahmen des DAAD Programms Acciones-Integradas zur Verfügung gestellt.

In den Tabellen 23 bis 25 sind die Schritte zur Durchführung der SAMPL-Analyse zusammengestellt.

Substanzen	Konzentration
PCR Puffer	1*
Taq Polymerase	0,02 U

Tab. 23: Herstellen des Polymerasen-Ansatzes.

Der Polymerasen-Ansatz wurde mit Aqua bidest auf ein Endvolumen von 10 μ l aufgefüllt.

Substanzen	Konzentration
Primer <i>Eco</i> RI +3	1,25 ng
SAMPL Primer	1,5 ng
dNTPs	0,1 mM

Tab. 24: Herstellen des Primeransatzes.

Der Primer-Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 5 μ l aufgefüllt.

In einem neuen Reaktionsgefäß erfolgte der endgültige Reaktionsansatz der zweiten selektiven Amplifikation durch das Zusammenpipettieren der beiden Ansätze und der Zugabe der verdünnten DNA aus dem Präamplifikationsansatz (Tabelle 25).

Substanzen	Menge [μ l]
DNA	5
Taq Mix	10
Primer Mix	5
Endvolumen	20

Tab. 25: Durchführung des Ansatzes der selektiven Amplifikation.

Das Programm der zweiten Amplifikation entsprach dem Programm der zweiten selektiven Amplifikation der AFLP-Analyse.

Die Reaktion wurde nach Beendigung des Programms mit Formamid-Puffer abgestoppt und die Proben in einem Sequenziergel aufgetrennt.

2.2.8 Auftrennung der AFLP- und SAMPL-Proben in einem Sequenziergel

2.2.8.1 Gießen des Polyacrylamidgeles

Zunächst wurden die beiden Glasplatten gründlich gereinigt. Dabei wurden beide Platten zunächst mit einem nicht rückfettenden Detergenz gewaschen, gründlich abgespült und mit Kleenex getrocknet. Anschließend wurden beide Platten nochmals mit Aqua bidest. und 70 %igem Ethanol abgerieben. Die kurze Glasplatte erforderte eine zusätzliche Behandlung mit Aceton und wurde je nach Detektionsmethode - Silberfärbung oder radioaktiv - mit Binde-Silane behandelt oder nicht. Die große Glasplatte wurde mit Repelsilane behandelt, um ein Anhaften des Geles am Glas zu vermeiden. Der Aufbau der Gelkammern erfolgte nach Anweisungen des Herstellers.

Der Gellösung wurden 10 % APS und 80 µl TEMED zugegeben, kurz gemischt, die Lösung in eine 150 ml Spritze aufgezogen und das Gel den Angaben des Herstellers entsprechend gegossen.

Abschließend wurde ein Kamm mit der glatten Seite in das Gel hineingeschoben und mit Klammern fixiert. Das Gel polymerisierte eine Stunde unter Luftabschluss.

2.2.8.2 Vorbereiten der Proben

Die Proben wurden dem -20°C Gefrierschrank entnommen, im Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) aufgetaut, bei 95°C für 3 min denaturiert und danach sofort in Eiswasser abgeschreckt.

2.2.8.3 Starten des Sequenziergeles

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, konnte der Kamm vorsichtig gezogen werden. Die entstandene Gelkante wurde mit 3MM Whatman Filterpapier getrocknet und Polyacrylamidreste entfernt. Das Gel wurde in die Laufkammer eingespannt und der Tank mit 1x TBE-Puffer befüllt. Damit das Gel eine gleichmäßige Temperatur von $45-50^{\circ}\text{C}$ erreichen konnte, erfolgte ein Vorlauf des Geles von 50 min bei 1,6 KV und 95 W.

Danach wurde mit einer Pasteurpipette die Gelkante gespült, um darin befindlichen Harnstoff zu entfernen. Der Kamm wurde eingesetzt und 2 µl der Proben in die Probestaschen einpipettiert. Es wurde ein Strom von 1,6 KV und 95 W angelegt.

Das Gel wurde nach 2-2,5 Stunden abgestoppt, der Kammer entnommen und die beiden Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt. Je nachdem, welche Detektionsmethode angewendet werden sollte, wurde das Gel wie folgt weiterbehandelt:

- radioaktive Markierung: Das so vorliegende Gel wurde auf 3MM Whatman Filterpapier aufgezogen und bei 80°C für 30 min in einem Geltrockner getrocknet. Nach Auflegen des Röntgenfilmes wurde das Gel bei Raumtemperatur exprimiert.
- Silberfärbung: Das auf der Glasplatte fixierte Gel wurde in eine Wanne mit Fixierlösung gelegt und damit für die nachfolgende Silberfärbung vorbereitet.

2.2.9 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit einem Kit von PROMEGA durchgeführt. Das Gel wurde in der ersten Färbewanne mit Fixierlösung für 20 min geschüttelt. Anschließend wurde es 3 x 2 min in je 2 Liter Aqua bidest. gewaschen und in die Färbelösung gelegt. Dort wurde das Gel nun für 30 min geschüttelt. Das Gel wurde aus der Färbelösung entnommen, 8-10 sec in Aqua bidest. getaucht und für 3-5 min in die Entwicklerlösung gegeben. Nach Färbung der Banden wurde das Gel in die Stopplösung gelegt und nochmals in Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde das gefärbte Gel mit einem Kodak T400 CN dokumentiert.

2.2.10 Auswertung

Die RAPD-Proben wurden in Agarose-Gelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mit Hilfe einer Videokamera dokumentiert. Die so digitalisierten Gele wurden innerhalb des Programmes RFLPscan Plus 3.1 wie folgt analysiert. Der Computer erkennt alle Banden, die 10 % der Intensität der am stärksten gefärbten Bande aufweisen. Damit der Computer keine Falscherkennung durchführte wie zum Beispiel gefärbte Partikel, wurde jedes Gel nochmals visuell überprüft. Die Banden wurden in den Dateimanager des Pro-

gramms RFLPscan Database überführt. Dort wurden die Banden in eine binäre Matrix umgeschrieben; dabei wurden auftretende Banden als 1, abwesende Banden als 0 gezählt.

Die Analyse der AFLP- und SAMPL-Proben erfolgte visuell, indem die anwesenden Banden mit 1, die abwesenden Banden mit 0 gezählt wurden

Die genetische Ähnlichkeit (GS = genetic similarity) zwischen zwei Unterlagsreben wurde nach DICE (SNEATH und SOKAL 1973; $GS(ij) = 2a/(2a + b + c)$) errechnet. Wobei GS(ij) die Messung der genetischen Ähnlichkeit zwischen den Individuen i und j darstellt, a ist die Anzahl der polymorphen Banden, die von i und j geteilt werden, b ist die Anzahl der Banden, die in i anwesend und in j abwesend sind und c ist die Anzahl der Banden, die in j anwesend und abwesend in i sind. Ein Dendrogramm wurde unter Benutzung der ‚Unweighted pair group method average‘ (UPGMA) Clustering der NTSYS-PC Software 2.0 erstellt.

2.2.11 Direkte Isolierung der DNA aus einem Polyacrylamidgel

Die durch die AFLP- und SAMPL-Analyse ermittelten ‚Einzelbanden‘ oder ‚unterlagssortenspezifische‘ Banden wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten.

Das Gel lag auf einem 3 MM Whatman Papier aufgezogen und getrocknet vor. Zum Exprimieren des Geles wurde der Röntgenfilm beim Auflegen fixiert und seiner Lage entsprechend mit einer Nadel markiert. Nach der Entwicklung des Filmes erfolgte die Kennzeichnung der gewünschten Banden mit einem Stift. Die Banden sollten isoliert liegen, damit eine Kontamination durch andere Banden verhindert wurde. Das Gel wurde entsprechend der Markierung des Röntgenfilmes ausgerichtet und fixiert. Mit einem Skalpell wurden die Banden durch den Röntgenfilm aus dem Gel geschnitten und die Gelstücke in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zu jedem Gelstück wurden 500 µl einer Lösung, bestehend aus

20 % Ethanol

1 M Litium Chlorid

10 mM Tris (pH 7,5)

zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation des Geles in der Lösung bei 65 °C für 1 h. Alle 10 min wurde die Lösung gemischt und das Gelstück mit einer Pipettenspitze zerrieben, bis dass das gesamte Papier gelöst vorlag. Die Suspension wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der

DNA wurde der Lösung 1 ml 98 % Ethanol zugegeben und die Suspension über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation der Suspension bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die untere Phase mit 1 ml 70 % Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufgereinigt. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde erneut verworfen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 min bei 13000 rpm wurde der restliche Überstand entfernt. Die DNA trocknete bei Raumtemperatur. Anschließend wurde sie resuspendiert, indem sie 1 h bei Raumtemperatur in $20\text{ }\mu\text{l}$ Aqua bidest. gelöst wurde. Daran schloss sich eine Zentrifugation von 1,5 min bei 13000 rpm an. Die obere Phase, welche die DNA enthielt, wurde in ein neues $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3. Ergebnisse

Die Sortendifferenzierung von Unterlagsreben hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zum einen beruht dies auf den unterschiedlichen, sortenabhängigen physiologischen Eigenschaften, wie die Verträglichkeit von Kalk im Boden, Adaption von Edelreis zur Unterlage, zum anderen auf der Toleranz bzw. Resistenz der unterschiedlichen Unterlagssorten gegenüber Pilzkrankheiten oder tierischen Schädlingen, wie Nematoden oder Reblaus.

Es wird bereits geblendetes Unterlagenpflanzmaterial angeboten, das heißt Pflanzenmaterial, das aufgrund der entfernten Knospen nicht mehr austreiben kann. Hier besteht keine Möglichkeit mehr, über einen Austrieb morphologisch eine Sortenunterscheidung durchzuführen. Es ist daher von Bedeutung, zu jedem Entwicklungs- und Verarbeitungsstadium eine Überprüfung der Unterlagssorte vornehmen zu können. Dies umfasst die Unterlage in der Unterlagenvermehrungsanlage, das bereits geblendete und zugeschnittene Holz der Unterlage, sowie die veredelte und als Pfropfrebe gepflanzte Unterlage.

Zu diesem Zweck wurde eine Methode erarbeitet, die eine Sortenunterscheidung und Identifikation in jedem Entwicklungs- und Verarbeitungsstadium der Unterlage ermöglichen sollte. Weiterhin sollten möglichst viele Genotypen auf ihre genetische Differenzierbarkeit hin untersucht werden sowie die ersten Schritte in Richtung der Untersuchung von genetischen Varianzen bei Unterlagsklonen getan werden.

3.1 DNA-Extraktion aus Holz und Freilandwurzeln

Im Falle der Unterlagen steht oftmals kein grünes Pflanzenmaterial zur Verfügung. Daher musste auf Holz oder, im Falle eines bereits gepflanzten Weinberges, auf Wurzelmaterial zurückgegriffen werden. Die prinzipielle Möglichkeit der DNA-Extraktion aus Holz von Unterlagsreben wurde bereits in WOLF 1996 dargestellt.

Einer der limitierenden Faktoren bei der DNA-Extraktion aus Gewebe der Rebpflanze sind Proteine und Polyphenole. Die Zellen der Rebe sind reich an Polyphenolen. Polyphenole stellen ein großes Problem bei der DNA-Extraktion dar, da sie zur Komplexbildung der DNA führen können. Die DNA-Proben werden viskos und können nicht mehr für molekularbiologische Untersuchungen herangezogen werden. Aus diesem Grund wurde dem Ex-

traktionspuffer PVPP zur Bindung der Polyphenole, sowie Harnstoff zur Denaturierung der Proteine zugegeben.

a) Die Zugabe von PVPP zu dem CTAB-Extraktionspuffer

Holz ist ein hartes, sehr widerstandsfähiges Material. Der gleichmäßige Aufschluss des Holzes durch Pulverisieren mit Hilfe von flüssigem Stickstoff ist schwierig.

Aus diesem Grund wurde das Rebenholz hier in Scheiben geschnitten, 0,5 g eingewogen, in Extraktionsbeutel gefüllt, mit CTAB-Extraktionspuffer und PVPP versetzt und bei Raumtemperatur im Flachbetthomogenisator zerrieben.

Das PVPP bildet komplexe Wasserstoff-Bindungen mit den Polyphenolen aus (LOHDI et al. 1994). Dadurch wird verhindert, dass Polyphenole an die DNA binden, mit dieser Komplexe bilden und sie für weitere molekularbiologische Untersuchungen unbrauchbar machen. Untersuchungen zum geeigneten Zugabezeitpunkt des PVPP, vor oder nach dem Homogenisieren, zeigten, dass es am günstigsten war, PVPP zeitgleich mit dem DNA-Extraktionspuffer zur Holzprobe zu geben und anschließend zu homogenisieren. Die in diesem Zusammenhang als Pflanzenmaterial verwendeten Klone der Unterlagssorte *Börner*, *Börner Kl 1 Gm*, *Börner Kl 4 Gm*, *Börner Kl 5 Gm*, *Börner Kl 7 Gm*, *Börner Kl 8 Gm* wiesen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die extrahierte DNA-Menge auf. Allerdings zeigte die PVPP-Zugabe vor dem Homogenisieren der Holzprobe bessere Resultate bezüglich der Reinheit der DNA ($OD_{260}/OD_{280}:1,7-2,0$) im Vergleich zu den Proben, mit PVPP-Zugabe nach der Homogenisierung ($OD_{260}/OD_{280}:1,6-1,7; 2,1$). In Abbildung 5 wurde die DNA extrahiert nach

- PVPP-Zugabe vor Homogenisieren der Holzprobe
- PVPP-Zugabe nach Homogenisieren der Holzprobe

mit Primer #751 in einer RAPD-PCR amplifiziert. Es wurden Qualität und die Reproduzierbarkeit der entstandenen Bandenmuster bewertet.

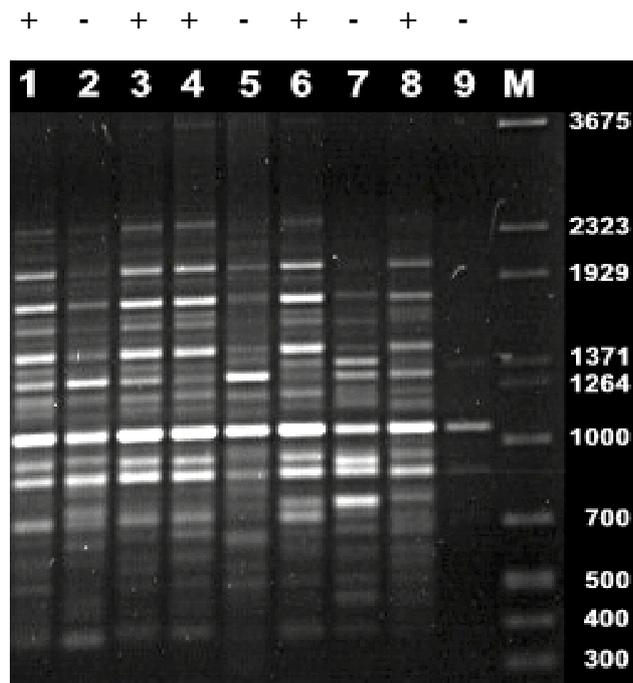


Abb. 5: Ermittlung des Zeitpunktes der PVPP Zugabe.

Es sollte der günstigste Zeitpunkt der PVPP Zugabe ermittelt werden. Dazu wurden Extraktionsansätze mit PVPP Zugabe vor dem Homogenisieren (+) und PVPP Zugabe nach dem Homogenisieren (-) des Holzigen Materials durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Proben in einer RAPD-PCR, hier mit Primer #751, amplifiziert. Als Pflanzenmaterial wurden 5 verschiedene Börnerklone verwendet. So zeigen die Bahnen 1-2 *Börner Kl 8 Gm*, Bahn 3 *Börner Kl 7 Gm*, Bahnen 4-5 *Börner Kl 5 Gm*, Bahnen 6-7 *Börner Kl 4 Gm*, Bahnen 8-9 *Börner Kl 1 Gm*.
Bahnen 1, 3, 4, 6, 8: PVPP Zugabe vor dem Homogenisieren (+)
Bahnen 2, 5, 7, 9: PVPP Zugabe nach dem Homogenisieren (-).

Es zeigte sich folgendes Ergebnis:

- a) PVPP Zugabe vor dem Homogenisieren: Die Bandenmuster sind reproduzierbar und vollständig.
- b) PVPP Zugabe nach dem Homogenisieren: Die Bandenmuster sind schwächer und unvollständig.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde PVPP vor dem Homogenisieren zu dem zu extrahierenden Gewebe und Extraktionspuffer gegeben.

b) Harnstoff Zugabe zu CTAB-Extraktionspuffer

Urea wurde bereits im DNA-Extraktionspuffer von INGLE (1993) für *Arabidopsis* als reduzierendes Agens verwendet. Harnstoff spaltet die Disulfidbrücken der Proteine auf und

bewirkt somit eine Denaturierung der Proteine. Diese wurden durch weitere Reinigungs- und Zentrifugationsschritte im Laufe der DNA Extraktion ausgefällt.

EIMERT (pers. Mitteilungen 1996) verwendete Harnstoff bereits zur Extraktion von DNA aus Blättern der Rebe. Es wurde untersucht, ob die von EIMERT verwendete Harnstoff-Konzentration im Extraktionspuffer auch für Rebholz optimal war. Die Konzentration des Harnstoff im Extraktionspuffer wurde ausgehend von 0 % Harnstofflösung im Extraktionspuffer in 5er Schritten bis zu 50 % Harnstofflösung im Extraktionspuffer untersucht. Dabei wurde von einer gesättigten Harnstofflösung (8 M) ausgegangen. Von jeder Harnstoff Konzentration wurde eine Doppelprobe extrahiert. Es wurde die erhaltene DNA-Menge und deren Qualität ermittelt.

Die verschiedenen Gehalte an Harnstofflösung zeigten keine signifikanten Unterschiede in der erhaltenen DNA Menge. Bis auf drei Extraktionen zeigten alle Extraktionen DNA Mengen von 0,110 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis zu 0,325 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Reinheit der DNA war bei höherem Harnstoffanteil besser. So zeigten die Harnstoff-Gehalte von 0-20 % eine Reinheit ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) von 1,1-1,5, ab 25 % 1,5-1,6.

Aufgrund dieser Untersuchung war zu erkennen, dass prinzipiell ein höherer Harnstoffanteil im DNA-Extraktionspuffer günstiger war.

Da aber diese Werte noch keinen direkten Aufschluss über die Verwertbarkeit der DNA für molekularbiologische Untersuchungen gaben, wurden die Proben innerhalb der RAPD-PCR mit dem Primer #751 amplifiziert (siehe Abbildung 6).

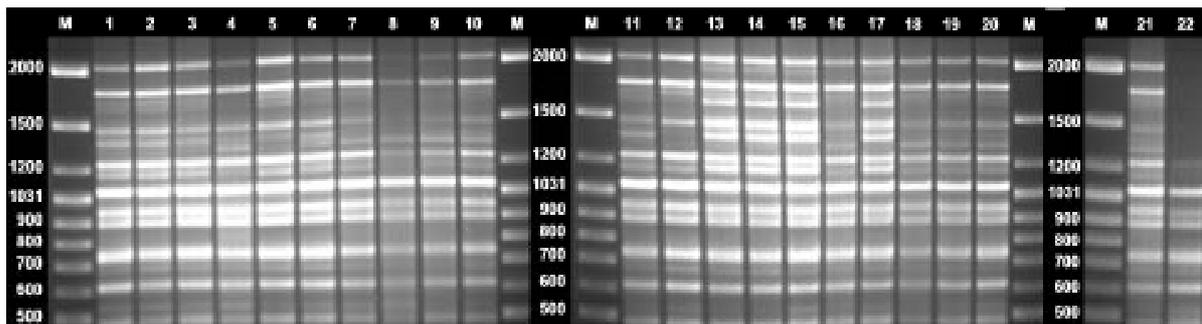


Abb. 6: Verschiedene Urea-Gehalte (0 %-50 %) im DNA-Extraktionspuffer und deren Amplifikation durch die RAPD-PCR mit Primer #751.

Bahnen 1-2: 0 % Urea; Bahnen 3-4: 5 % Urea; Bahnen 5-6: 10 % Urea; Bahnen 7-8: 15 % Urea; Bahnen 9-10: 20 % Urea; Bahnen 11-12: 25 % Urea; Bahnen 13-14: 30 % Urea; Bahn 15: 35 % Urea; Bahn 16: 40 % Urea; Bahn 17: 35 % Urea; Bahn 18: 40 % Urea; Bahnen 19-20: 45 % Urea; Bahnen 21-22: 50 % Urea.

Der Anteil von 30-35 % an Harnstofflösung zeigte die besten Ergebnisse innerhalb der DNA-Amplifikation.

3.1.1 DNA-Extraktion aus Wurzelgewebe von Freilandpflanzen

Im Falle eines bereits gepflanzten Weinberges entfällt die klassische Sortenbestimmung anhand von morphologischen Merkmalen, da kein grünes Pflanzenmaterial der Unterlage vorhanden ist. Die genetische Sortenbestimmung anhand des Unterlagenholzes war ohne das Zerstören eines gesamten Weinstockes nicht möglich, da unterhalb der Veredlungsstelle der Pfropfrebe Holz entnommen werden musste (siehe Abbildung 7). Damit ein weiteres Bestehen des Stockes gewährleistet werden konnte, wurde Wurzelmaterial als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion herangezogen.



Abb. 7: Veredlungsstelle (Verwachsung von Edelreis und Unterlage) eines intakten Weinbergstockes.

Durch das Ausbrechen von Geiztrieben und Entfernen der Augen wird das Austreiben der Unterlage verhindert.

Da die Weinrebe im Normalfall in Symbiose mit einem Wurzelpilz, der sogenannten Mycorrhiza (MOHR 1993) lebt, musste bei der DNA Extraktion darauf geachtet werden, dass keine Kontamination durch den Wurzelpilz eintrat.

Die Wurzel wurde zunächst von Erde befreit und unter fließendem Wasser bestmöglichst abgespült. Sehr hartnäckige Erdreste wurden mit einer Bürste entfernt. Anschließend wurde die Wurzel in Calcium-Hypochlorid oberflächensterilisiert. Die Extraktion der DNA erfolgte wie in (2.2.2.1) beschrieben. In Tabelle 26 sind Menge und Reinheitsgrad von DNA-Extraktionen aus Wurzeln von In-Vitro Pflanzen, Topfpflanzen und Freilandpflanzen dargestellt.

Wurzelherkunft	DNA Menge [µg/µl]	DNA Reinheit OD₂₆₀/OD₂₈₀
In-Vitro Pflanze	0,165-0,330	1,5-2,0
Topfpflanze	0,137-0,250	1,7-2,0
Freilandpflanze	0,090-0,300	1,5-2,0

Tab. 26: DNA Menge und Reinheit verschiedener Wurzelherkünfte im Vergleich.

Es ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen Wurzelherkünfte untereinander in Menge und Reinheit der DNA nicht signifikant differierten.

Zusätzlich wurden unterschiedliche Wurzelteile (siehe Abbildung 8) untersucht und mit einjährigem Holz der ausgetriebenen Unterlage verglichen (siehe Abbildung 9). Abbildung 8 zeigt einen Wurzelballen einer normalen Pfropfrebe. Die markierten Wurzelteile und der Wurzelhals wurden zur DNA-Extraktion wie unter 2.2.2.2 beschrieben verwendet.

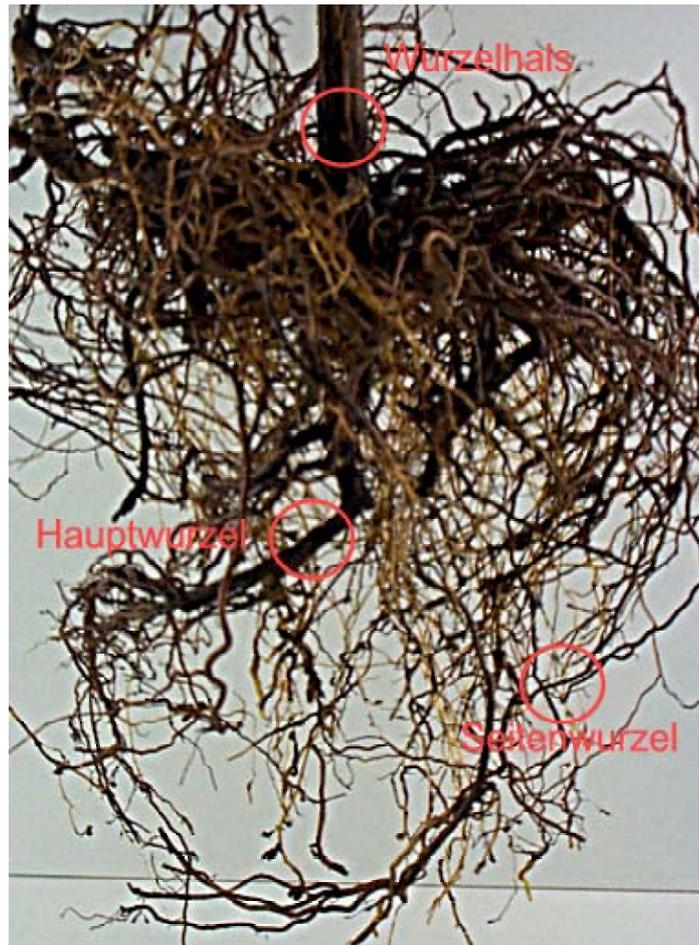


Abb. 8: Verwendetes Wurzelmaterial einer Pfropfrebe: Hauptwurzel, Seitenwurzel und Wurzelhals.

In Abbildung 9 wurde die Amplifikation der unterschiedlichen Wurzelteile mit dem RAPD-Primer #751 dargestellt. Mit diesem Primer wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzenteilen gefunden. Demnach konnten alle Pflanzenteile gleichermaßen zur Sortendifferenzierung herangezogen werden.

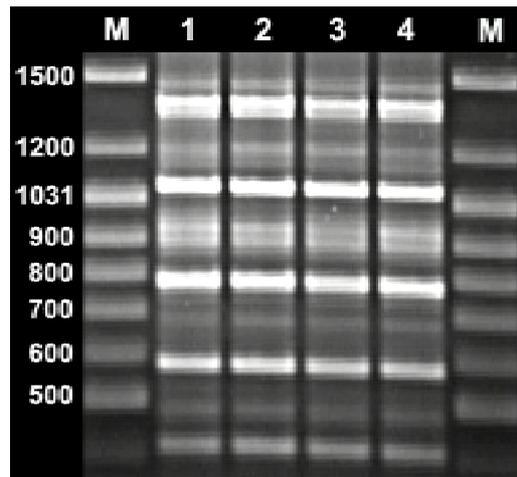


Abb. 9: Darstellung unterschiedlicher Wurzeltypen von Freilandpflanzen.

Bahn 1: Seitenwurzeln, Bahn 2: Hauptwurzeln, Bahn 3: Wurzelhals, Bahn 4: einjähriges Holz der ausgetriebenen Unterlage. Die Seiten- und Hauptwurzeln wurden mit 2,5 % Calcium-Hypochlorid oberflächensterilisiert. Bei der hier verwendeten Unterlage handelte es sich um die Sorte *SO 4*.

3.2 Sortenunterscheidung von Unterlagsreben mit Hilfe der Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-Analyse

Die klassische Sortendifferenzierung anhand von morphologischen Merkmalen (Ampe-lographie) kann bei geblendetem Unterlagsmaterial und bereits im Weinberg gepflanzten Pfropfreben nicht mehr durchgeführt werden.

Es wurden genetische Methoden unerlässlich, um Sortenkontrollen vornehmen zu können. Die hier gewählte RAPD-PCR ist kostengünstig, leicht durchzuführen und automatisierbar (SAIKI et al. 1988). Somit eignet sich diese Methode für die routinemäßige Anwendung auf dem Gebiet der Sortendifferenzierung.

Die RAPD-PCR Analyse arbeitet meist mit Dekamer-Primern (BÜSCHER et al. 1993; REGNER und MESSNER 1993). Die Primersequenzen sind zufällig gewählt. Die in der Literatur verwendeten Primer zur Sortendifferenzierung sind oftmals Dekamer-Oligonukleotide mit gemischter Sequenz, in der G-/C- und A-/T-Nukleotide gleichermaßen vorkommen.

Die hier angewendeten RAPD-Primer besaßen eine Dinukleotidsequenz mit einem G/C-Verhältnis von 60 %. Das bedeutete, dass folgende Basenkombinationen Verwendung fanden: A/C, A/G, T/C oder T/G.

Die verwendete RAPD-Analyse sollte für den Routineablauf standardisiert werden. Dazu wurden neben unterschiedlichen Reaktionsgefäßen verschiedene Formen der Kondensationsverhinderung (Heizdeckel, Ölüberschichtung) und Thermocycler getestet. Weiterhin wurde die Programmierung von RAMP-Zeiten untersucht. RAMP-Zeiten bestimmen, wie schnell der Block eines Thermocyclers beheizt oder abgekühlt wird. Die RAMP-Zeiten werden in Grad pro Sekunde angegeben.

In Tabelle 27 wurden die untersuchten Thermocycler benannt.

Thermocycler	Heizdeckel / Ölüberschichtung	RAMP-Zeiten [°/s]	Standort
Trioblock, Biometra	Heizdeckel	0,3	Fachgebiet für Rebenzüchtung und Rebenveredlung
Perkin Elmer	Ölüberschichtung	0,3	Fachgebiet für Botanik
Robocycler, Stratagene	Ölüberschichtung	Roboterarm taucht Proben nach Ablauf der Einwirkzeiten in den jeweiligen Heizblock	Fachgebiet für Mikrobiologie

Tab. 27: Darstellung der untersuchten Thermocycler.

In alle drei Thermocycler wurde der gleiche Reaktionsansatz mit der gleichen DNA gegeben. Verwendet wurde hierfür die DNA der sieben Unterlagssorten *125 AA*, *SO 4*, *5 C*, *Börner*, *8 B*, *5 BB* und *3309 C*. Danach wurden alle Reaktionsansätze mit Stopppuffer abgestoppt und in einem 1,3 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Für alle Thermocycler wurde das gleiche Programm benutzt (siehe 2.2.4.4), wobei für die Thermocycler Biometra und Perkin Elmer zusätzlich RAMP-Zeiten programmiert wurden. Die Abbildungen 10-12 stellen Amplifikationen der 7 Unterlagssorten *125 AA*, *SO 4*, *5 C*, *Börner*, *8 B*, *5 BB* und *3309 C* in den angesprochenen Thermocyclern dar.

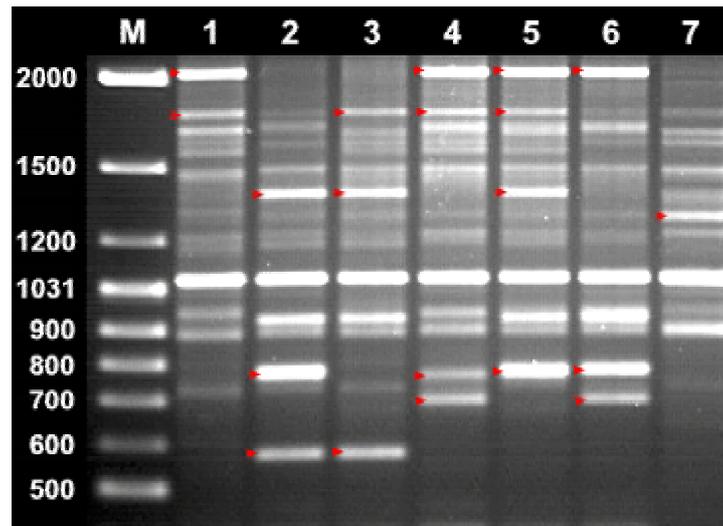


Abb. 10: Darstellung der Amplifikation der sieben Unterlagssorten durch Primer #751 in einem Biometra Trio Block im Fachgebiet für Rebenzüchtung und Rebenveredlung mit einer RAMP-Zeit von 0,3 °/s.

Bahn 1: *Börner*, Bahn 2: *SO 4*, Bahn 3: *125 AA*, Bahn 4: *5 C*, Bahn 5: *5 BB*, Bahn 6: *8 B*, Bahn 7: *3309 C*.

Zur Verhinderung der Kondensation besaß dieser Thermocycler Heizdeckel.

Die wichtigsten Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Diese Bandenmuster wurden als ‚Standard‘ verwendet, um die beiden anderen Thermocycler miteinander zu vergleichen.

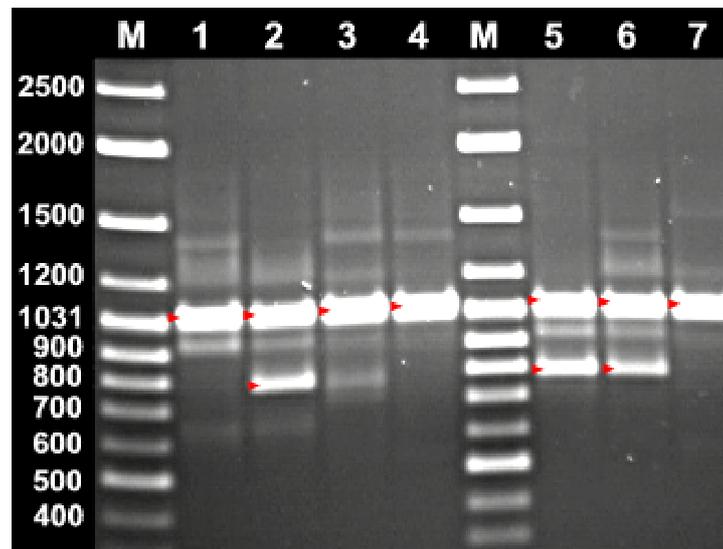


Abb. 11: Darstellung der Amplifikation der sieben Unterlagssorten durch Primer #751 in einem Stratagene Thermocycler im Institut für Mikrobiologie.

Bahn 1: *125 AA*; Bahn 2: *SO 4*; Bahn 3: *5 C*; Bahn 4: *Börner*; Bahn 5: *8B*; Bahn 6: *5 BB*; Bahn 7: *3309 C*. Zur Verhinderung der Kondensation wurde der Reaktionsansatz mit Öl überschichtet.

Innerhalb des erzielten Bandenmusters der getesteten Unterlagssorten fanden sich nur noch 2 Banden wieder, eine bei 1073 bp und 800 bp (mit Pfeilen gekennzeichnet).

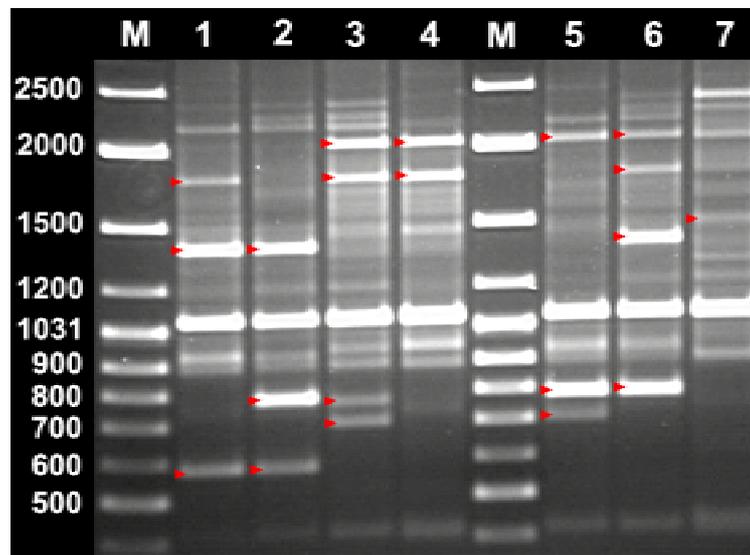


Abb. 12: Darstellung der Amplifikation der sieben Unterlagssorten durch Primer #751 in einem Perkin Elmer Thermocycler im Fachgebiet Botanik.

Bahn 1: *125 AA*; Bahn 2: *SO 4*; Bahn 3: *5 C*; Bahn 4: *Börner*; Bahn 5: *8 B*; Bahn 6: *5 BB*; Bahn 7: *3309 C*. Zur Verhinderung der Kondensation wurde der Reaktionsansatz mit Öl überschichtet. Die wichtigen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Es ist zu erkennen, dass die wichtigen Banden alle vorhanden sind. Die Unterlagssorten wiesen oberhalb von 2000 bp zusätzliche Banden auf. Im Bereich, der zur Differenzierung der Unterlagssorten essentiell ist, waren alle Banden entsprechend dem Referenzgerät vorhanden. Es finden sich auch keine zusätzlichen Banden.

3.2.1 Erweiterung der Dekamer-Primer #722, #726 und #751 zu 12mer Primer

Die in der RAPD-PCR verwendeten Primer sind meist Dekamer-Primer. Sie binden an einer nicht vorhersagbaren Stelle im Genom. Aufgrund ihrer kurzen Sequenz ist die Häufigkeit ihrer Bindungen sehr hoch. Durch das Anhängen von weiteren wiederum zufällig gewählten Nukleotiden werden diese Primer verlängert. Sie sind dadurch in ihrer Bindungshäufigkeit herabgesetzt. Es wurde im Folgenden untersucht, ob durch das Anhängen von weiteren Nukleotiden an Primer, die bisher eine Sortenunterscheidung aufgrund von

Bandenkombinationen zuließen, sortenspezifische Marker erreicht werden konnten. Dazu wurden die Primer #722, #726 und #751 verwendet und mit jeweils zwei Nukleotiden verlängert. Da die hier getesteten Primer eine Dinukleotidsequenz besitzen, wurden sie auch um die entsprechenden Nukleotide verlängert (Tabelle 28). Die Primer #722 und #751 waren in der Diplomarbeit (WOLF 1996) aus 49 untersuchten Primern als für die Sortentrennung geeignet ermittelt worden.

10er Primer	Sequenz	12er Primer	Sequenz
#722	CCT CTC CCT C	#722b	CCT CTC CCT CCT
		#722c	CCT CTC CCT CTC
#726	GGT GTG GGT G	#726b	GGT GTG GGT GGT
		#726c	GGT GTG GGT GTG
#751	CCC ACC ACA C	#751b	CCC ACC ACA CCA
		#751c	CCC ACC ACA CAC

Tab. 28: Sequenz der 10er Primer und die daraus entstandenen 12er Primer.

Die zusätzlichen Nukleotide der 12er Primer sind fett gedruckt. Da die Ausgangsprimer eine Dinukleotidsequenz aufweisen, wurden die 12er Primer um die entsprechenden Nukleotide verlängert.

Die 12er Primer, die aus den ursprünglichen 10er Primer hervorgegangen sind, stellten sich wie folgt in der Auftrennung durch die RAPD-PCR dar. Die sieben in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten, *Börner*, *SO 4*, *125 AA*, *5 C*, *5 BB*, *8 B* und *3309 C*, wurden in diesem Zusammenhang getestet.

a) Primer #722

Der erste Primer, der verlängert wurde, war der Primer #722 (CCT CTC CCT C). In Abbildung 13 wurde die Auftrennung der 7 Unterlagssorten amplifiziert mit Primer #722 dargestellt. Dieser Primer differenzierte alle sieben getesteten Unterlagssorten. Die zur Unterscheidung wichtigen Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

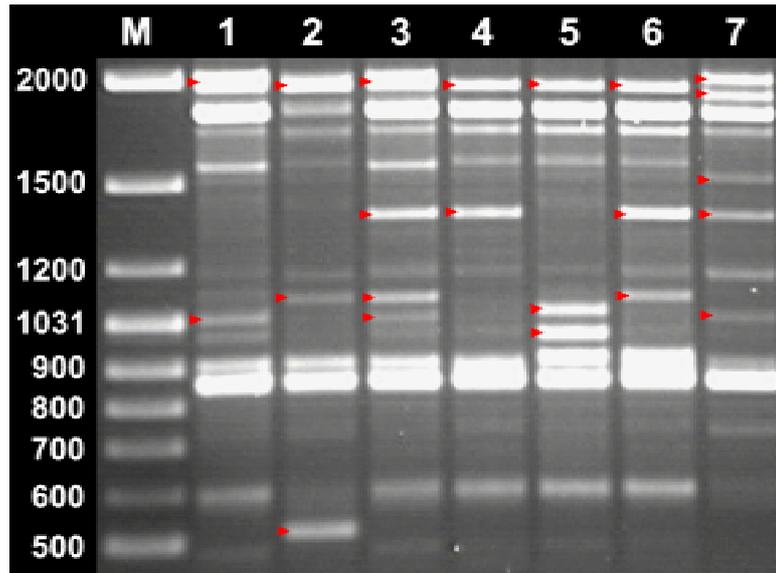


Abb. 13: Auftrennung der sieben in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten amplifiziert mit dem ursprünglichen 10er Primer #722.

Bahn 1: *Börner*; Bahn 2: *SO 4*; Bahn 3: *125 AA*; Bahn 4: *5 C*; Bahn 5: *5 BB*; Bahn 6: *8 B*; Bahn 7: *3309 C*.

Die zur Unterscheidung wichtigen Banden sind mit Pfeilen markiert.

Ausgehend von diesem Primer wurden zwei weitere Primer synthetisiert, welche außer der Basensequenz des Primer #722 die Nukleotide –CT und -TC aufwiesen.

In Abbildung 14 wurde der erste der beiden um zwei Nukleotide verlängerte Primer (#722b) dargestellt. Die interessanten Banden sind mit Pfeilen markiert.

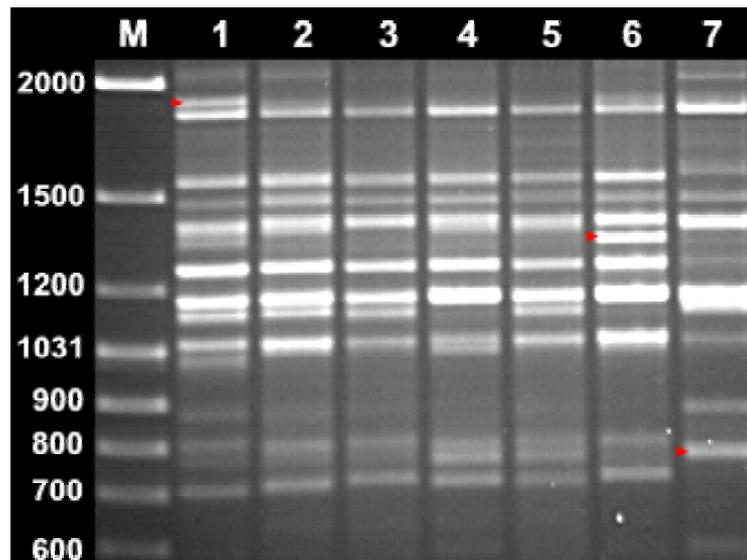


Abb. 14: Auftrennung der Unterlagssorten durch Primer #722b (CCT CTC CCT CCT).

Bahn 1: *Börner*, Bahn 2: *SO 4*, Bahn 3: *125 AA*, Bahn 4: *5 C*, Bahn 5: *5 BB*, Bahn 6: *8 B* Bahn 7: *3309 C*. Die mit Pfeil gekennzeichneten Banden waren die für die jeweilige Sorte charakteristischen Banden.

Der Primer #722b zeigte insgesamt drei charakteristische Banden für die Sorten *Börner* (1900 bp), *8 B* (1350 bp) und *3309 C* (785 bp).

Allerdings konnte mit diesem Primer keine vollständige Trennung aller sieben Unterlagssorten erreicht werden. So zeigten die Unterlagssorten *SO 4*, *125 AA* und *5 BB* keine signifikanten Unterschiede in ihren Bandenmustern.

Die Abbildung 15 zeigt die mit Primer #722c (CCT CTC CCT CTC) amplifizierten 7 Unterlagssorten. Auch hier sind die charakteristischen Banden mit einem Pfeil markiert.

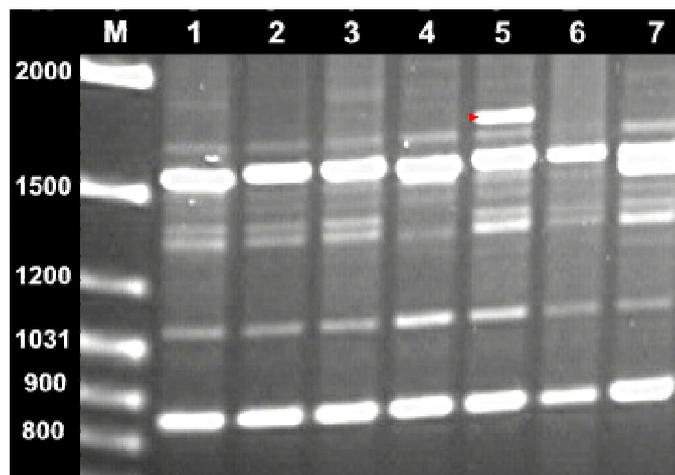


Abb. 15: Auftrennung der Unterlagssorten amplifiziert mit Primer #722c (CCT CTC CCT CTC).
Bahn 1: *Börner*, Bahn 2: *SO 4*, Bahn 3: *125 AA*, Bahn 4: *5 C*, Bahn 5: *5 BB*, Bahn 6: *8 B*, Bahn 7: *3309 C*. Die mit Pfeil gekennzeichnete Bande ist charakteristisch für die Unterlagssorte *5 BB*.

Der Primer #722c zeigte nur für die Unterlagssorte *5 BB* bei 1760 bp eine charakteristische Bande. Alle anderen sechs Unterlagssorten konnten mit diesem Primer nicht unterschieden werden.

Beide Primer, #722b und #722c konnten im Gegensatz zu dem Ausgangsprimer #722 nicht alle Unterlagssorten gleichzeitig abtrennen. Sie wiesen aber spezifische Banden für *Börner* (#722b), *8 B* (#722b), *3309 C* (Primer #722b) und *5 BB* (Primer #722b, #722c) auf.

b) Primer #726

Ausgehend von der Sequenz von Primer #726 (GGT GTG GGT G) wurden ebenfalls zwei weitere Primer synthetisiert. Abbildung 16 zeigt das ursprüngliche Bild des Primer #726. Die zur Unterscheidung erforderlichen Banden wurden durch Pfeile gekennzeichnet.

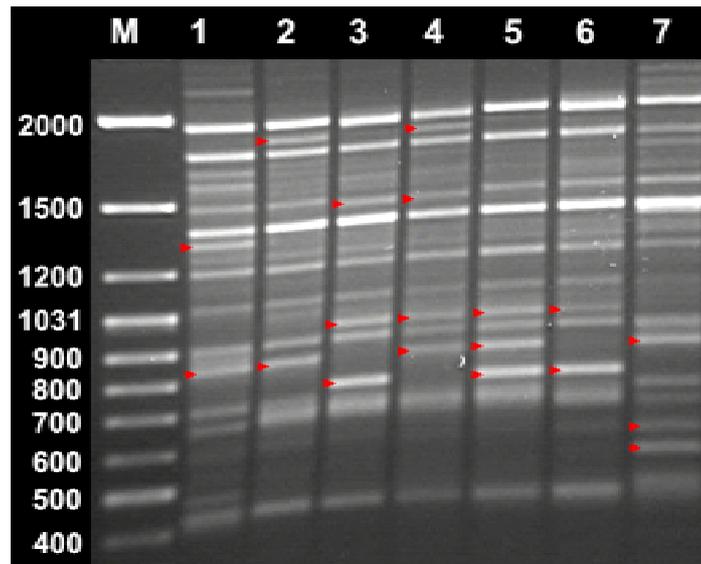


Abb. 16: Auftrennung der sieben in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten amplifiziert mit dem ursprünglichen 10er Primer #726.
 Bahn 1: *Börner*; Bahn 2: *SO 4*; Bahn 3: *125 AA*; Bahn 4: *5 C*; Bahn 5: *5 BB*;
 Bahn 6: *8 B*; Bahn 7: *3309 C*.
 Die zur Unterscheidung nötigen Banden wurden mit einem Pfeil markiert.

Ausgehend von diesem Primer wurden zwei weitere Primer synthetisiert (#726b, #726c) mit den zusätzlich Nukleotiden –GT und –TG. Beide Primer brachten aber keine verwertbaren Ergebnisse. Exemplarisch für diese Primer wurde Primer #726b in Abbildung 17 dargestellt. Es waren keine Bandenmuster erkennbar, die eine Sortendifferenzierung ermöglichen würden.

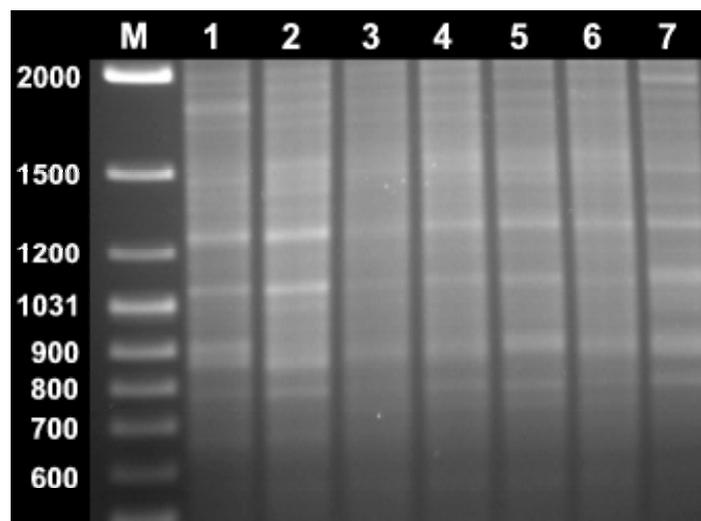


Abb. 17: Darstellung des Primer #726b (GGT GTG GGT GGT).
 Bahn 1: *Börner*; Bahn 2: *SO 4*; Bahn 3: *125 AA*; Bahn 4: *5 C*; Bahn 5: *5 BB*;
 Bahn 6: *8 B*; Bahn 7: *3309 C*.

c) Primer #751

Der Primer #751 wurde ebenfalls in 2 12mer Primer umgewandelt. Abbildung 18 zeigt die aufgetrennten 7 Unterlagssorten, amplifiziert mit dem Dekamer Primer #751. Die wichtigen Banden sind durch Pfeilen gekennzeichnet.

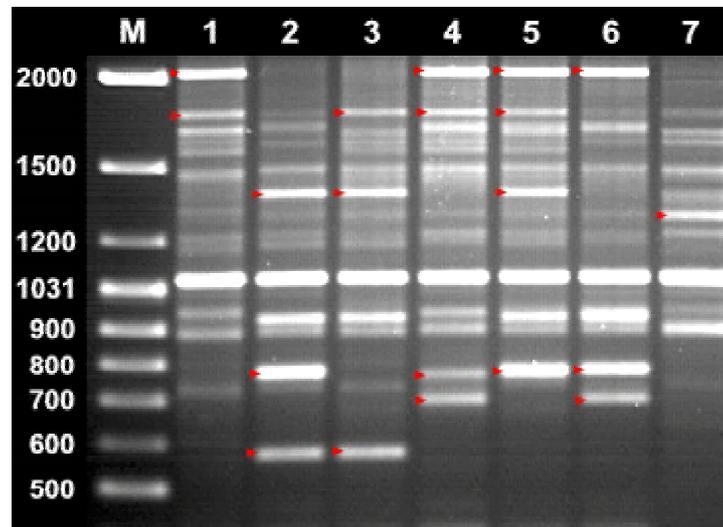


Abb. 18: Auftrennung der sieben in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten mit dem ursprünglichen 10er Primer #751.
Bahn 1: *Börner*; Bahn 2: *SO 4*; Bahn 3: *125 AA*; Bahn 4: *5 C*; Bahn 5: *5 BB*;
Bahn 6: *8 B*; Bahn 7: *3309 C*. Die wichtigsten Banden sind mit Pfeilen markiert.

Mit Primer #751 war eine vollständige Abtrennung der Unterlagssorten voneinander möglich. Von diesem Primer ausgehend wurden zwei weitere Primer synthetisiert, Primer #751b und #751c (siehe Abbildungen 19, 20). Es wurden zwei weitere Nukleotide an die Ausgangssequenz angehängt, -CA und -AC.

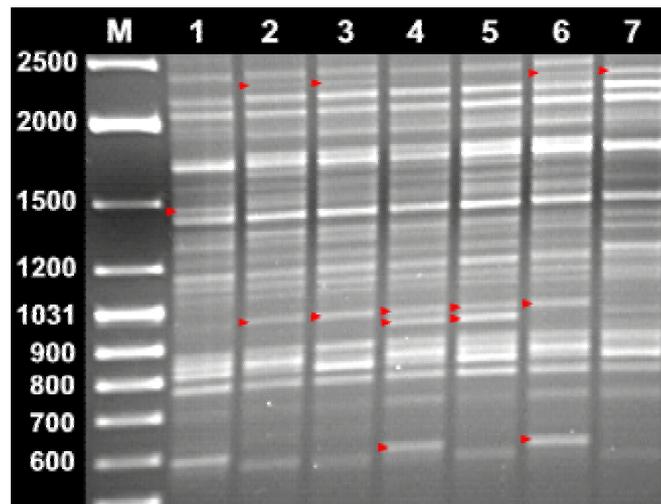


Abb. 19: Auftrennung der Unterlagssorten amplifiziert mit Primer #751b (CCC ACC ACA CCA).
 Bahn 1: *Börner*, Bahn 2: *SO 4*, Bahn 3: *125 AA*, Bahn 4: *5 C*, Bahn 5: *5 BB*,
 Bahn 6: *8 B*, Bahn 7: *3309 C*.

Der Primer #751b (Abbildung 19) wies im Gegensatz zu den Primern #722b und #722c keine spezifische Banden für die hier untersuchten Unterlagssorten auf. Es ließen sich verschiedene Sorten durch Bandenkombinationen voneinander abgrenzen. So war *Börner* von *3309 C* durch eine Bande bei 1460 bp (*Börner*) und einer Bande bei 2310 bp (*3309 C*) abtrennbar. *5 BB*, *5 C*, *SO 4* sowie *125 AA* unterschieden sich von *Börner* und *3309 C* durch Banden im Bereich von 960 bp und 990 bp. Die Unterlagssorten *5 C* und *5 BB* ließen sich von *SO 4*, *125 AA* und *8 B* durch eine Bande bei 960 bp abgrenzen. *5 C* wies eine zusätzliche Bande bei 610 bp auf, die sie von der Sorte *5 BB* unterschied.

8 B unterschied sich von *SO 4* und *125 AA* durch eine zusätzliche Bande bei 610 bp.

Die Unterlagssorten *SO 4* und *125 AA* ließen sich nicht voneinander abgrenzen.

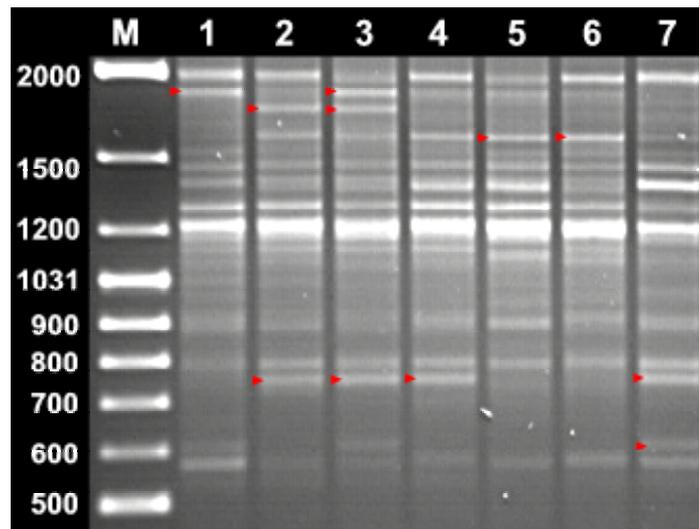


Abb. 20: Auftrennung der Unterlagssorten amplifiziert mit Primer #751c (CCC ACC ACA CAC).
 Bahn 1: *Börner*, Bahn 2: *SO 4*, Bahn 3: *125 AA*, Bahn 4: *5 C*, Bahn 5: *5 BB*,
 Bahn 6: *8 B*, Bahn 7: *3309 C*.

Auch Primer #751c (Abbildung 20) zeigte keine spezifischen Banden für einzelne Unterlagssorten. So ließen sich die Unterlagssorten untereinander durch Bandenkombinationen voneinander trennen. *SO 4*, *125 AA*, *5 C* und *3309 C* grenzten sich von den anderen Sorten durch eine Bande bei 760 bp ab. *125 AA* unterschied sich von diesen durch eine Bande bei 1890 bp und 1790 bp. *SO 4* grenzte sich von den übrigen Sorten durch eine Bande bei 1790 bp ab. Die Sorten *5 C* und *3309 C* waren schwierig voneinander zu differenzieren. Es wäre nur eine Bande bei 610 bp für *3309 C* anzusprechen.

Die Unterlagssorten *5 BB* und *8 B* grenzte sich von *Börner* durch eine Bande bei 1630 bp ab.

5 BB und *8 B* selbst waren nicht voneinander zu unterscheiden. Somit brachte auch Primer #751c keine vollständige Trennung der Unterlagssorten.

3.2.2 Untersuchungen zur Vermischung von Unterlagssorten in einem Unterlagenbündel

Unterlagen werden in Unterlagenschnittgärten produziert. Für ihre spätere Verarbeitung werden die Unterlagenhölzer in Längen von 35 cm, 70 cm und 105 cm geschnitten und in

Bündel zu je 200 Stück verpackt. Diese Hölzer werden dem Veredler zugeführt und bei diesem, ihrer Verwendung entsprechend, zugeschnitten und mit einer Ertragsrebsorte (E-delreis) veredelt.

Kommen nun innerhalb eines solchen Bündels Verwechslungen vor, so ist der Nachweis dieser Fremdhölzer problematisch. Früher wurden stichprobenartig Hölzer zum Austrieb gebracht. Anhand der Morphologie der grünen Pflanzenteile konnte die Sorte bestimmt werden. Die Probleme hierbei waren, dass die Anzucht der Hölzer entsprechend langwierig ist und dass damit nur große Anteile an Fremdholz in einem solchen Bündel erfasst werden können. Zudem wird immer mehr geblendetes Unterlagenholz nach Deutschland eingeführt. Das bedeutet, dass diese Form der Überprüfung wegen des Fehlens der Knospen nicht mehr durchgeführt werden kann.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, bis zu welchem Grad eine Vermischung von Hölzern mit Hilfe der RAPD-PCR noch nachweisbar ist.

3.2.2.1 Vermischungen der DNA

Zunächst sollte geklärt werden, in wieweit es möglich ist, mit Hilfe der RAPD-Analyse Vermischungen zu detektieren. Dazu wurde die DNA von zwei Unterlagssorten *5 C* und *SO 4* in bestimmten Verhältnissen zueinander gemischt (siehe Tabelle 29). Die Auswahl fiel auf diese beiden Unterlagssorten, da diese in Bereichen Banden aufweisen, welche die jeweilige Unterlagssorte von der anderen eindeutig unterscheidet:

- *SO 4*: 1400 bp, 595 bp
- *5 C*: 2050 bp, 1810 bp, 720 bp

Unterlagssorten	Mischungsverhältnisse
SO 4	1
5 C	1
5 C : SO 4	1 : 1
5 C : SO 4	1 : 3
5 C : SO 4	1 : 7
5 C : SO 4	1 : 11
5 C : SO 4	1 : 15

Tab. 29: Mischungsverhältnisse der DNA der Unterlagssorten *SO 4* und *5 C*.

Nach dem Mischen der DNA wurde diese innerhalb einer RAPD-PCR mit dem Primer #751 amplifiziert (siehe Abbildung 21).

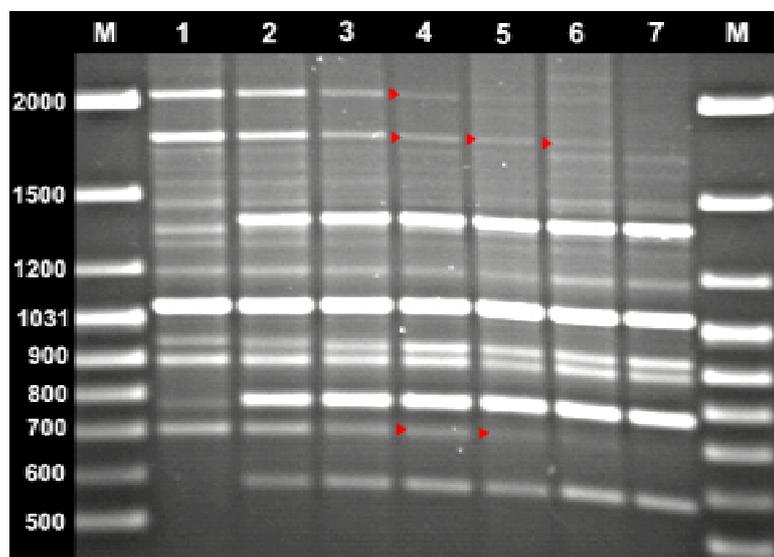


Abb. 21: Gemischte und mit Primer #751 in einer RAPD-Analyse amplifizierte DNA-Proben der Unterlagssorten *SO 4* und *5 C*.
 Bahn 1: *5 C*; Bahn 2: *5 C:SO 4* 1:1; Bahn 3: *5 C:SO 4* 1:3; Bahn 4: *5 C:SO 4* 1:7;
 Bahn 5: *5 C:SO 4* 1:11; Bahn 6: *5 C:SO 4* 1:15; Bahn 7: *SO 4*.

In diesem Fall wurde die DNA der Unterlagssorte *5 C* durch die DNA der Unterlagssorte *SO 4* 'verdünnt'. Bei einem Verhältnis von 1:7 waren noch drei charakteristische Banden

(2050 bp, 1810 bp, 720 bp) von 5 C zu erkennen (durch Pfeile gekennzeichnet). Ab einem Verhältnis von 1:11 waren noch eine Bande bei 1810 bp gut und eine Bande bei 720 bp schwach zu sehen. Bei einem Verhältnis von 1:15 war mit 1810 bp die letzte Bande von 5 C noch schwach zu erkennen.

Das bedeutete, dass im Falle von DNA Vermischungen die Nachweisgrenze bei ca. 6 % Fremd-DNA lag.

3.2.2.2 Extraktion von DNA aus Holz von gebündelten Unterlagsreben

Für die spätere Routineuntersuchung wird eine Probeentnahme aus einem Bündel von Unterlagenhölzern angestrebt. Es sollte möglich sein, aus 200 Holzstücken eine für das gesamte Bündel repräsentative Mischprobe zu entnehmen. Zu diesem Zweck wurde mit einem Probenvolumen von 15 g Holz gearbeitet. Dementsprechend wurden 150 ml Extraktionspuffer eingesetzt. Die Holzproben wurden zusammen mit dem Extraktionspuffer und PVPP in einen Blender (Kenwood) gegeben. Da nicht sicher war, inwieweit ein homogener Aufschluss aller Holzstücke mit dem Blender erreicht werden konnte, wurden verschiedene Homogenisierungszeiten untersucht (Tabelle 30).

Homogenisierungszeiten [min]	Holzprobe
1	Grobe Brocken, hellgrün
3	Größere Stücke, hellbraun
5	Kleinere Stücke, braun
10	Kleine, faserige Stücke, dunkelbraun
15	Kleine, faserige Stücke, dunkelbraun, Probe wurde warm
30	Kleine, faserige Stücke, dunkelbraun, Probe wurde warm
45	Kleine, faserige Stücke, dunkelbraun, Probe wurde sehr warm

Tab. 30: Untersuchungen zum homogenen Aufschluss aller Holzstücke im Blender.

Es wurden verschiedene Homogenisierungszeiten und deren Auswirkungen auf die Holzprobe getestet.

Pro Homogenisierungszeit wurde eine Doppelprobe entnommen und entsprechend der Extraktion beschrieben in 2.2.2.3 die DNA gewonnen. Anschließend wurde die Quantität der

DNA bestimmt. Die DNA wurde verdünnt und in einer RAPD-Analyse mit dem Primer #751 amplifiziert (siehe Abbildung 22). Die hierbei verwendete Unterlagsorte war *Geisenheim 5 C*.

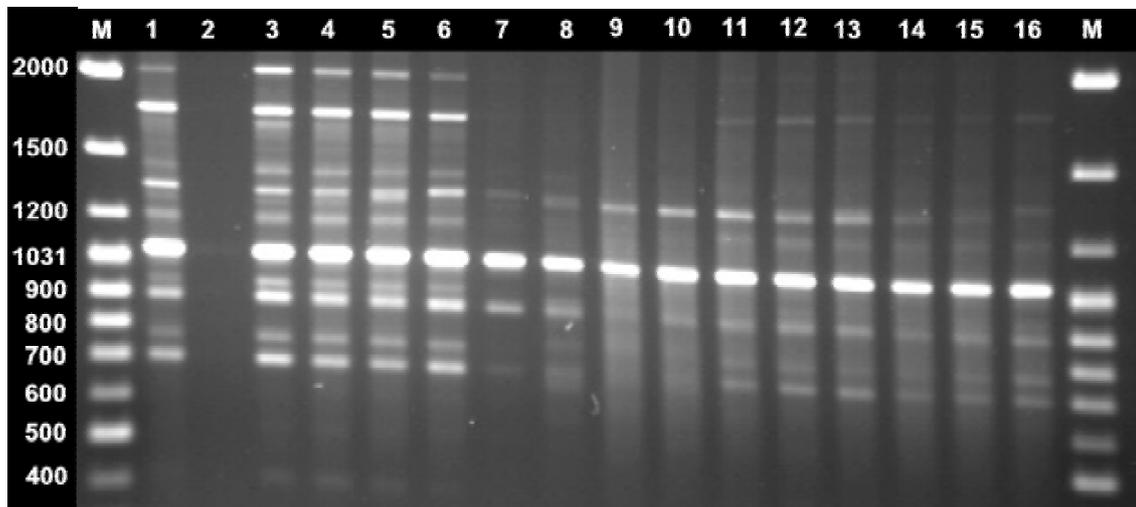


Abb. 22: Untersuchungen zu verschiedenen Homogenisierungszeiten im Blender.

Als Holzprobe wurden hier 15 g der Unterlagsorte 5 C eingesetzt. Nach den angegebenen Homogenisierungszeiten wurde je eine Doppelprobe entnommen und die DNA sofort extrahiert. Amplifiziert wurde die extrahierte DNA mit dem Primer #751 innerhalb einer RAPD-Analyse.

Bahn 1: Positiv-Kontrolle: Holzprobe, einjährig, Standard-Aufschluss im Flachbetthomogenisator, 5g Holzeinwaage; Bahn 2: Negativ-Kontrolle; Bahn 3-4: 1 min; Bahn 5-6: 3 min; Bahn 7-8: 5 min; Bahn 9-10: 10 min; Bahn 11-12: 15 min; Bahn 13-14: 30 min; Bahn 15-16: 45 min.

Die Proben mit 1 min und 3 min Homogenisierungszeit entsprachen dem Bandenmuster, welches die einjährige, im Flachbetthomogenisator homogenisierte Holzprobe (Positiv-Kontrolle) aufweist. Ab einer Homogenisierungszeit von 5 Minuten war kein vollständiges Muster mehr erkennbar und somit keine Sorte mehr nachweisbar. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die folgenden Holzproben im Blender für maximal 3 min homogenisiert.

3.2.2.3 Vermischungen des Unterlagenholzes

Es wurde untersucht, in wie weit prozentual eine Vermischung in einem Unterlagenholz-bündel auftreten durfte, damit sie immer noch nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden zwei Unterlagssorten, *SO 4* und *5 C*, miteinander in verschiedenen Mischungsverhältnissen zusammen im Blender homogenisiert. Aus dem Blender wurden pro Mischung je zwei Proben entnommen und die DNA extrahiert.

In Tabelle 31 wurden die untersuchten DNA-Mischungsverhältnisse aufgeführt.

Sorten	Mischung [%]
SO 4	100
5 C	100
<i>SO 4 ; 5 C</i>	10 ; 90
<i>SO 4 ; 5 C</i>	20 ; 80
<i>SO 4 ; 5 C</i>	30 ; 70
<i>SO 4 ; 5 C</i>	40 ; 60
<i>SO 4 ; 5 C</i>	50 ; 50

Tab. 31: Mischungen von Holzproben der Unterlagssorten *SO 4* und *5 C* in Prozent.

Nach der Extraktion der DNA wurde deren Menge bestimmt, entsprechend verdünnt und eine RAPD-Analyse mit Primer #751 durchgeführt. Danach wurde geprüft, in wie weit eine Vermischung noch nachweisbar war (siehe Abbildung 23).

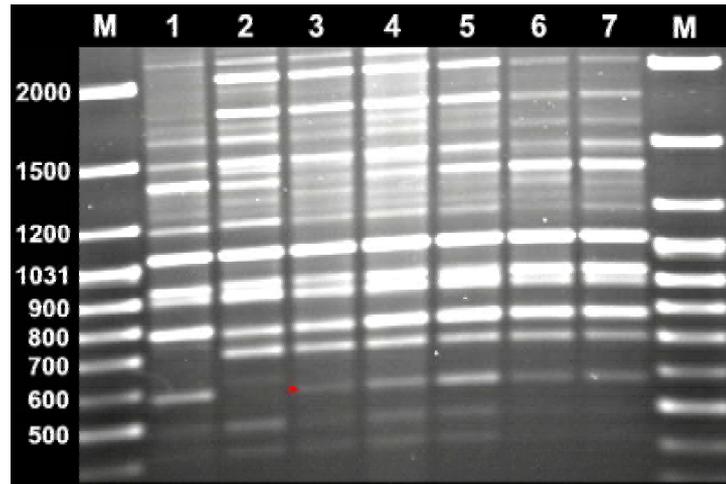


Abb. 23: Vermischung der Unterlagssorte *SO 4* mit der Sorte *5 C*.

Die beiden Unterlagssorten waren zuvor in ihrem Holz gemischt und gemeinsam zerkleinert worden. Nach der Extraktion der DNA wurde eine RAPD-Analyse mit Primer #751 durchgeführt.

Bahn 1: *SO 4* 100 %; Bahn 2: *5 C* 100 %; Bahn 3: *SO 4* 10 %, *5 C* 90 %; Bahn 4: *SO 4* 20 %, *5 C* 80 %; Bahn 5: *SO 4* 30 %, *5 C* 70 %; Bahn 6: *SO 4* 40 %, *5 C* 60 %; Bahn 7: *SO 4* 50 %, *5 C* 50 %.

Durch Vergleich der Proben mit der reinen *5 C* Probe war zu erkennen, dass bereits ab 10 % *SO 4* Anteil in der *5 C* Probe eine sehr schwache Bande auftrat (595 bp), die so nur bei *SO 4* zu finden ist. Diese Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Mit zunehmendem *SO 4* Anteil wurden die für *5 C* charakteristischen Banden bei 2050 bp und 1810 bp schwächer, während die Banden bei 795 bp und 720 bp von ihrer Intensität her ähnlich stark vorhanden waren. Die Bande bei 595 bp für *SO 4* verstärkte sich, ebenso die Bande bei 1400 bp. Allerdings war bei einem Vermischungsgrad von 40 % *SO 4* zu 60 % *5 C* und 50 % *SO 4* zu 50 % *5 C* kein Unterschied zwischen den beiden Vermischungen zu sehen.

Es bildeten sich aber keine neue Kombinationen an Banden, also Banden, die ihren Ursprung nicht bei einer der beiden Unterlagssorten hatten. Alle auftretenden Banden sind entweder bei *SO 4* oder *5 C* existent.

Es war möglich, mit Hilfe des Blenders ein relativ großes Probenvolumen zu verarbeiten. Weiterhin konnte mit der RAPD-Analyse eine Vermischung von Unterlagssorten bis zu 10 % festgestellt werden.

3.2.3 Vergleich von Unterlagssorten unterschiedlicher Herkunft

Ein Problem der morphologischen Beurteilung von Rebsorten (Ampelographie) stellt der Einfluss von Umweltbedingungen, wie Trockenheit, veränderte Bodenzusammensetzungen etc. auf den Phänotyp der Rebsorten dar. Das daraus resultierende unterschiedliche Erscheinungsbild von Sorten bei unterschiedlichen Standortbedingungen erschwert die eindeutige ampelographische Sortenbestimmung anhand morphologischer Charakteristika.

Die Verwendung von DNA als Basis einer Sortenunterscheidung sollte diese Problematik ausschließen. Damit die Unabhängigkeit von Herkunft und Standort der innerhalb der RAPD-Analyse erhaltenen Bandenmuster sichergestellt wurde, wurden die Bandenmuster von Unterlagssorten, die in Deutschland gewachsen waren, mit denen von Unterlagssorten aus italienischen Unterlagenschnittgärten verglichen.

Hierbei handelte es sich um die Sorten *Börner*, *SO 4*, *125 AA*, *5 C* und *5 BB*. Diese Sorten waren in Italien in Unterlagenschnittgärten vermehrt worden. In Form von Unterlagenhölzern wurden sie zur Veredlung nach Deutschland importiert. Von diesen Hölzern wurden Holzproben entnommen, die DNA extrahiert und innerhalb einer RAPD-Analyse (hier Primer #726) zusammen mit 5 institutseigenen Unterlagssorten getestet (siehe Abbildung 24).

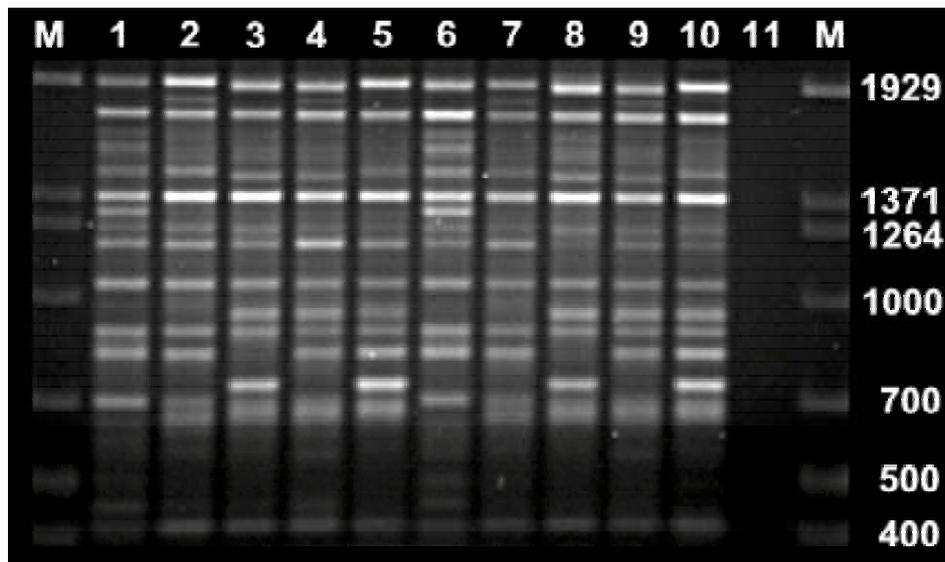


Abb. 24: Vergleich von institutseigenen Unterlagssorten mit Unterlagssorten italienischer Herkunft.

Bahnen 1, 6: *Börner*; Bahnen 2, 7: *SO 4*; Bahnen 3, 8: *125 AA*; Bahnen 4, 9: *5 C*; Bahnen 5, 10: *5 BB*; Bahn 11: Negativ-Kontrolle. Die italienischen Unterlagssorten befinden sich auf den Bahnen 1-5, die deutschen auf den Bahnen 6-10.

Die Unterlagssorten italienischer Herkunft besaßen das gleiche Bandenmuster wie die entsprechenden Sorten deutscher Herkunft. Damit wurde gezeigt, dass Unterlagssorten unterschiedlicher Herkunft ebenso sicher auf ihre Sorte hin mit der RAPD-Analyse überprüft werden können wie die deutscher Herkunft.

3.2.4 Trennung von Unterlagssorten mit RAPD-Primer #751

Ziel der Untersuchungen war es, ein Verfahren zu entwickeln, das es ermöglichte, Unterlagssorten zu jedem Entwicklungs- und Verarbeitungsstadium zu differenzieren. Nachdem Holz- wie auch Wurzelmaterial zur DNA-Extraktion verwendet werden konnte, sollte weitergehend untersucht werden, inwieweit eine Differenzierung von möglichst vielen Unterlagssorten mit Hilfe eines Primers möglich war. Hierfür wurde der Primer #751 verwendet, der bereits in Vorversuchen seine Trennfähigkeit bewiesen hatte (WOLF et al. 1999, WOLF et al. 2000). In Tabelle 32 sind die auf ihre Differenzierbarkeit mit Primer #751 untersuchten Unterlagssorten aufgelistet. Soweit die Elternteile bei Kreuzungen bekannt sind, wurden diese in der Spalte ‚Kreuzung‘ vermerkt. In der Spalte ‚Herkunft/Standort‘ wurden in *kursiv* die Herkünfte, die ehemalige Sortimentsbezeichnungen darstellen, einiger Genotypen vermerkt. ‚Geisenheim‘ bezeichnet den Standort innerhalb des Fachgebietes.

Unterlagssorte/Genotyp	Klon	Kreuzung	Herkunft/Standort Feld-Block-Zeile
4 A <i>Teleki</i>		-	Geisenheim, S-3-11
5 A <i>Goseck = Teleki 5 A</i>		-	Geisenheim, S-2-11
5 BB		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, N-1-14
5 C		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, N-1-17
8 B		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, N-1-23
2 <i>Ganzin</i>		<i>V. vinifera x V. rupestris</i>	Geisenheim, S-8-11
23 G		<i>V. vinifera x V. riparia</i>	Geisenheim, S-1-10
26 G	27-7	<i>V. vinifera x V. riparia</i>	Geisenheim, N-1-4
41 B		<i>V. vinifera x V. berlandieri</i>	Geisenheim, S-13-13
43 G		<i>(V. vinifera x V. riparia) x (V. berlandieri x V. riparia)</i>	Geisenheim, S-3-10
62 G		<i>V. vinifera x V. riparia</i>	Geisenheim, S-4-10
66 G		-	Geisenheim, S-5-10
67 B	176-4	-	Geisenheim, S-14-11

Unterlagssorte/Genotyp	Klon	Kreuzung	Herkunft/Standort
			Feld-Block-Zeile
68 B	169-3	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, S-15-11
71 B	154-3	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, S-16-11
75 BB	1 Gm	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, S-14-9
101-14	8	<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-18-23
88 G		<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-6-10
99 Richter		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, N-3-31
106-8 MG		-	Geisenheim, S-9-12
109-4 Couderc		<i>V. vinifera</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-10-12
110 G		<i>V. riparia</i> x <i>V. vinifera</i>	Geisenheim, S-7-10
110 Richter		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, N-3-32
112 G		<i>V. vinifera</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, S-8-10
125 AA		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, N1-21
127 BB		-	Geisenheim, S-15-9
140 Ruggeri	1	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-10-23
140 Ruggeri	4	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-3-23
141 G		<i>V. vinifera</i> x (<i>V. cordifolia</i> x <i>V. rupestris</i>)	Geisenheim, S-9-10
143 A	18-18	Aramon x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, N-1-1
157 G		<i>V. vinifera</i> x <i>Solonis</i>	Geisenheim, S-10-10
159 G		<i>V. vinifera</i> x (<i>Labrusca</i> x <i>V. vinifera</i>)	Geisenheim, S-11-10
161-49 Couderc		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, N-3-43
162	38 Gm	-	Geisenheim, S-12-11
174 G		<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-12-10
199 G		-	Geisenheim, S-13-10
208 G		-	Geisenheim, S-14-10
209 G		-	Geisenheim, S-15-10
236-39 Gm		-	Geisenheim, S-16-12
316 Gm		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, S-12-8
420 A		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i>	Geisenheim, S-2-24
Paulsen 775 E		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Italien
Paulsen 779 E		<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Italien
1103 Paulsen	1	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Geisenheim, S-15-24

Unterlagssorte/Genotyp	Klon	Kreuzung	Herkunft/Standort Feld-Block-Zeile
<i>1103 Paulsen</i>	9	<i>V. berlandieri x V. rupestris</i>	Geisenheim, S-17-24
<i>1202 Couderc</i>		<i>V. vinifera x V. rupestris</i>	Geisenheim, S-12-12
<i>1616 C</i>		<i>Solonis x V. riparia</i>	Geisenheim, S-13-12
<i>1616 Tr</i>		-	Geisenheim, S-14-12
<i>3309 C</i>		<i>V. riparia x V. rupestris</i>	Geisenheim, N-2-33
<i>Baco 22 A</i>		<i>V. vinifera x V. riparia</i>	Geisenheim, S-7-11
<i>Barret 503</i>	6 Gm	-	Geisenheim, S-9-11
<i>Binova</i>		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, N-3-27
<i>Börner</i>		<i>V. riparia 183 G x V. cinerea Arnold</i>	Geisenheim, N-1-45
<i>Cina</i> <i>Na 5004-848 C3</i>		<i>Kober 125 AA x V. cinerea</i>	Neustadt
<i>Dr. Deckerrebe</i>		-	Geisenheim, S-10-11
<i>Fercal</i>		<i>(V. berlandieri x Colombarde)x EM 333</i>	Italien
<i>Isabella</i> <i>Labrusca Varietät</i>		<i>Labrusca x V. vinifera</i>	Geisenheim, S-6-2
<i>Masannes</i>		<i>V. riparia x V. rupestris</i>	Geisenheim, S-6-11
<i>Na 61-99</i>			Geisenheim, S-6-13
<i>Na 162-35</i>			Geisenheim, S-7-13
<i>Na 1201-101</i>		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, S-8-13
<i>Na 5004-846</i>		<i>Kober 125 AA x V. cinerea</i>	Geisenheim, S-7-12
<i>Na 5024-9</i>		<i>V. riparia 183 G x V. cinerea</i>	Geisenheim, S-17-12
<i>Na 5024-15</i>		<i>V. riparia 183 G x V. cinerea</i>	Geisenheim, S-4-13
<i>Na 5095-4 Z</i>			Geisenheim, S-5-13
<i>Na 5153-48</i>		<i>V. riparia 183 G x V. cinerea Arnold</i>	Geisenheim, S-1-13
<i>Na 5153-76</i>		<i>V. riparia 183 G x V. cinerea Arnold</i>	Geisenheim, S-2-13
<i>Na 5162-98</i>			Geisenheim, S-3-13
<i>Oberlin 604</i>		<i>V. vinifera x V. riparia</i>	Geisenheim, S-4-11
<i>Oberlin 605</i>		-	Diez 518, Geisenheim, S-5-11
<i>Oh Budo</i>		-	Geisenheim
<i>Rici</i> <i>Na 5153-588 A9</i>		<i>V. riparia 183 G x V. cinerea Arnold</i>	Neustadt
<i>Seibel 867</i>		-	Geisenheim, S-16-10
<i>SO 4</i>		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, N-1-27
<i>Sori</i>		<i>Solonis x V. riparia</i>	Geisenheim, N-2-32
<i>Sori F2</i>	5378-65	<i>Sori frei abgeblüht</i>	Geisenheim, S-11-11

Unterlagssorte/Genotyp	Klon	Kreuzung	Herkunft/Standort Feld-Block-Zeile
<i>Tel 9 BB</i>	264-3	<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, S-5-12
<i>Tel 19 C</i>	108-3	-	Geisenheim, S-3-12
<i>Tel 52 A</i>	304-4 Gm	<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, S-13-11
<i>Tel 112 D</i>	91-3	<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, S-1-12
<i>Tel C</i>		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, S-6-12
<i>Tel D</i>		<i>V. berlandieri x V. riparia</i>	Geisenheim, S-8-12
<i>V. amurensis</i>		-	NW 1758-3, Geisenheim, S-11-2
<i>V. andersonii Rochester</i>		-	Geisenheim, S-13-2
<i>V. arizonica</i>		-	Geisenheim, S-10-13
<i>V. berlandieri</i>		-	Geisenheim, N-3-34
<i>V. berlandieri Resseguier Nr. 1</i>		-	Geisenheim, S-8-2
<i>V. cinerea 5015</i>		-	Geisenheim, S-3-2
<i>V. cinerea Arnold</i>		-	Geisenheim, S-2-1
<i>V. cinerea Barret 1</i>		-	Geisenheim, S-2-2
<i>V. cinerea Barret 9</i>		-	Geisenheim, S-1-2
<i>V. cinerea Illionois</i>		-	Geisenheim, S-1-1
<i>V. cinerea Missouri</i>		-	Geisenheim, S-5-1
<i>V. cinerea New York</i>		-	Geisenheim, S-4-1
<i>V. coignetia</i>		-	Geisenheim
<i>V. cordifolia</i>		-	Nr. 61-62, Geisenheim, S-4-2
<i>V. labrusca Carolina</i>		-	Geisenheim, S-5-2
<i>V. novae anglicae Rochester</i>		-	Geisenheim, S-11-8
<i>V. novo mexicana</i>		-	Geisenheim, S-10-8
<i>V. riparia 1 G</i>		-	Geisenheim, S-12-7
<i>V. riparia 1 G Engers</i>		-	Geisenheim, S-7-8
<i>V. riparia 64 G</i>		-	Geisenheim, S-13-7
<i>V. riparia 68 G</i>		-	Geisenheim, S-14-7
<i>V. riparia 75 G</i>		-	Geisenheim, S-1-8
<i>V. riparia 78 G</i>		-	BS 64 (1-5), Geisenheim, S-15-7
<i>V. riparia 80 G</i>		-	Geisenheim, S-3-8
<i>V. riparia 179 G</i>		-	Geisenheim, S-5-8
<i>V. riparia 183 G</i>		-	Geisenheim, S-4-7
<i>V. riparia 49173 Californien</i>		-	Geisenheim, S-4-4
<i>V. riparia 5016 Californien</i>		-	Geisenheim, S-1-4
<i>V. riparia Alberta Fr</i>		-	Geisenheim, S-13-4
<i>V. riparia Baron Perrier</i>		-	Geisenheim, S-2-7

Unterlagssorte/Genotyp	Klon	Kreuzung	Herkunft/Standort Feld-Block-Zeile
<i>V. riparia du terretoire Indien</i>		-	Geisenheim, S-11-4
<i>V. riparia Geneva 04</i>		-	NW 5458-12, Geisenheim, S-15-6
<i>V. riparia Gloire de Montpellier</i>		-	Geisenheim, S-8-8
<i>V. riparia grand feuille Nr 8</i>		-	Geisenheim, S-15-4
<i>V. riparia grand glabre</i>		-	Geisenheim, S-7-4
<i>V. riparia Mandan</i>		-	NW 1558-13, Geisenheim, S-1-7
<i>V. riparia Montreal 1</i>		-	NW 5058-8, Geisenheim, S-6-6
<i>V. riparia Montreal 1</i>		-	NW 5058-12, Geisenheim, S-7-6
<i>V. riparia Montreal 2</i>		-	NW 5158-7, Geisenheim, S-4-6
<i>V. riparia Montreal 2</i>		-	NW 5158-11, Geisenheim, S-5-6
<i>V. riparia Montreal 2</i>		-	NW 5158-30, Geisenheim, S-12-6
<i>V. riparia Montreal 2</i>		-	NW 5158-37, Geisenheim, S-13-6
<i>V. riparia Montreal 5</i>		-	NW 5258-11, Geisenheim, S-11-6
<i>V. riparia Montreal Fr</i>		-	Geisenheim, S-14-4
<i>V. riparia Pailleres</i>		-	Geisenheim, S-10-4
<i>V. riparia pubescent bleu</i>		-	Geisenheim, S-7-7
<i>V. riparia Klosterneuburg</i>		-	Geisenheim, S-8-4
<i>V. riparia pub. Typ Börner</i>		-	Geisenheim, S-9-7
<i>V. riparia Quebec 1</i>		-	NW 5558-2, Geisenheim, S-1-5
<i>V. riparia Quebec 2</i>		-	NW 5658-2, Geisenheim, S-4-5
<i>V. riparia Quebec 3</i>		-	NW 5758-7, Geisenheim, S-9-5
<i>V. riparia Quebec 4</i>		-	NW 5858-1, Geisenheim, S-15-5
<i>V. riparia Quebec A 23</i>		-	NW 6258-6, Geisenheim, S-2-6
<i>V. riparia Quebec B 3</i>		-	NW 6358-8 Geisenheim, S-3-6
<i>V. riparia rouge pub.</i>		-	Geisenheim, S-9-4
<i>V. riparia sauvage</i>		-	Geisenheim, S-9-8
<i>V. riparia semis Oberlin</i>		-	Geisenheim, S-5-7
<i>V. riparia splendens</i>		-	IV-64 Münchenberg, Geisenheim S-10-7

Unterlagssorte/Genotyp	Klon	Kreuzung	Herkunft/Standort
			Feld-Block-Zeile
<i>V. riparia</i> Trier		-	Geisenheim, S-6-4
<i>V. riparia</i> Urbana 2		-	NW 4858-11, Geisenheim, S-14-6
<i>V. rupestris</i> Dieffenbach		-	Geisenheim, S-12-3
<i>V. rupestris</i> du Lot		-	Geisenheim, N-3-19
<i>V. slavinii</i> Rhoeder		-	Geisenheim, S-13-3
<i>V. slavinii</i> Rochester		-	Geisenheim, S-14-3
<i>V. solonis longii</i> Prince		-	Geisenheim, S-7-3
<i>V. solonis</i> Richter		-	Geisenheim, S-8-3
<i>V. Thunbergii</i>		-	Geisenheim, S-11-13
<i>V. treleasii</i>		-	N 29-30, Geisenheim, S-9-2
<i>V. vulpina</i> Linne		-	Geisenheim, S-9-13

Tab. 32: Zusammenstellung der mit Primer #751 untersuchten Genotypen.

Von den aufgeführten Sorten wurde einjähriges Holz im Januar der Jahre 1997-2000 im institutseigenen Sortiment geschnitten, die DNA extrahiert und anschließend innerhalb einer RAPD-Analyse mit dem Primer #751 amplifiziert.

Insgesamt wurden 151 Unterlagssorten mit Primer #751 untersucht. Jede Unterlagssorte wurde mindestens dreimal innerhalb der RAPD-Analyse mit Primer #751 amplifiziert und wie unter 2.2.10 beschrieben ausgewertet.

Es wurden hauptsächlich die Nachkommen folgender Kreuzungsgruppen getestet:

- *V. berlandieri* x *V. riparia*
- *V. berlandieri* x *V. rupestris*
- *V. riparia* x *V. rupestris*
- *V. riparia* x *V. cinerea*
- *V. vinifera* x *V. riparia*
- *V. vinifera* x *Vitis V. rupestris*

Weiterhin wurden verschiedene Wildformen untersucht.

Die genetische Ähnlichkeit der verschiedenen Sorten, basierend auf der Anwesenheit oder Abwesenheit der amplifizierten Fragmente, wurde nach DICE (SNEATH und SOKAL 1973) berechnet.

Der Primer #751 produzierte für alle 151 Unterlagssorten 86 Banden. Mit Hilfe dieser Banden konnten bis auf folgende Unterlagen (1-7) alle Sorten differenziert werden:

- 1) *Binova* – *SO 4*
- 2) *75 BB* – *Tel 52 A*
- 3) *V. riparia 183 G* – *V. riparia 75 G*
- 4) *174 G* – *V. amurensis*
- 5) *V. riparia Alberta Fr* – *V. riparia pub. Typ Börner*
- 6) *Rici* – *Cina*
- 7) *Na 5024-15* – *Na 5153-48*

Der Primer #751 produzierte keine Banden, die bei allen 151 Sorten gleichermaßen zu finden waren (monomorphe Banden). Der Molekulargewichtsbereich, innerhalb dessen Banden auftraten, erstreckte sich von 2760 bp bis hin zu 490 bp. Im Bereich von 2000 bp bis 900 bp war die größte Anhäufung von Banden zu finden. Dabei fanden sich Einzelbanden

für folgende Unterlagssorten:

- *V. riparia Quebec A* (2760 bp)
- *V. riparia semis Oberlin* (2510 bp)
- *V. riparia splendens* (2470 bp)
- *V. riparia Montreal 2 NW 5158-37* (2450 bp)
- *V. riparia Montreal 5 NW 5258-11* (2410 bp)
- *Fercal* (1930 bp)
- *V. riparia Klosterneuburg* (2260 bp)
- *41 B* (1910 bp)
- *Paulsen 779 E* (2140 bp)
- *V. cinerea Barret 9* (530 bp)
- *V. slavinii Rhoeder* (490 bp)

Zunächst wurde die Verteilung der genetischen Ähnlichkeitsindices über alle 151 getesteten Genotypen betrachtet (siehe Anhang Abbildung I, Tabelle III). Dazu wurden die Indices in ihrem Bereich von 0 bis 1 in 0,1 Schritte zerlegt und die für jede Sorte auftretenden Ähnlichkeitsindices gezählt. Abschließend wurde die Anzahl des jeweiligen Indexes für alle 151 Genotypen prozentual umgerechnet.

Dabei wurde festgestellt, dass eine normale Verteilung der Ähnlichkeitsindices besteht (Abbildung 25). Es liegt weder eine signifikante Orientierung in Richtung 1 oder 0 vor.

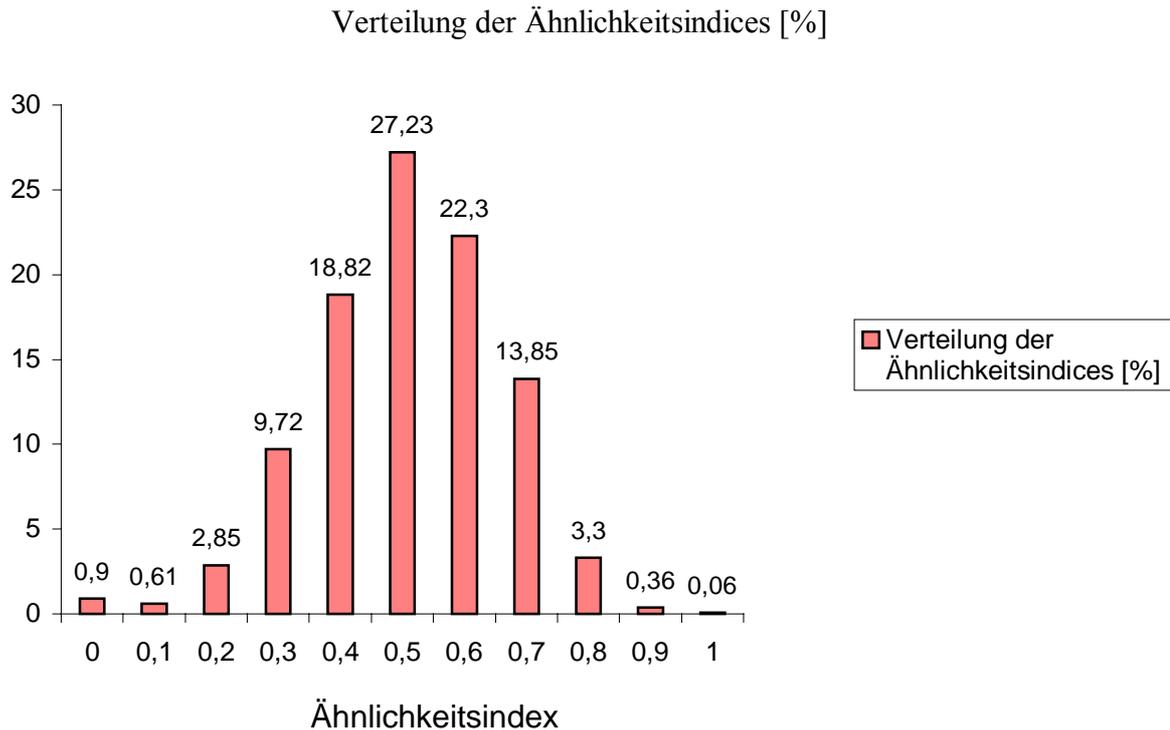


Abb. 25: Verteilung der genetischen Ähnlichkeitsindices für alle untersuchten 151 Genotypen.

Die Art der Verteilung lässt auf eine große genetische Divergenz der untersuchten Sorten schließen. Es lagen nur 0,36 % der Unterlagssorten im Bereich des Ähnlichkeitsindex von 0,9 und 13,85 % im Bereich von 0,8. Der größte Anteil der Ähnlichkeitsindices der Sorten lag im Bereich von 0,4 mit 18,82 %, über 0,5 mit 27,23 % bis hin zu 0,6 mit 22,3 %. Daran schlossen sich die Bereiche 0,2 mit 2,85 %, 0,1 mit 0,61 % und 0 mit 0,9 % an. Die 0,06 % im Bereich 1 waren die bereits angesprochenen Unterlagssorten, die genetisch nicht durch Primer #751 zu differenzieren waren.

Das durch die nach DICE kalkulierten genetischen Ähnlichkeiten und mit Hilfe der UPGMA Cluster Methode konstruierte Dendrogramm (siehe Anhang) zeigte eine Clusterbildung von bestimmten Unterlagssorten, während andere Sorten außerhalb der Cluster standen.

Die Wildform *V. riparia du terrettoire* zeigte gegenüber den übrigen Sorten Ähnlichkeitsindices zwischen 0 bis 0,267 (bei *V. cinerea Barret 1*) und war somit am weitesten von allen anderen Sorten entfernt.

Ein Teil der getesteten Sorten (106) bildeten 7 Cluster, die wiederum zu einem großen Cluster zusammengefasst werden können. Innerhalb dieser Cluster waren unter anderem die Sorten angeordnet, die mittels Primer #751 nicht voneinander zu trennen waren, bzw die Unterlagssorten, die Ähnlichkeitsindices von 0,7 bis 0,9 aufwiesen.

Außerhalb dieser Gruppierung lagen die Sorten, welche die niedrigsten Ähnlichkeitsindices mit den jeweils anderen Unterlagssorten zeigten.

3.2.5 Genetische Divergenz der Wildreben

Die aus Asien oder Amerika stammenden Wildreben blühten frei ab. Demnach muss von einer hohen Vermischung des Erbgutes ausgegangen werden.

Es wurden 43 verschiedene Genotypen von *V. riparia* auf ihre genetische Divergenz hin untersucht. Die Ähnlichkeitsindices erstreckten sich von 0 bis 0,7. Wie bereits angegeben, stellte *V. riparia du terroire* eine Ausnahme dar. Sie stand außerhalb der Cluster (siehe Abbildung 26).

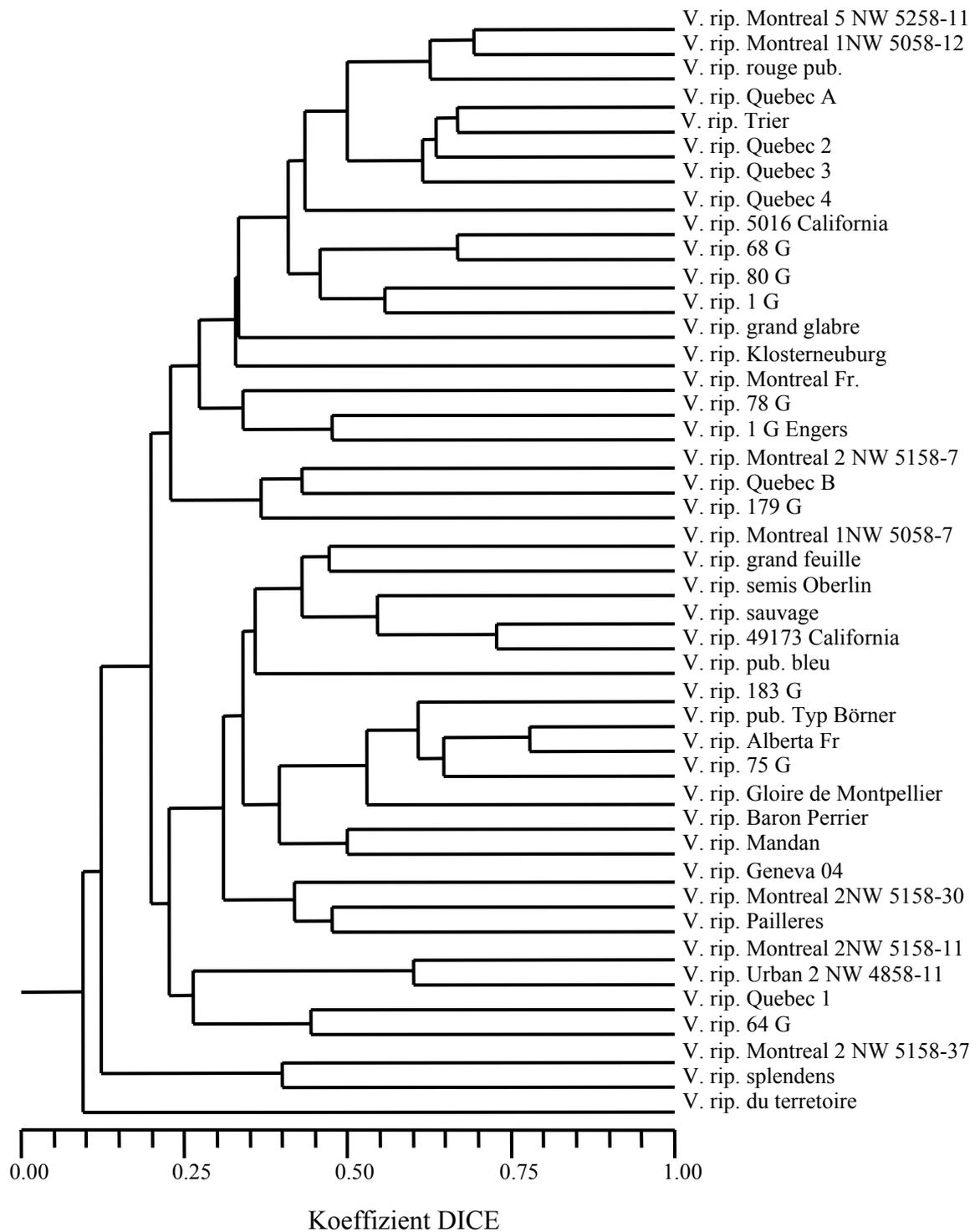


Abb. 26: Dendrogramm mit 43 verschiedenen *V. riparia* Wildformen.

Das Dendrogramm wurde mit Hilfe von UPGMA erstellt, basierend auf den RAPD-Daten, verrechnet nach DICE.

Anhand des Dendrogrammes ist zu sehen, dass die hier untersuchten Riparien genetisch differieren. Das gleiche galt für andere Wildarten wie *V. cinerea* (siehe Abbildung 27). So zeigte auch hier der Ähnlichkeitsindex Werten zwischen von 0,19 bis 0,7.

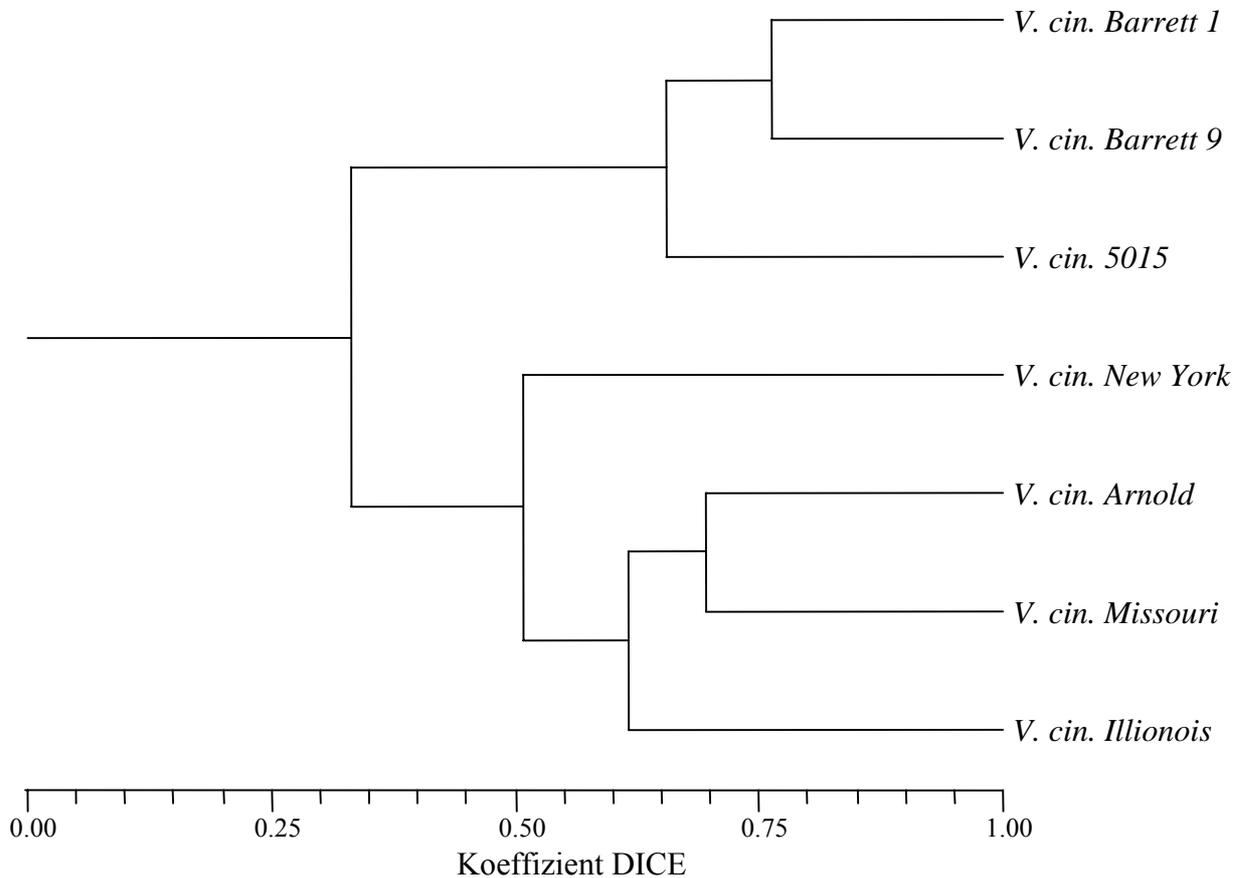


Abb. 27: Dendrogramm mit 7 verschiedenen *Vitis cinerea* Genotypen.

Das Dendrogramm wurde mit Hilfe von UPGMA erstellt, basierend auf den RAPD-Daten, verrechnet nach DICE.

3.2.6 Unterscheidung der Unterlagssorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A Goseck*

In der Literatur werden die Unterlagssorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A Goseck* als nicht trennbar angegeben (WALKER und LIU 1995; GUERRA und MEREDITH 1995; THOMAS et al. 1994). Im Rahmen der Untersuchungen zur Differenzierungsbreite von Primer #751 wurden beide Sorten untersucht. Beide Unterlagssorten konnten eindeutig durch diesen Primer voneinander abgetrennt werden.

Die eingezeichneten Pfeile markieren die zur Unterscheidung notwendigen Banden. Die Unterlagssorte *Kober 5 BB* zeigt eine Bande bei 1410 bp, *Teleki 5 A Goseck* dagegen Ban-

den bei 1355 bp, 705 bp und 585 bp (siehe Abbildung 28). Ihr Ähnlichkeitsindex zueinander betrug 0,57.

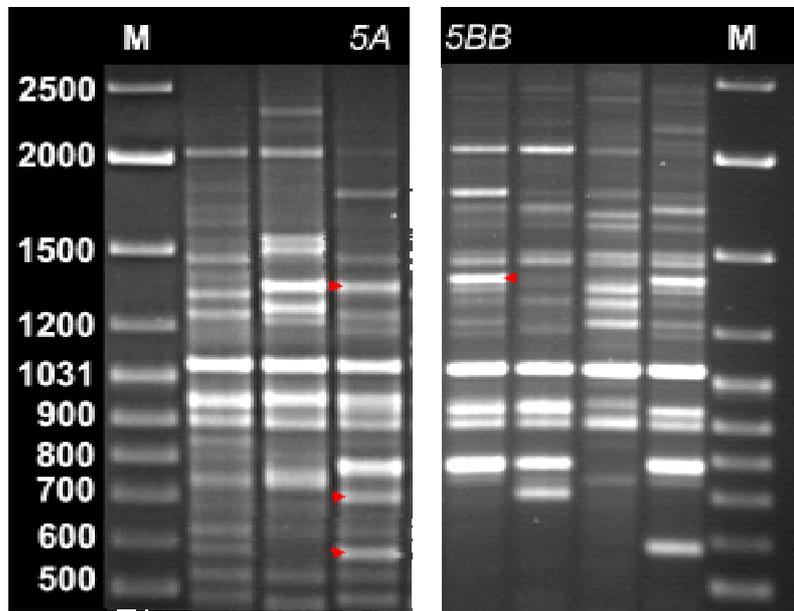


Abb. 28: Differenzierung der Unterlagssorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A*, amplifiziert mit Primer #751.

Die eingezeichneten Pfeile kennzeichnen die zur Unterscheidung wichtigen Banden.

3.2.7 Praktisches Beispiel der Sortentrennung anhand eines 30 Jahre alten Weinberges

Im Zuge der Überprüfung der Methode auf ihren Einsatz in der Routine der Sortendifferenzierung wurden immer wieder Proben untersucht, bei denen die Sorte der Unterlage unbekannt war oder überprüft werden sollte. In diesem Beispiel handelte es sich um einen bereits 30 Jahre alten Weinberg, der zur Neuanpflanzung anstand. Die Ertragsrebsorte war bekannt, die Unterlagssorte nicht. Da der Weinberg über 30 Jahre hinweg optimal stand, sollte die Unterlage der Neupflanzung der alten entsprechen. Es wurden Wurzelproben aus dem bestehenden Weinberg entnommen und auf ihre Sorte hin überprüft (Abbildung 29).

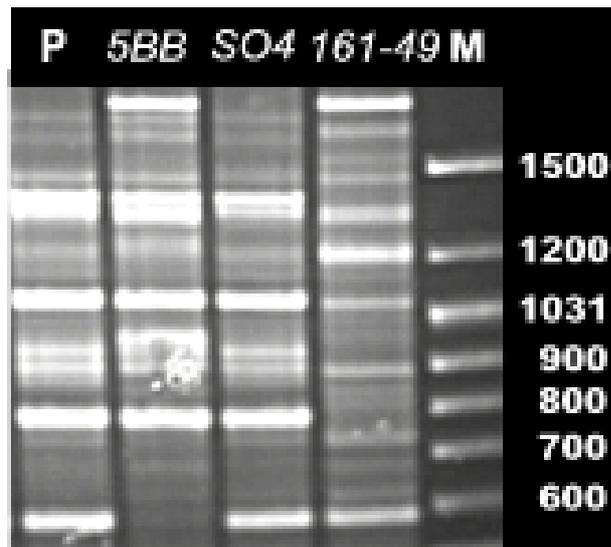


Abb. 29: Sortenidentifizierung einer Unterlage aus einem 30 Jahre alten Weinberg. Es wurden Wurzelproben aus einem 30 Jahre alten Weinberg auf die Unterlagsorte hin überprüft (P). Die Wurzelproben wurden wie bereits beschrieben behandelt und die DNA extrahiert. Als Referenzsorte wurden institutseigene Sorten eingesetzt. Die DNA wurde mit Primer #751 innerhalb einer RAPD-PCR amplifiziert.

Die mit ‚P‘ gekennzeichnete Probe wurde mit institutseigenen Unterlagssorten verglichen. Nach Abgleich der Sorten mit der zu testenden Probe wurde diese als Unterlagssorte *SO 4* erkannt.

3.3 Ähnlichkeitsverhalten der 7 in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten

Die sieben in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten, *SO 4*, *125 AA*, *8 B*, *5 C*, *5 BB*, *3309 C* und *Börner* sind eng miteinander verwandt. So gehören *SO 4*, *125 AA*, *8 B*, *5 C* und *5 BB* zu einer gemeinsamen Kreuzungsgruppe (*V. berlandieri* x *V. riparia*). *Börner* (*V. riparia* x *V. cinerea* Arnold) und *3309 C* (*V. riparia* x *V. rupestris du Lot*) sind mit dieser Gruppe über *V. riparia* verwandt. Im Rahmen einer Diplomarbeit (ORTLIEB 1999) wurden drei weitere Dekamer Primer gefunden, die alle 7 Sorten voneinander unterscheiden konnten (#746 GGGTGTGGG, #758 GGTTGGGTGG, #778 CCACACCACA). Zusammen mit den Primern #722 und #751 wurden insgesamt 70 Banden erhalten, wobei

56 davon polymorphe Banden waren. Unter diesen polymorphen Banden traten 3 auf, die spezifisch für die Kreuzungsgruppe *V. berlandieri* x *V. riparia* waren. Zudem ergaben sich 10 Einzelbanden für die Sorten 3309 C, 5 BB, SO 4 und Börner.

Die genetische Ähnlichkeit wurde nach DICE (SNEATH und SOKAL 1973) errechnet. Das in Abbildung 30 dargestellte Dendrogramm repräsentiert die genetischen Verwandtschaftsgrade zwischen den 7 Unterlagssorten.

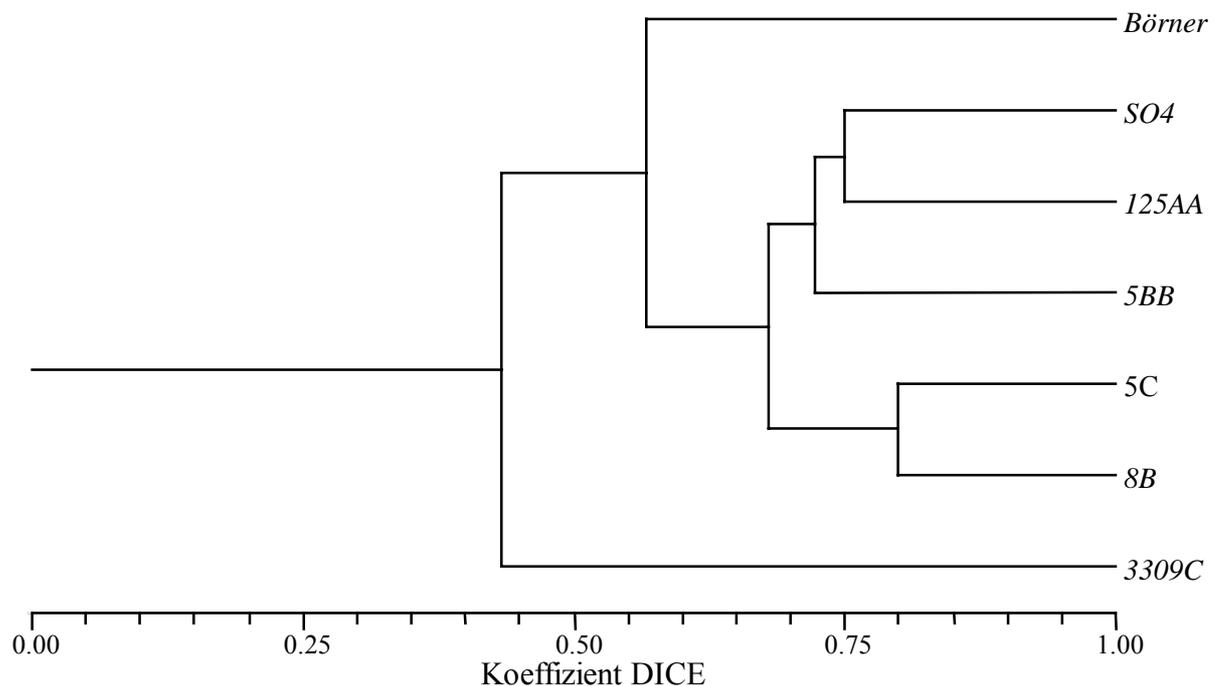


Abb. 30: Darstellung der genetischen Ähnlichkeiten der 7 Unterlagssorten SO 4, 125 AA, 5 C, 5 BB und 8 B aus der Kreuzungsgruppe *V. berlandieri* x *V. riparia* und Börner (*V. riparia* x *V. cinerea* Arnold) sowie 3309 C (*V. riparia* x *V. rupestris* du Lot). Das Dendrogramm wurde mit Hilfe der UPGMA Cluster Methode konstruiert, über die nach DICE errechneten genetischen Ähnlichkeiten, basierend auf der RAPD-Analyse mit 5 verschiedenen Primern.

Die Sorten SO 4, 125 AA, 8 B, 5 C und 5 BB bildeten ein Cluster gegenüber Börner und 3309 C, wobei innerhalb des Clusters die Unterlagssorten SO 4, 125 AA und 5 BB den Sorten 8 B und 5 C gegenüberstanden. Diese Verteilung wurde auch durch die Ähnlichkeitsindices deutlich (Tabelle 33). Börner wies im Vergleich zur Kreuzungsgruppe *V. berlandieri*

x *V. riparia* Werte zwischen 0,52 und 0,66 auf, während die Nachkommen dieser Kreuzungsgruppe untereinander Ähnlichkeitsindices zwischen 0,55 und 0,8 besaßen.

Die Unterlagssorte 3309 C war am weitesten von den untersuchten Sorten entfernt. So zeigte 3309 C mit SO 4, 125 AA, 8 B, 5 C und 5 BB Ähnlichkeitsindices zwischen 0,4 und 0,53, mit der Sorte Börner aber nur 0,29 (Tabelle 32).

	1						
SO 4	0,54	1					
125 AA	0,59	0,75	1				
5 C	0,54	0,55	0,72	1			
5 BB	0,66	0,72	0,73	0,72	1		
8 B	0,52	0,63	0,74	0,8	0,71	1	
3309 C	0,29	0,4	0,53	0,51	0,42	0,45	1

Tab. 32: Ähnlichkeitsindices der 7 untersuchten Unterlagssorten, errechnet durch DICE, basierend auf der RAPD-Analyse mit fünf verschiedenen Dekamer-Primern.

3.4 Identifikation von Unterlagssorten durch die RAPD-Analyse – Darstellung eines mathematischen Modells

Die RAPD-Analyse wird oftmals als nicht genügend reproduzierbar angesehen (XU et al. 1995). Durch Optimierung, Standardisierung und Wahl eines stabilen Dekamer-Primers wurde hier die geforderte Reproduzierbarkeit erhalten. Unter dieser Voraussetzung wurde weitergehend untersucht, ob die erhaltenen Bandenmuster in ihren Molekulargewichten so exakt reproduziert wurden, dass sie mathematisch ausgedrückt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Unterlagssorten auf der Basis der RAPD-Methode voneinander abgetrennt (siehe 3.2.4). Nun wurde untersucht, inwieweit es möglich ist mit Hilfe eines Rechenmodells, ermittelt durch KIRCHNER-NESS (pers. Mitteilungen 2000), Bandenmuster mathematisch so darzustellen, dass

1. die Unterlagssorten untereinander differenzierbar sind
2. die Unterlagssorten errechnet werden können und somit die Verwendung von Referenzen innerhalb eines Testlaufes unnötig wurden.

Für die Entwicklung eines solchen Rechenmodells wurde zunächst von 7 Unterlagssorten ausgegangen: *Börner*, *3309 C*, *SO 4*, *5 C*, *125 AA*, *8 B* und *5 BB*. Diese Sorten wurden mit Primer #751 6 mal amplifiziert und mit Hilfe von Agarose-Gelen aufgetrennt. Dann wurden die Molekulargewichte der einzelnen Banden jeder Sorte bestimmt.

Zunächst wurde versucht, die Banden aufgrund ihrer Molekulargewichte in ein Cluster einzuteilen. Dies war so allerdings nicht möglich, da die Streuungen der Molekulargewichte für die einzelnen Banden zu groß waren. Es ließen sich kein, für eine Sorte typisches Bandenmuster erkennen.

Es wurden zwei Berechnungsformen untersucht:

- Logarithmische Transformation
- Lineare Transformation

Für die logarithmische, wie für die lineare Berechnung, wurde untersucht, ob eine Zuordnung der Banden zu bestimmten Molekulargewichtsbereichen möglich war. Dabei waren keine Clusterbildungen von einzelnen Banden ersichtlich. Die sieben Sorten konnten anhand der errechneten Banden nicht voneinander unterschieden werden.

Es wurden interne Referenzbanden festgelegt, die allen untersuchten Unterlagssorten gemeinsam waren:

- D_{g1} : 906 bp
- D_{g2} : 1073 bp
- D_{g3} : 1441 bp

Die Werte der Basenpaare ergaben sich aus dem Durchschnitt der Molekulargewichte der jeweiligen Bande über alle in diesem Zusammenhang untersuchten Gele (6) und Unterlagssorten (7). Dieser für jede Referenzbande berechnete Wert wurde als D_g bezeichnet. Diese Banden fungierten als interner Standard der einzelnen Bandenmuster, anhand derer die anderen Banden ausgerichtet wurden.

Die Referenzbanden wurden in Kombinationen untereinander und einzeln als interner Standard herangezogen. Es wurden folgende Kombinationen untersucht:

- D_{g1} und D_{g2}
- D_{g1} und D_{g3}
- D_{g2} und D_{g3}

Zusätzlich wurden den untersuchten Banden Intensitätswerte zugewiesen. So stand 1 für schwache Intensität, 2 für mittlere und 3 für starke Intensität. Den Banden wurden in diesen zwei Schritten ihr Molekulargewicht und die Intensität zugeordnet.

Logarithmische Transformation der Banden:

Trotz der internen Referenzbanden konnte keine zufriedenstellende Gruppierung der einzelnen Banden stattfinden. Die Kombinationen der Referenzbanden ergaben keine erkennbaren Clusterbildungen der Banden.

Eine Ausrichtung der Banden an Referenzbande D_{g3} mit 1441 bp ließ ebenfalls keine Zuordnung der Banden zu bestimmten Molekulargewichtsbereichen und damit eine Unterscheidung der Unterlagssorten voneinander zu. D_{g2} (1073 bp) zeigte eine Struktur in den Molekulargewichtsbereichen von 1000 bp – 550 bp und um 2050 bp. Im Bereich von 1100 bp – 1850 bp war keine Einteilung der Banden möglich. D_{g1} (906 bp) ließ ebenfalls in den Bereichen 1000 bp – 550 bp und um 2050 bp eine Einteilung zu, während der Bereich von 1100 bp – 1850 bp dies nicht ermöglichte.

Lineare Transformation der Banden:

Die lineare Berechnung der einzelnen Banden (B) wurde zunächst mit Hilfe der Kombination von jeweils zweien der drei Referenzbanden (D_g) versucht. Für eine Berechnung mit D_{g2} und D_{g3} bedeutete dies beispielsweise:

$$x \longrightarrow \frac{(D_{g3}-D_{g2}) * x + B_3 * D_{g2} - B_2 * D_{g3}}{B_3 - B_2} \quad \text{Gleichung 1}$$

Diese Berechnungen (Gleichung 1) wurden für die Kombinationen D_{g1} und D_{g2} sowie D_{g1} und D_{g3} durchgeführt.

Keine der drei Kombinationen konnte eine klare Zuordnung der Banden zu einem bestimmten Molekulargewichtsbereich erkennen lassen. Deshalb wurden die Referenzbanden einzeln untersucht:

$$x \longrightarrow \frac{x * D_{g1}}{B_1} \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Berechnungen (Gleichung 2) für die einzelnen Referenzbanden zeigten, dass eine Ausrichtung der Banden an der internen Referenzbande D_{g2} (1073 bp) eine Einteilung der Banden in bestimmte Molekulargewichtsbereiche zuließ und eine Unterscheidung der Unterlagssorten aufgrund dieser Berechnung möglich war. Die Banden wurden von 1-16 nummeriert und jedem der 16 Positionen ein Molekulargewichtsbereich zugeordnet, dem wiederum die Banden mit ihren jeweiligen Molekulargewichten zugewiesen wurden. Es entstand ein ‚errechnetes Bandenmuster‘.

Bei diesen Berechnungen war die Information der Intensität der Banden wichtig. Aufgrund der Intensität, die üblicherweise nicht in die Beurteilung von RAPD-Bandenmustern mit einfließt, konnte zwischen ‚wichtigen, immer auftretenden Banden‘ und ‚nicht wichtigen Banden‘ unterschieden werden. Durch die Gewichtung der Banden aufgrund ihrer Intensitätsstufen 1-3 konnte zwischen den Banden differenziert werden, die immer anwesend sein mussten, da sie zur Unterscheidung dienten (Intensität 2, 3) und solchen, die in ihrer Intensität schwach (1) und nicht immer vorhanden waren.

In Abbildung 31-37 wurden die errechneten Banden der untersuchten Unterlagssorten dargestellt. Die Säulen, die über einen Wert von 1,5 kamen, repräsentierten die Banden, welche eine Intensität von 2-3 besaßen und zur Differenzierung der Sorten voneinander führten.

Die Banden wurden nach der bereits aufgeführten Formel berechnet:

$$x \longrightarrow \frac{x * D_{g2}}{B_2} \qquad \text{Gleichung 3}$$

Wobei x für die zu errechnende Bande stand, D_{g2} das Durchschnittsmolekulargewicht der Bande 11 darstellte und B_2 den aktuellen Wert der Bande 11 im zu analysierenden Gel der entsprechenden Sorte repräsentierte.

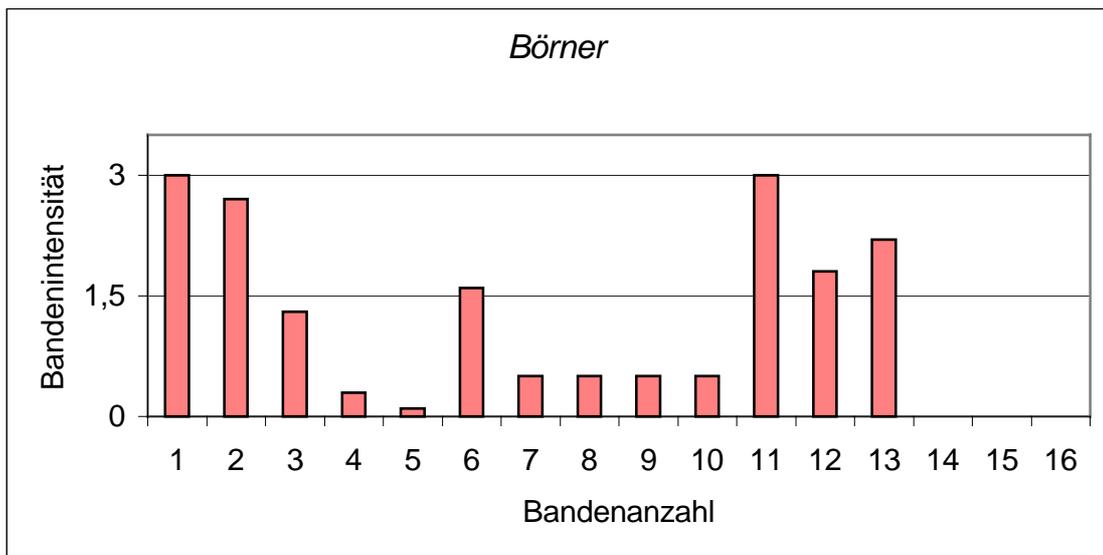


Abb. 31: Das Bandenmuster der Unterlagssorte *Börner*, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

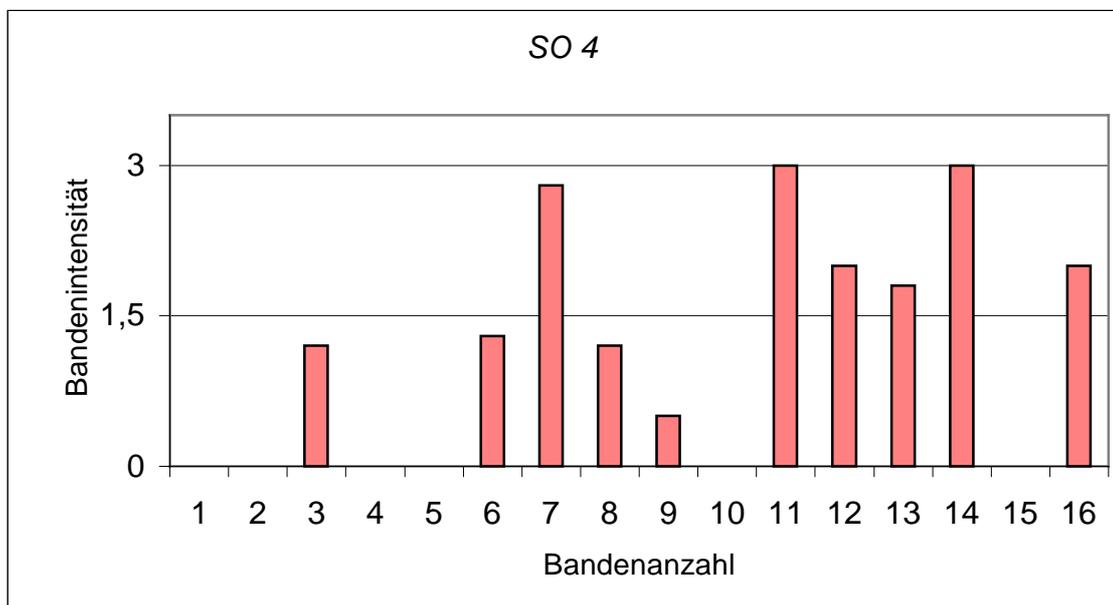


Abb. 32: Das Bandenmuster der Unterlagssorte *SO 4*, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

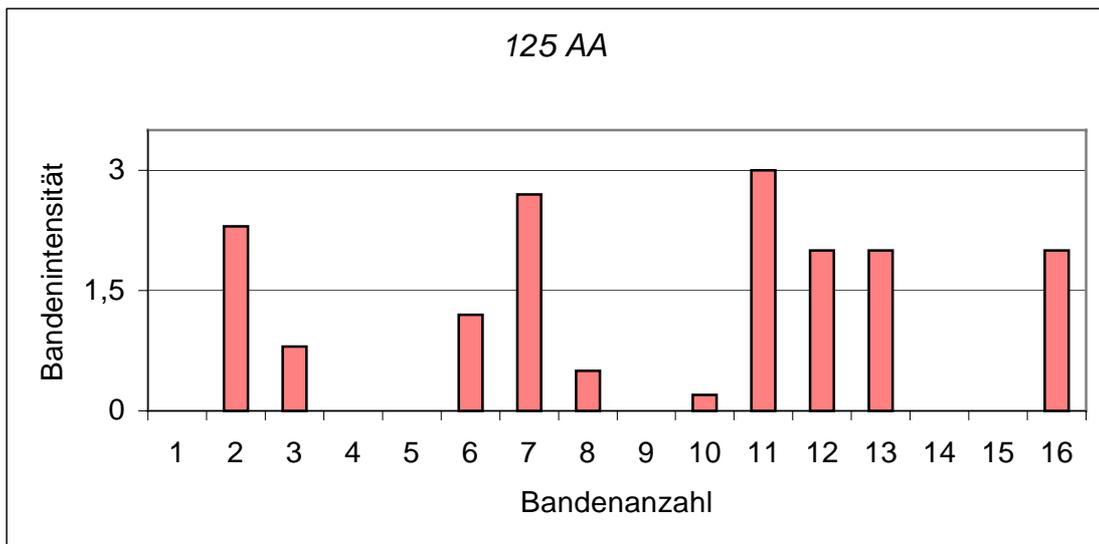


Abb. 33: Das Bandenmuster der Unterlagssorte 125 AA, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

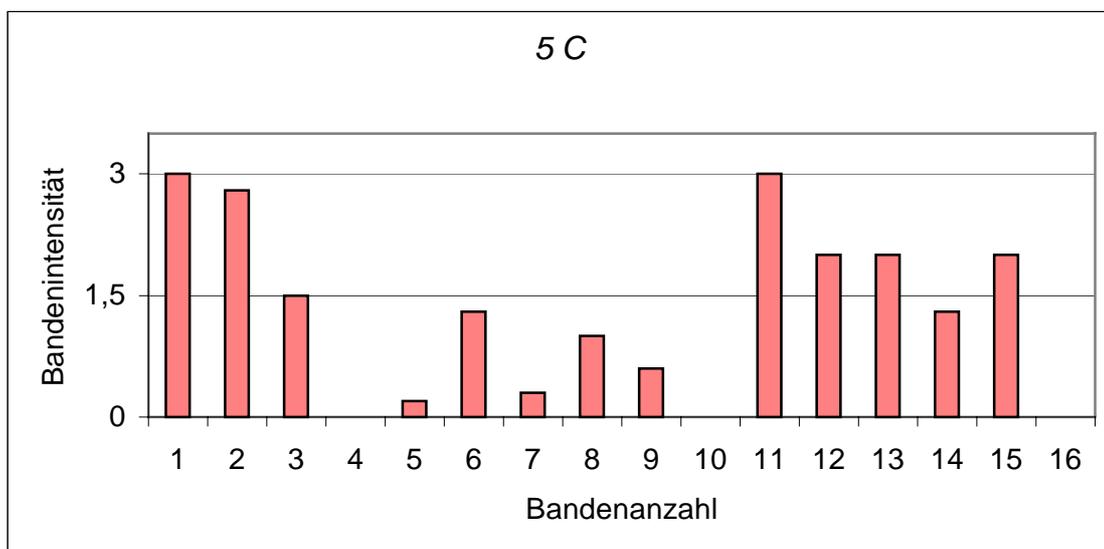


Abb. 34: Das Bandenmuster der Unterlagssorte 5 C, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

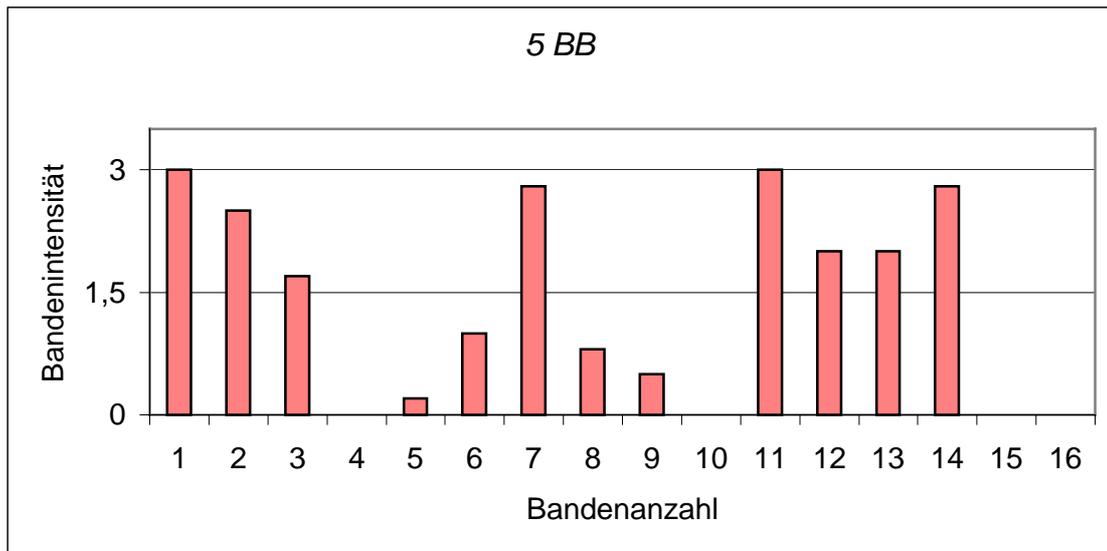


Abb. 35: Das Bandenmuster der Unterlagssorte 5 BB, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

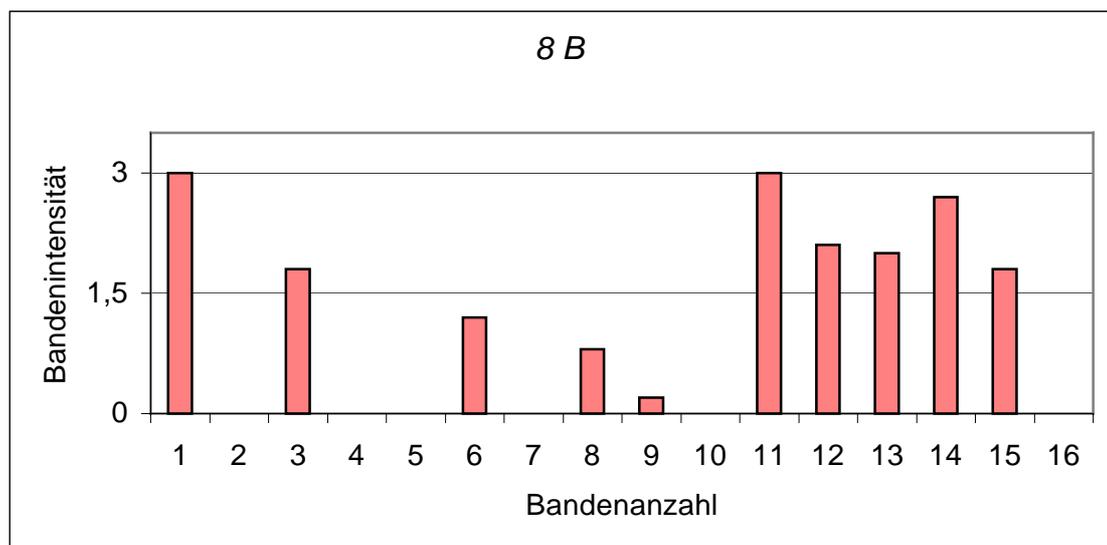


Abb. 36: Das Bandenmuster der Unterlagssorte 8 B, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

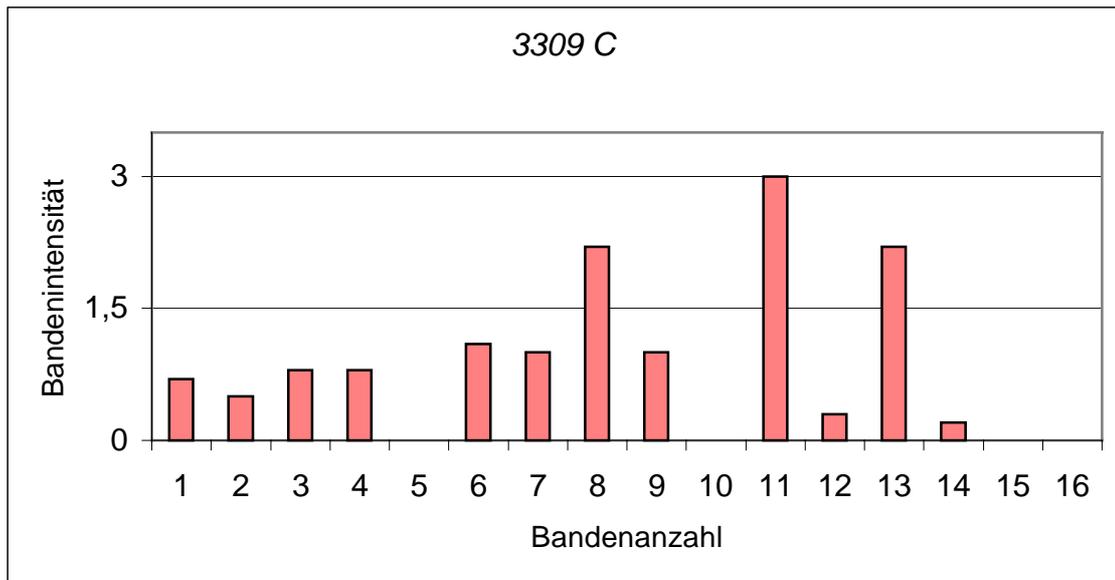


Abb. 37: Das Bandenmuster der Unterlagssorte 3309 C, errechnet mit Bande 11 (D_{g2}) als Referenzbande.

Das hier beschriebene Rechenmodell war in der Lage, die Bandenmuster der 7 Unterlagssorten mathematisch darzustellen. Ausschlaggebend war die lineare Ausrichtung aller Banden an der Referenzbande D_{g2} und die Bewertung der Intensitäten aller ausgewerteter Banden.

Die in diesem Zusammenhang untersuchten Unterlagssorten zeigten ein charakteristisches Muster und waren im Rahmen dieses Modells identifizierbar.

3.5 Untersuchungen zur genetischen Varianz von Unterlagenklonen

Da Unterlagenklone schwer bzw. gar nicht ampelographisch zu unterscheiden sind, stellte sich die Frage, ob es möglich war, mit Hilfe von Marker-Systemen genetische Varianzen innerhalb der Unterlagenklone zu detektieren.

Es wurden verschiedene Methoden daraufhin untersucht: RAPD-, AFLP- und SAMPL-Analyse.

3.5.1 Die RAPD-Analyse zum Nachweis genetischer Varianzen

Der Primer #751 konnte 144 Unterlagssorten voneinander abgrenzen. Es wurde am Beispiel der Unterlagssorte 5 C untersucht, inwieweit eine Auftrennung von Klonen mit diesem Primer möglich war. In Abbildung 38 ist die Auftrennung der Klone der Unterlagssorte 5 C dargestellt. Der Primer #751 war nicht in der Lage, Unterschiede zwischen einzelnen Klonen aufzuzeigen.

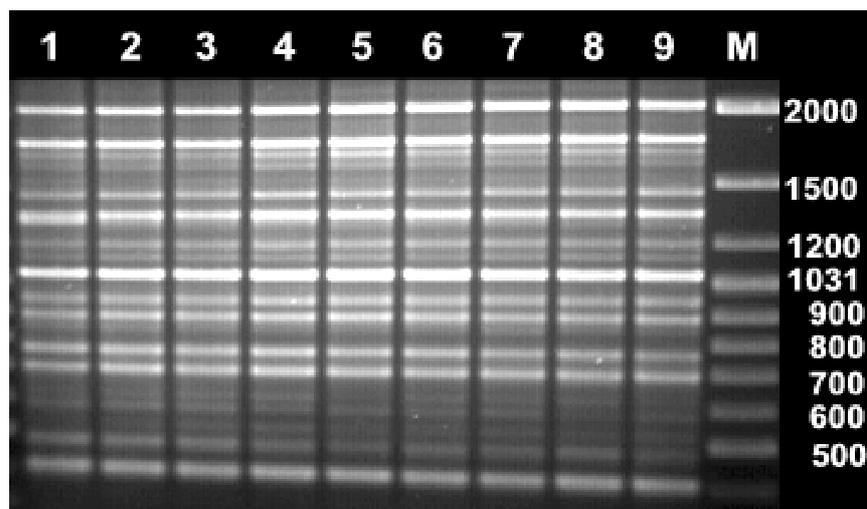


Abb. 38: Klone der Unterlagssorte 5 C, amplifiziert mit Primer #751.

Bahn 1: 5 C Kl 6-22 Gm [1], Bahn 2: 5 C Kl 6-4-22 Gm, Bahn 3: 5 C Kl 10-48-49 Gm, Bahn 4: 5 C Kl 6-22 Gm [2], Bahn 5: 5 C Kl 6-16 Gm, Bahn 6: 5 C Kl 6-53 Gm, Bahn 7: 5 C Kl 10-49 Gm, Bahn 8: 5 C Kl 6-13 Gm, Bahn 9: 5 C Kl 6-52 Gm, M: Molekulargewichtsmarker.

Im Rahmen einer Diplomarbeit (NILSSON 2001) wurde unter anderem die Auftrennung von Unterlagenklonen mit Tetranukleotid-Primern untersucht. Dabei zeigten außer dem Primer #156 alle übrigen Tetranukleotid-Primer ebenfalls keine Unterschiede auf. Die 5 C Klone wurden mit Primer #156 (TGC CCC GAG C) amplifiziert und in einem Agarose-Gel aufgetrennt (Abbildung 39).

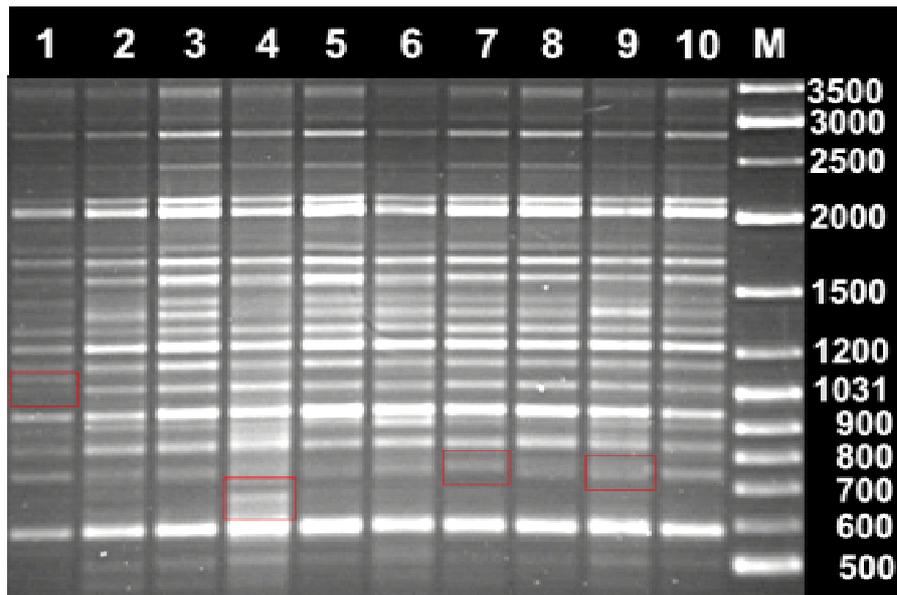


Abb. 39: Klone der Unterlagssorte 5 C, amplifiziert mit Primer #156.

Bahn 1: 5 C Kl 6-22 Gm [1], Bahn 2: 5 C Kl 6-22 Gm [2], Bahn 3: 5 C Kl 6-22 Gm [3], Bahn 4: 5 C Kl 6-4-22 Gm, Bahn 5: 5 C Kl 6-13 Gm, Bahn 6: 5 C Kl 6-16 Gm, Bahn 7: 5 C Kl 6-52 Gm, Bahn 8: 5 C Kl 6-53 Gm, Bahn 9: 5 C Kl 10-48-49 Gm, Bahn 10: 5 C Kl 10-49 Gm, M: Molekulargewichtsmarker.

Mit dem Primer #156 konnte keine direkte Differenzierung zwischen den Klonen erreicht werden. Allerdings zeigten die Klone gewisse Unregelmäßigkeiten in ihrem Bandenmuster (markierte Bereiche), die auch reproduziert werden konnten. Die mit [1]-[3] markierten 5 C Kl 6-22 Gm sowie 5 C Kl 6-13 Gm, 5 C Kl 6-16 Gm, 5 C Kl 6-52 Gm und 5 C Kl 6-53 Gm stammten aus dem Unterlagenschnittgarten Mandel in Lorch.

Für eine größere Trennungsschärfe wurden die 5 C Klone, amplifiziert mit Primer #156, in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 40).

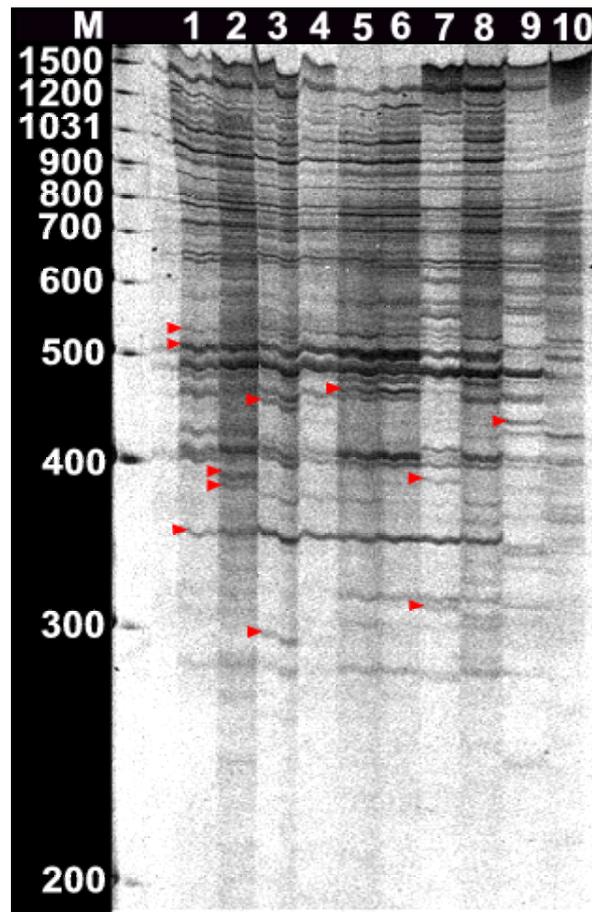


Abb. 40: Die Klone der Unterlagssorte 5 C wurden mit Primer #156 (TGC CCC GAG C) amplifiziert und in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Bahn 1: 5 C Kl 10-49 Gm, Bahn 2: 5 C Kl 10-48-49 Gm, Bahn 3: 5 C Kl 6-53 Gm, Bahn 4: 5 C Kl 6-52 Gm, Bahn 5: 5 C Kl 6-16 Gm, Bahn 6: 5 C Kl 6-13 Gm, Bahn 7: 5 C Kl 6-4-22 Gm, Bahn 8: 5 C Kl 6-22 Gm [1], Bahn 9: 5 C Kl 6-22 Gm [4], Bahn 10: 5 C Kl 6-22 Gm [2], M: Molekulargewichtsmarker.

Die wichtigen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

In Tabelle 34 sind die Banden aufgeführt, die in der Abbildung 40 mit Pfeil gekennzeichnet sind und Unterschiede zwischen den Klonen ergaben. Dabei ist zu beachten, dass die Klone 5 C Kl 10-49 Gm, 5 C Kl 6-53 Gm, 5 C Kl 6-52 Gm, 5 C Kl 6-16 Gm, 5 C Kl 6-13 Gm und der erste sowie der letzte aufgeführte 5 C Kl 6-22 Gm Klon von einem anderen Standort stammten (Mandel, Lorch am Rhein).

Molekulargewicht [bp]	5 C Klone									
	10-49 Gm	10-48-49 Gm	6-53 Gm	6-52 Gm	6-16 Gm	6-13 Gm	6-4-22 Gm	6-22 Gm [1]	6-22 Gm [4]	6-22 Gm [2]
530	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
510	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
470	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
440	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
390	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
380	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
360	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
320	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
290	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 34: Darstellung der Banden, die genetische Varianzen zwischen den 5 C Klonen aufzeigten.

Die Klone *5 C Kl 10-49 Gm*, *5 C Kl 6-52 Gm* und der erste der *5 C Kl 6-22 Gm* wiesen ein einheitliches Bandenmuster auf. Das gleiche galt für die Klone *5 C Kl 6-16 Gm* und *5 C Kl 6-13 Gm*. Die Gruppen wiesen untereinander, wie auch im Vergleich zu den übrigen 5 C Klonen, Banden auf, die sie voneinander abgrenzten. Es war auffällig, dass die drei *5 C Kl 6-22 Gm* Klone unterschiedliche Banden aufwiesen; wobei der zweite *5 C Kl 6-22 Gm* im Vergleich zu den beiden anderen ein sehr unterschiedliches Bandenmuster zeigte.

Es konnten auf diese Weise Unterschiede zwischen den Klonen festgestellt werden, aber die Banden waren aufgrund ihrer Größe nicht eindeutig voneinander abzugrenzen. Aus diesem Grund wurden Methoden eingesetzt, die kürzere Fragmente lieferten, die innerhalb eines Polyacrylamidgeles besser aufzutrennen waren und eindeutige Ergebnisse lieferten.

3.5.2 AFLP- und SAMPL-Analyse zum Nachweis von genetischen Varianzen der Klone der Unterlagssorten *SO 4*, *5 BB* und *5 C* sowie der Unterlagssorte *Bino-va*

Die ‚amplified fragment length polymorphism‘ (AFLP) Analyse beruht auf dem Schneiden genomischer DNA und der anschließenden selektiven Amplifikation der so erhaltenen Fragmente. Aufgrund der relativ kurzen DNA-Fragmente ist es möglich, auch minimale Unterschiede in Genomen festzustellen (VOS et al. 1995). Somit könnte sich die AFLP zur Unterscheidung von sehr eng verwandten Sorten oder sogar von Klonen eignen.

Die ‚selective amplified microsatellite polymorphism loci‘ (SAMPL)-Analyse entspricht in ihrem methodischen Ablauf der AFLP. Der Unterschied zwischen beiden Methoden besteht darin, dass bei der SAMPL-Analyse im zweiten Amplifikationsschritt ein Primer mit Mikrosatellitenstruktur verwendet wird.

Mit acht Primerkombinationen, vier AFLP (siehe 2.2.6.6) und vier SAMPL (siehe 2.2.7) Primerkombinationen wurden die in Tabelle 35 aufgeführten Unterlagenklone getestet.

Unterlagssorte	Unterlagenklon	Herkunft	Feld/Block/Zeile/Stock
<i>SO 4</i>	<i>2 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 1 / 9 / 4
<i>SO 4</i>	<i>47 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 2 / 9 / 1
<i>SO 4</i>	<i>47-7 Gm</i>	Geisenheim	N / 1 / 4 / 3
<i>SO 4</i>	<i>60 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 3 / 9 / 1
<i>SO 4</i>	<i>94 INRA</i>	Geisenheim	N / 3 / 15 / 3
<i>SO 4</i>	<i>SICA-ANTAV</i>	Geisenheim	N / 3 / 14 / 3
<i>Binova</i>		Geisenheim	N / 3 / 27 / 9
<i>5 C</i>	<i>6-4-22 Gm</i>	Geisenheim	N / 1 / 18 / 2
<i>5 C</i>	<i>6-13 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 5 / 3 / 1
<i>5 C</i>	<i>6-16 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 4 / 3 / 1
<i>5 C</i>	<i>6-22 Gm [4]</i>	Geisenheim	N / 1 / 17 / 4
<i>5 C</i>	<i>6-22 Gm [1]</i>	Mandel, Lorch	- / 3 / 3 / 1
<i>5 C</i>	<i>6-22 Gm [2]</i>	Mandel, Lorch	- / 3 / 3 / 3
<i>5 C</i>	<i>6-22 Gm [3]</i>	Mandel, Lorch	- / 3 / 3 / 5
<i>5 C</i>	<i>6-52 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 2 / 3 / 1
<i>5 C</i>	<i>6-53 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 1 / 3 / 1
<i>5 C</i>	<i>10-48-49</i>	Geisenheim	N / 1 / 1 / 2
<i>5 C</i>	<i>10-49 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 6 / 3 / 2
<i>5 BB</i>	<i>13-3 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 6 / 1 / 1
<i>5 BB</i>	<i>13-5 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 5 / 1 / 2
<i>5 BB</i>	<i>13-5 Gm</i>	Geisenheim	- / 1 / 15 / 2
<i>5 BB</i>	<i>13-11 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 4 / 1 / 3
<i>5 BB</i>	<i>13-13 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 3 / 1 / 1
<i>5 BB</i>	<i>13-15 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 2 / 1 / 1
<i>5 BB</i>	<i>13-21 Gm</i>	Mandel, Lorch	- / 1 / 1 / 1
<i>5 BB</i>	<i>13-44-3 Gm</i>	Geisenheim	N / 1 / 13 / 2
<i>5 BB</i>	<i>13-45-5 Gm</i>	Geisenheim	N / 1 / 15 / 3
<i>5 BB</i>	<i>48 WE</i>	Geisenheim	N / 3 / 4 / 2
<i>5 BB</i>	<i>137 WZ</i>	Geisenheim	N / 3 / 5 / 1
<i>5 BB</i>	<i>276 INRA</i>	Geisenheim	N / 2 / 8 / 1
<i>5 BB</i>	<i>ANTAV</i>	Geisenheim	N / 3 / 7 / 3

Tab. 35: Die hier dargestellten Unterlagssorten und deren Klone wurden mit vier AFLP und vier SAMPL Primerkombinationen untersucht.

Die Unterlagssorte *5 C Kl 6-22 Gm* war mit 4 unterschiedlichen Pflanzen vertreten, *5 BB Kl 13-5 Gm* mit 2 Pflanzen.

3.5.2.1 Auswertungen der AFLP- und SAMPL-Analysen

Die exprimierten Röntgenfilme wurden so gelesen, indem jede präsente Bande mit ‚1‘ und jede abwesende Bande mit ‚0‘ in ein Schema eingetragen wurde. Daraus ergab sich eine binäre Matrix, mit der verschiedene Auswertungen vorgenommen wurden.

Zuerst erfolgte eine Trennung der Banden nach monomorphen und polymorphen Banden. Danach wurden die polymorphen Banden nochmals in ‚unterlagssortenspezifische Banden‘, ‚Einzelbanden‘ und nach ‚wiederholende Banden‘ unterteilt. Zu diesen kamen noch die ‚polymorphen, nicht zu einer Unterscheidung geeigneten Banden‘.

‚Wiederholende Banden‘ bilden einen sich wiederholenden Polymorphismus. Diese Banden treten in mehr als einem Klon innerhalb einer Unterlagssorte auf. Als ‚polymorphe, nicht zu einer Unterscheidung geeignete Banden‘ wurden die Banden aufgeführt, die in mehr als einem Klon unterschiedlicher Unterlagssorten auftraten. Diese Banden führen nicht zur Identifikation einer Unterlagssorte; sie stellen keine Einzelbande für einen einzigen Klon einer Unterlagssorte dar und sie bilden keinen sich wiederholenden Polymorphismus innerhalb einer Unterlagssorte. Aus diesem Grund konnten diese Banden nicht zur Unterscheidung von Unterlagssorten oder –klonen herangezogen werden und flossen demnach nicht in den Anteil der polymorphen Banden mit ein. Sie sollten aber ihre Verwendung innerhalb der Ähnlichkeitsanalyse finden.

Ausgewertet wurden nun auf der einen Seite die Unterscheidung der Unterlagssorten und ihrer Klone, auf der anderen Seite die Diversität der Unterlagssorten und ihrer Klone mit Hilfe von Ähnlichkeitsindices und Dendrogramm. Beispiele zu den einzelnen Bandentypen wurden in Abbildung 41 dargestellt.

	5 BB - Klone	SO 4 - Klone	5 C – Klone
monomorph	x x x x x x x x	x x x x x x x x	x x x x x x x x
Unterlagssortenspezifisch	x x x x x x x x	- - - - -	- - - - -
Einzelbanden	- - - - -	- - - x - -	- - - - -
Wiederholende Banden	- - - - -	- - - - -	- x - - x - x -
Nicht zur Unterscheidung geeignete Banden	- - - x - - - x	- - - x - - -	- - - x x - - -

Abb. 41: Beispiele der Einteilung der auftretenden Banden in monomorphe, ‚unterlagssortenspezifische Banden‘, ‚Einzelbanden‘, ‚wiederholende Banden‘ und ‚polymorphe, aber nicht zu einer Unterscheidung geeignete Banden‘.

Dabei stellte ‚x‘ eine vorhandene Bande dar, ‚-‘ stand für fehlende Banden. Es war zu beachten, dass hier nur Beispiele der Bandeneinteilungen dargestellt wurden. Es waren auch andere Kombinationen innerhalb eines Bandentyps möglich.

In Abbildung 42 ist ein Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel dargestellt, welches aufgetrennte, in der AFLP-Analyse untersuchte Proben zeigt. Es sind monomorphe Banden sowie ‚unterlagssortenspezifische Banden‘ und ‚Einzelbanden‘ zu erkennen. Die für alle Sorten und Klone erkennbaren, monomorphen Banden wurden zur Ermittlung der anteiligen Prozentigkeit der polymorphen Banden zur Gesamtmenge an Banden benötigt und daher mitgezählt. Sie gingen aber nicht in die Berechnung für die Diversitäten mit ein.

Die Zahlen, welche auf dem Gel zu lesen sind, markieren teilweise die zur Auswertung verwendeten Banden.

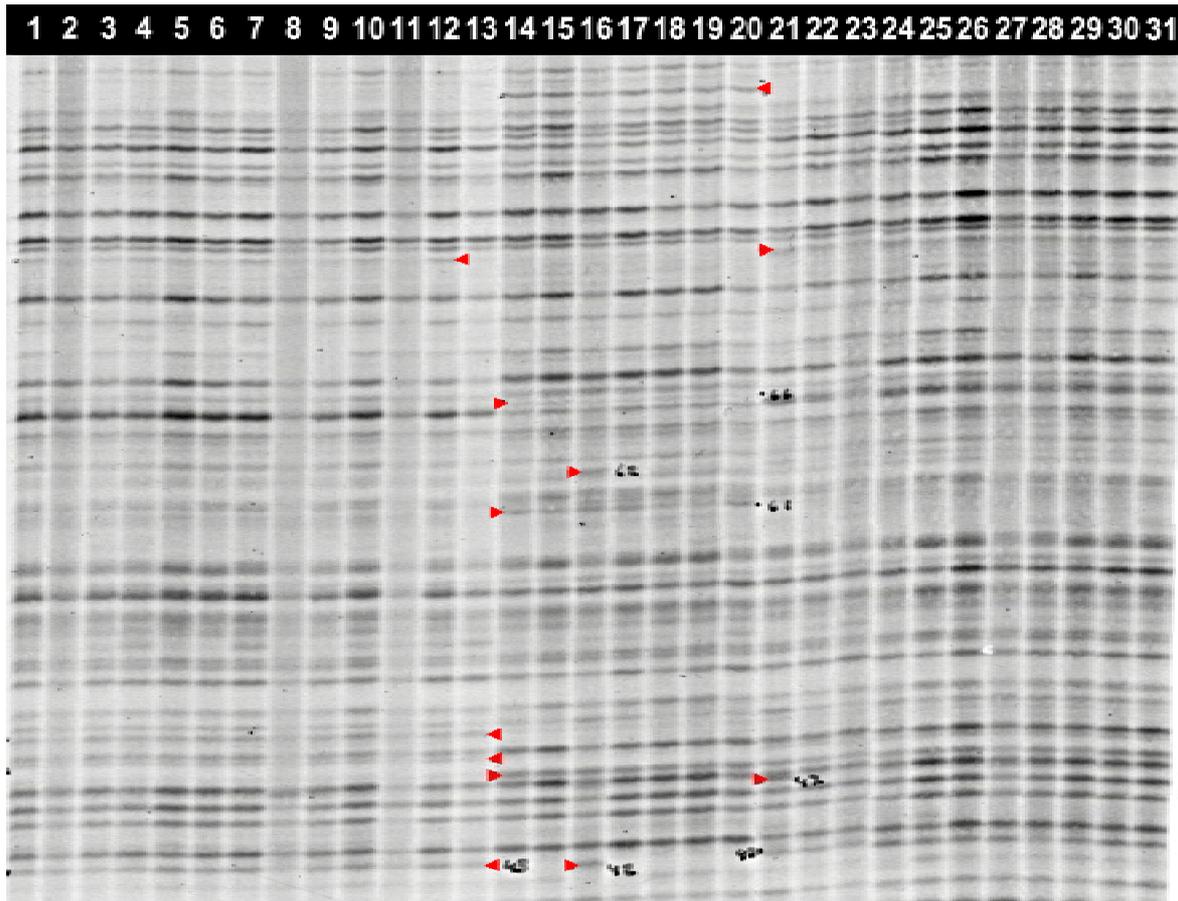


Abb. 42: Darstellung eines Ausschnittes aus einem Polyacrylamidgel mit Proben aus der AFLP-Analyse mit Primerkombination E36+38 / G31. Die Pfeile markieren die polymorphen Banden: ‚unterlagssortenspezifische‘ und ‚Einzelbanden‘.

1: 5 BB Kl 13-3 Gm	11: 5 BB Kl 137 WZ	21: 5 C Kl 6-4-22 Gm
2: 5 BB Kl 13-5 Gm	12: 5 BB Kl 276 INRA	22: 5 C Kl 6-13 Gm
3: 5 BB Kl 13-5 Gm	13: 5 BB Kl ANTAV	23: 5 C Kl 6-16 Gm
4: 5 BB Kl 13-11 Gm	14: SO 4 Kl 2 Gm	24: 5 C Kl 6-22 Gm [1]
5: 5 BB Kl 13-13 Gm	15: SO 4 Kl 47 Gm	25: 5 C Kl 6-22 Gm [2]
6: 5 BB Kl 13-15 Gm	16: SO 4 Kl 47-7 Gm	26: 5 C Kl 6-22 Gm [3]
7: 5 BB Kl 13-21 Gm	17: SO 4 Kl 60 Gm	27: 5 C Kl 6-22 Gm [4]
8: 5 BB Kl 13-44-3 Gm	18: SO 4 Kl 94 INRA	28: 5 C Kl 6-52 Gm
9: 5 BB Kl 13-45-5 Gm	19: SO 4 Kl SICA+ANTAV	29: 5 C Kl 6-53 Gm
10: 5 BB Kl 48 WE	20: Binova	30: 5 C Kl 10-48-49 Gm
		31: 5 C Kl 10-49 Gm

Die Auswertung der SAMPL-Analyse wurde wie die der AFLP-Analyse durchgeführt. Auch hier wurde schließlich eine binäre Matrix erstellt, mit Hilfe derer die Prozentigkeiten der einzelnen auftretenden Banden in Bezug auf die Gesamtmenge an Banden errechnet wurden (Tabellen I und II, siehe Anhang). Da im Falle der SAMPL-Analyse Primer mit

Mikrosatellitenstruktur verwendet wurden, traten innerhalb des Gels neben den Fragmenten, wie sie in der AFLP-Analyse zu finden waren, auch Mikrosatellitenstrukturen auf (siehe Abbildung 43, durch Pfeile gekennzeichnet). Diese wurden so gezählt, dass die stärkste Bande mit ‚1‘ gezählt wurde, während die anderen zu dieser Struktur gehörenden Banden nicht in die Bewertung mit einfließen.

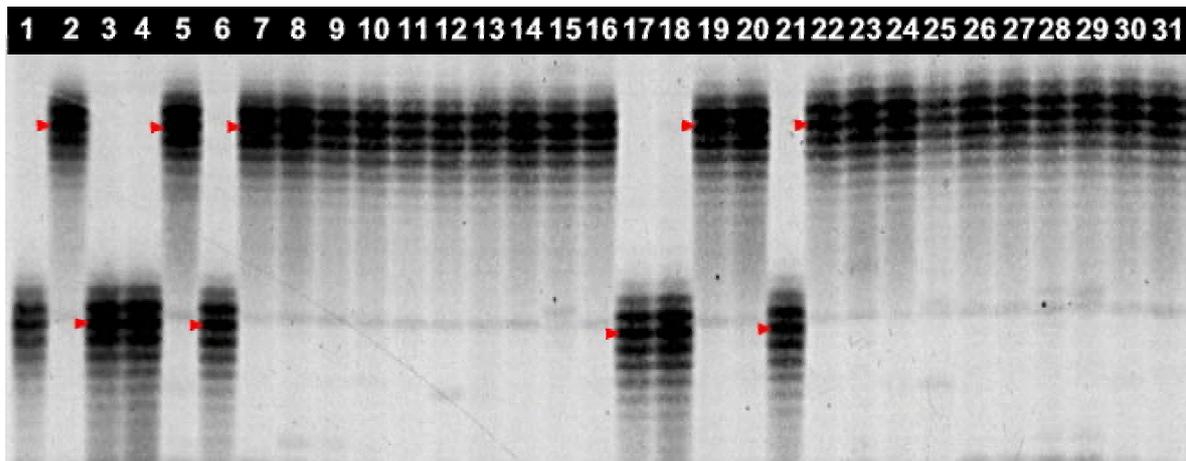


Abb. 43: Darstellung eines Ausschnitts von einem Polyacrylamidgel mit Proben aus der SAMPL-Analyse mit der Primerkombination SAMPL 1 / E+AC . Die hier aufgetrennten Proben aus einer SAMPL-Analyse zeigten Mikrosatellitenstrukturen, die bedingt durch den verwendeten Mikrosatellitenprimer auftraten (durch Pfeile gekennzeichnet).

1: <i>SO 4 Kl 47-7 Gm</i>	11: <i>5 C Kl 6-4-22 Gm</i>	21: <i>SO 4 Kl 60 Gm</i>
2: <i>5 C Kl 6-22 Gm [1]</i>	12: <i>5 C Kl 10-48-49 Gm</i>	22: <i>5 C Kl 10-49 Gm</i>
3: <i>SO 4 Kl 94 INRA</i>	13: <i>5 BB Kl 13-45-5 Gm</i>	23: <i>5 BB Kl 13-15 Gm</i>
4: <i>SO 4 Kl SICA+ANTAV</i>	14: <i>5 BB Kl 13-44-3 Gm</i>	24: <i>5 C Kl 6-52 Gm</i>
5: <i>5 BB Kl 13-5 Gm</i>	15: <i>5 C Kl 6-22 Gm [2]</i>	25: <i>5 C Kl 6-13 Gm</i>
6: <i>Binova</i>	16: <i>5 C Kl 6-16 Gm</i>	26: <i>5 BB Kl 13-5 Gm</i>
7: <i>5 BB Kl 137 WZ</i>	17: <i>SO 4 Kl 2 Gm</i>	27: <i>5 BB Kl 13-3 Gm</i>
8: <i>5 BB Kl 48 WE</i>	18: <i>SO 4 Kl 47 Gm</i>	28: <i>5 BB Kl 13-21 Gm</i>
9: <i>5 BB Kl 276 INRA</i>	19: <i>5 C Kl 6-53 Gm</i>	29: <i>5 BB Kl 13-11 Gm</i>
10: <i>5 BB Kl ANTAV</i>	20: <i>5 BB Kl 13-13 Gm</i>	30: <i>5 C Kl 6-22 Gm [3]</i>
		31: <i>5 C Kl 6-22 Gm [4]</i>

Es soll zuerst auf die Unterscheidung der Unterlagssorten und ihrer Klone und danach auf die Diversität eingegangen werden. Die Ergebnisse in Tabelle I (siehe Anhang) wurden prozentual dargestellt. Tabelle II (siehe Anhang) zeigt die ermittelten Ergebnisse, welche nach den jeweiligen Sorten aufgliedert wurden. In den Abschnitten a) bis e) wird auf die in beiden Tabellen dargestellten Ergebnisse eingegangen.

a) Trennung der Unterlagssorten *SO 4*, *5 BB* und *5 C*

Mit Hilfe der Methoden AFLP und SAMPL war es möglich, die Unterlagssorten *SO 4*, *5 C* und *5 BB* zu trennen. Insgesamt lieferten beide Methoden 560 Banden, AFLP davon 277, SAMPL 283 Banden. Davon waren 140 Banden für AFLP und SAMPL polymorphe Banden. Die Anteile der gefundenen polymorphen Banden betrug für die AFLP-Analyse 24,19 % und für die SAMPL-Analyse 25,8 %.

b) Unterlagssortenspezifische Banden

Weiterhin wurden spezifische Banden für jede Unterlagssorte gefunden. Für AFLP ergab dies 16,25 %, für SAMPL 19,79 %. Diese Werte zeigen, dass prozentual mehr ‚unterlagssortenspezifische Banden‘ mit Hilfe der SAMPL-Analyse gefunden wurden. Dabei ist zu beachten, dass verschiedene Unterlagssorten mit bestimmten Primerkombinationen unterschiedliche Resultate zeigten (Tabelle II, siehe Anhang). In Tabelle II sind die gezählten Banden nach ihrem Auftreten innerhalb der unterschiedlichen Sorten aufgeführt. Es zeigte sich hierbei, dass sich beispielsweise die Primerkombination SAMPL 2 / E+AG besonders gut zur Abtrennung der Unterlagssorte *SO 4* eignete (13 Banden), während *5 C* gut durch die Primerkombination SAMPL 2 / E+AC (5 Banden) und *5 BB* klar durch SAMPL 1 / E+AC (13 Banden) zu charakterisieren war. AFLP zeigte solche klaren Unterschiede für die einzelnen Unterlagssorten nicht. Hier fiel auf, dass insbesondere die Unterlagssorte *5 BB* gut durch die Primerkombinationen E 36+38 / G30 (13 Banden) und E 36+38 / G31 (13 Banden) von *SO 4* und *5 C* abzutrennen war.

c) Einzelbanden

Beide Methoden zeigten mit bestimmten Unterlagsklonen ‚Einzelbanden‘. Für AFLP war dies ein Prozentsatz von 6,86 %, für SAMPL waren dies 4,5 %. (siehe Tabelle I, Tabelle 36). Für diesen Bandentyp galt, dass nur innerhalb dieser Untersuchungen von ‚Einzelbanden‘ gesprochen werden konnte, da eine begrenzte Anzahl an Pflanzen getestet worden war.

Method	Primerkombination	Unterlagsklon
SAMPL	SAMPL 1 / E+AC	<i>SO 4 Kl 47-7 Gm</i>
		<i>SO 4 Kl 47-7 Gm</i>
	SAMPL 1 / E+AG	<i>5 C Kl 10-48-49 Gm</i>
		<i>5 BB Kl 13-11 Gm</i>
	SAMPL 2 / E+AC	<i>5 C Kl 6-22 Gm [3]</i>
		<i>SO 4 Kl SICA ANTAV</i>
	SAMPL 2 / E+AG	<i>5 BB Kl 13-45-5 Gm</i>
		<i>5 C Kl 6-22 Gm [2]</i>
		<i>5 C Kl 10-48-49 Gm</i>
		<i>5 BB Kl 137 WZ</i>
AFLP	E 36+38 / G 24	<i>5 C Kl 6-4-22 Gm</i>
		<i>5 C Kl 6-22 Gm [3]</i>
		<i>5 BB Kl 13-45-5 Gm</i>
	E 36+38 / G 29	<i>5 BB Kl 13-44-3 Gm</i>
		<i>5 BB Kl 276 INRA</i>
	E 36+38 / G 30	<i>5 C Kl 6-4-22 Gm</i>
		<i>5 C Kl 10-48-49 Gm</i>
		<i>5 C Kl 10-49 Gm</i>
		<i>5 C Kl 6-13 Gm</i>
		<i>5 C Kl 6-16 Gm</i>
	E 36+38 / G 31	<i>SO 4 Kl 47-7 Gm</i>
		<i>5 C Kl 10-48-49 Gm</i>
		<i>5 C Kl 6-16 Gm</i>

Tab. 36: Darstellung der Unterlagsklone und Primerkombinationen, für die ‚Einzelbanden‘ gefunden wurden.

Innerhalb der AFLP konnten für 13, innerhalb von SAMPL für 9 verschiedene Klone ‚Einzelbanden‘ gefunden werden. Folgende Klone zeigten jeweils eine ‚Einzelbande‘: *5 BB Kl 13-11 Gm* mit Primerkombination SAMPL 2 / E+AC, *SO 4 Kl SICA ANTAV* und *5 C Kl 6-22 Gm [2]* mit Primerkombination SAMPL 2 / E+AG, *5 BB Kl 137 WZ* und *5 C Kl 6-4-22*

Gm mit Primerkombination E 36+38 / G 24, 5 *BB Kl 13-44-3 Gm*, 5 *C Kl 6-4-22 Gm*, 5 *C Kl 10-49 Gm* und 5 *C Kl 6-13 Gm* mit Primerkombination E 36+38 / G 30.

Drei Klone wiesen innerhalb einzelner Primerkombinationen mehrere ‚Einzelbanden‘ auf. 5 *BB Kl 276 INRA* wies mit Primerkombination E 36+38 / G30 3 ‚Einzelbanden‘ auf. *SO 4 Kl 47-7 Gm* zeigte mit E 36+38 / G31 3 und mit SAMPL 1 / E+AC 2 ‚Einzelbanden‘. 5 *BB Kl 137 WZ* wies mit E 36+38 / G 24 2 ‚Einzelbanden‘. Die Unterlagssorte 5 *C Kl 10-48-49 Gm* wies mit SAMPL 1 / E+AG 4 ‚Einzelbanden‘ auf. Weiterhin zeigten 5 Klone mit unterschiedlichen Primerkombinationen je eine ‚Einzelbande‘. So traten bei *SO 4 Kl 47-7 Gm* mit SAMPL 1 / E+AC und E+AG sowie mit E 36+38 / G 31 ‚Einzelbanden‘ auf. 5 *BB Kl 13-45-5 Gm* wiesen mit SAMPL 2 / E+AG und E 36+38 / G 29 ‚Einzelbanden‘ auf. 5 *C Kl 6-16 Gm* zeigte mit E 36+38 / G 30 und E 36+38 / G 31 ‚Einzelbanden‘. Ein 5 *C Kl 6-22 Gm* [3] wies mit SAMPL 2 / E+AC und E 36+38 / G 24 ‚Einzelbanden‘ auf sowie 5 *C Kl 10-48-49 Gm* mit SAMPL 1 / E+AG, SAMPL 2 / E+AG, E 36+38 / G 30 und E 36+38 / G 31.

d) Wiederholende Banden

Zudem konnten ‚wiederholende polymorphe Banden‘ identifiziert werden. Dies sind Polymorphismen, die in mehr als einem Klon innerhalb einer Unterlagssorte auftreten. Für AFLP und SAMPL im Vergleich bedeutete dies, dass bei SAMPL diese Form der Banden mit 1,41 %, bei AFLP mit 1,1 % auftrat.

Dabei wiesen die Unterlagssorten 5 *C* und 5 *BB* für AFLP sowie auch für SAMPL diese Form des Polymorphismus auf. *SO 4* zeigte keine ‚wiederholende Banden‘ innerhalb der hier getesteten Klone.

e) Polymorphe, aber nicht zur Unterscheidung geeignete Banden

In der 6. Spalte, bezeichnet mit ‚polymorphe Banden, nicht zur Unterscheidung geeignet‘ wurden die Banden aufgeführt, die in mehr als einem Klon einer Unterlagssorte auftraten. Diese Banden führen somit nicht zur Identifikation einer Unterlagssorte. Aus diesem Grund konnten diese Banden nicht zur Unterscheidung von Unterlagssorten oder –klonen herangezogen werden und flossen demnach nicht in den Anteil der polymorphen Banden mit ein. Sie sollten aber ihre Verwendung innerhalb der Ähnlichkeitsanalyse finden. Hierbei wurden aufgrund der vorher bestimmten ‚01‘ Matrix die Ähnlichkeiten zwischen den Sorten und Klonen bestimmt. Innerhalb der AFLP-Analyse traten 1,81 % und bei der SAMPL-Analyse 5,3 % diesen Bandentypes auf.

3.5.2.2 Spezifische Banden der Unterlagssorten *SO 4*, *5 C* und *5 BB* und deren Klone

Ausgehend von den polymorphen Banden wurden 10 Banden ausgewählt und aus den Gelen ausgeschnitten. Es sollte die Sequenz der Banden ermittelt werden, um später möglicherweise spezifische Primer für die einzelnen Sorten oder Klone herstellen zu können. In Tabelle 37 sind die Banden mit ihrer Herkunft (Unterlagssorte, Primerkombination) dargestellt, die ausgeschnitten wurden.

Nummer	Unterlagssorte/ -klon	Primerkombination
1	<i>SO 4</i>	SAMPL 2 / E+AG
2	<i>5 BB Kl 13-45-5 Gm</i>	SAMPL 2 / E+AG
3	<i>5 C 10-48-49 Gm</i>	SAMPL 1 / E+AG
4	<i>5 BB</i> (tritt in allen <i>5 BB</i> auf, außer in <i>5 BB Kl 48 WE</i>)	SAMPL 1 / E+AG
5	<i>SO 4</i>	SAMPL 2 / E+AG
6	<i>5 C</i>	SAMPL 1 / E+AC
7	<i>5 C</i>	SAMPL 2 / E+AG
8	<i>SO 4 Kl SICA + ANTAV</i>	SAMPL 2 / E+AG
9	<i>5 BB</i>	SAMPL 1 / E+AC
10	<i>5 BB</i>	SAMPL 1 / E+AG

Tab. 37: Liste der aus dem Gel ausgeschnittenen Banden mit ihrer Herkunft aus Unterlagssorte bzw. Klon und den entsprechenden Primerkombinationen.

Es wurden zwei Formen von Banden ausgeschnitten: ‚unterlagssortenspezifische Banden‘ wie Banden 1, 5, 6, 7, 9 und 10, sowie ‚Einzelbanden‘ wie 2, 3, 4 und 8.

Bei der Auswahl der ausgeschnittenen Banden wurde darauf geachtet, dass Banden gewählt wurden, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen Banden lagen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Sequenz der Bande nicht durch sich überschneidende Banden kontaminiert war. Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich hinter einer Bande mehr als eine mögliche Sequenz verbarg.

In Abbildung 44 ist ein Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel mit Proben aus der SAMPL-Analyse dargestellt. Die roten Kästchen markieren beispielhaft drei der ausgeschnittenen Banden. Es handelt sich hierbei um die Banden 2, 5 und 8.

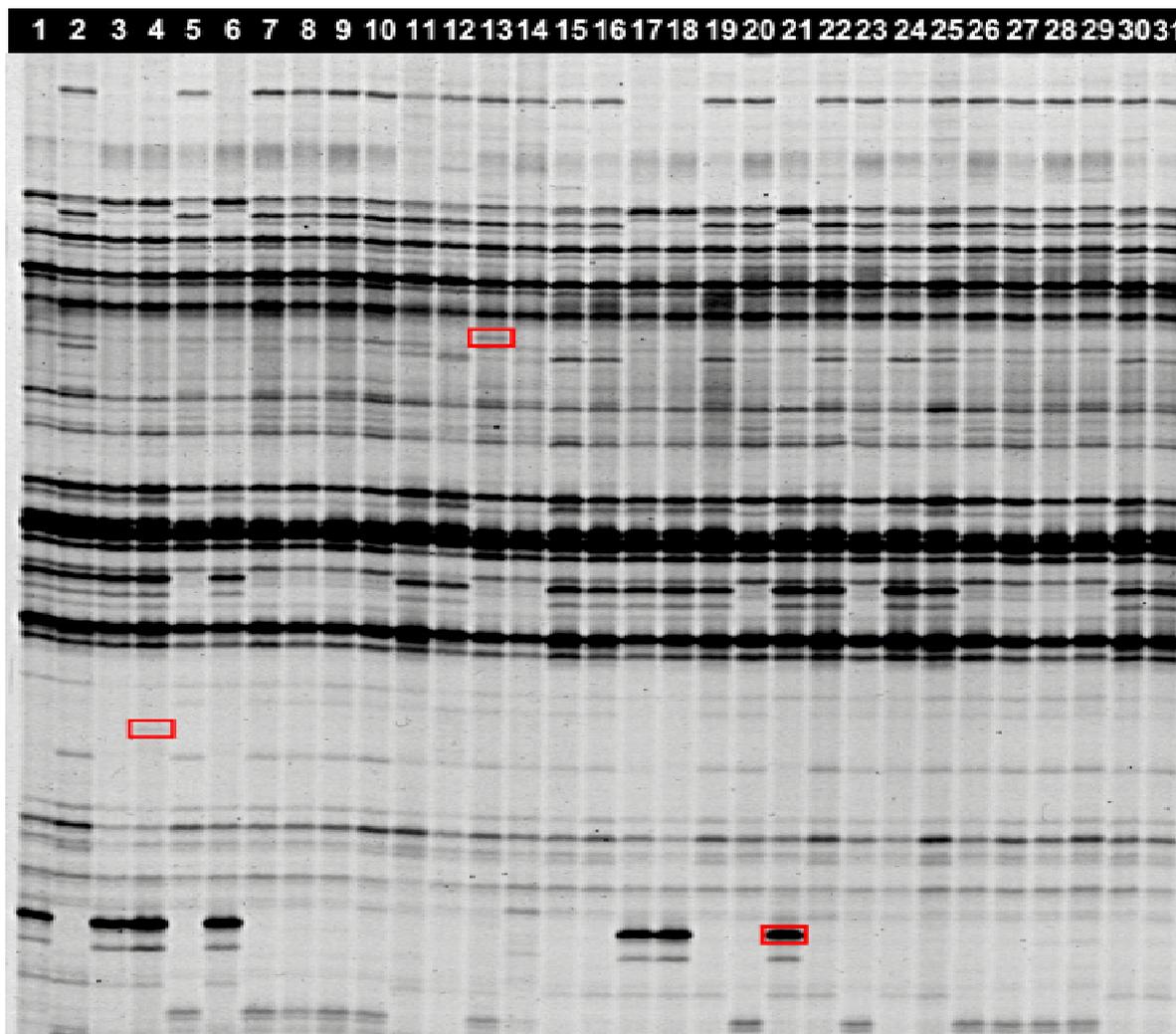


Abb. 44: Darstellung eines Ausschnittes eines Polyacrylamidgeles mit SAMPL-Proben. Die hier aufgetrennten Proben wurden mit der Primerkombination SAMPL 2 / E+AG vervielfältigt. Mit einem roten Kästchen wurden exemplarisch die Banden markiert, die im Folgenden ausgeschnitten wurden.

- | | | |
|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 1: SO 4 Kl 47-7 Gm | 11: 5 C Kl 6-4-22 Gm | 21: SO 4 Kl 60 Gm |
| 2: 5 C Kl 6-22 Gm [1] | 12: 5 C Kl 10-48-49 Gm | 22: 5 C Kl 10-49 Gm |
| 3: SO 4 Kl 94 INRA | 13: 5 BB Kl 13-45-5 Gm | 23: 5 BB Kl 13-15 Gm |
| 4: SO 4 Kl SICA+ANTAV | 14: 5 BB Kl 13-44-3 Gm | 24: 5 C Kl 6-52 Gm |
| 5: 5 BB Kl 13-5 Gm | 15: 5 C Kl 6-22 Gm [2] | 25: 5 C Kl 6-13 Gm |
| 6: Binova | 16: 5 C Kl 6-16 Gm | 26: 5 BB Kl 13-5 Gm |
| 7: 5 BB Kl 137 WZ | 17: SO 4 Kl 2 Gm | 27: 5 BB Kl 13-3 Gm |
| 8: 5 BB Kl 48 WE | 18: SO 4 Kl 47 Gm | 28: 5 BB Kl 13-21 Gm |
| 9: 5 BB Kl 276 INRA | 19: 5 C Kl 6-53 Gm | 29: 5 BB Kl 13-11 Gm |
| 10: 5 BB Kl ANTAV | 20: 5 BB Kl 13-13 Gm | 30: 5 C Kl 6-22 Gm [3] |
| | | 31: 5 C Kl 6-22 Gm [4] |

Die ausgeschnittenen Banden waren ‚unterlagssortenspezifische Banden‘ und ‚Einzelbanden‘.

3.5.2.3 Diversität der Unterlagssorten *SO 4*, *5 C* und *5 BB* und deren Klone sowie der Sorte *Binova* unter Berücksichtigung der Werte der AFLP- und SAMPL-Analysen

Die von der AFLP- und SAMPL-Methoden erhaltenen Informationen über die Unterlagssorten *SO 4*, *5 C* und *5 BB* und deren Klone, sowie der Unterlagssorte *Binova* wurden in Dendrogrammen, basierend auf den kalkulierten Werten nach DICE (SNEATH und SOKAL 1973), nach UPGMA dargestellt.

Die Dendrogramme sind nach Methoden getrennt aufgeführt. Es wurden alle polymorphen Banden berücksichtigt. Für AFLP ergab sich aus diesen Werten das in Abbildung 45 dargestellte Dendrogramm.

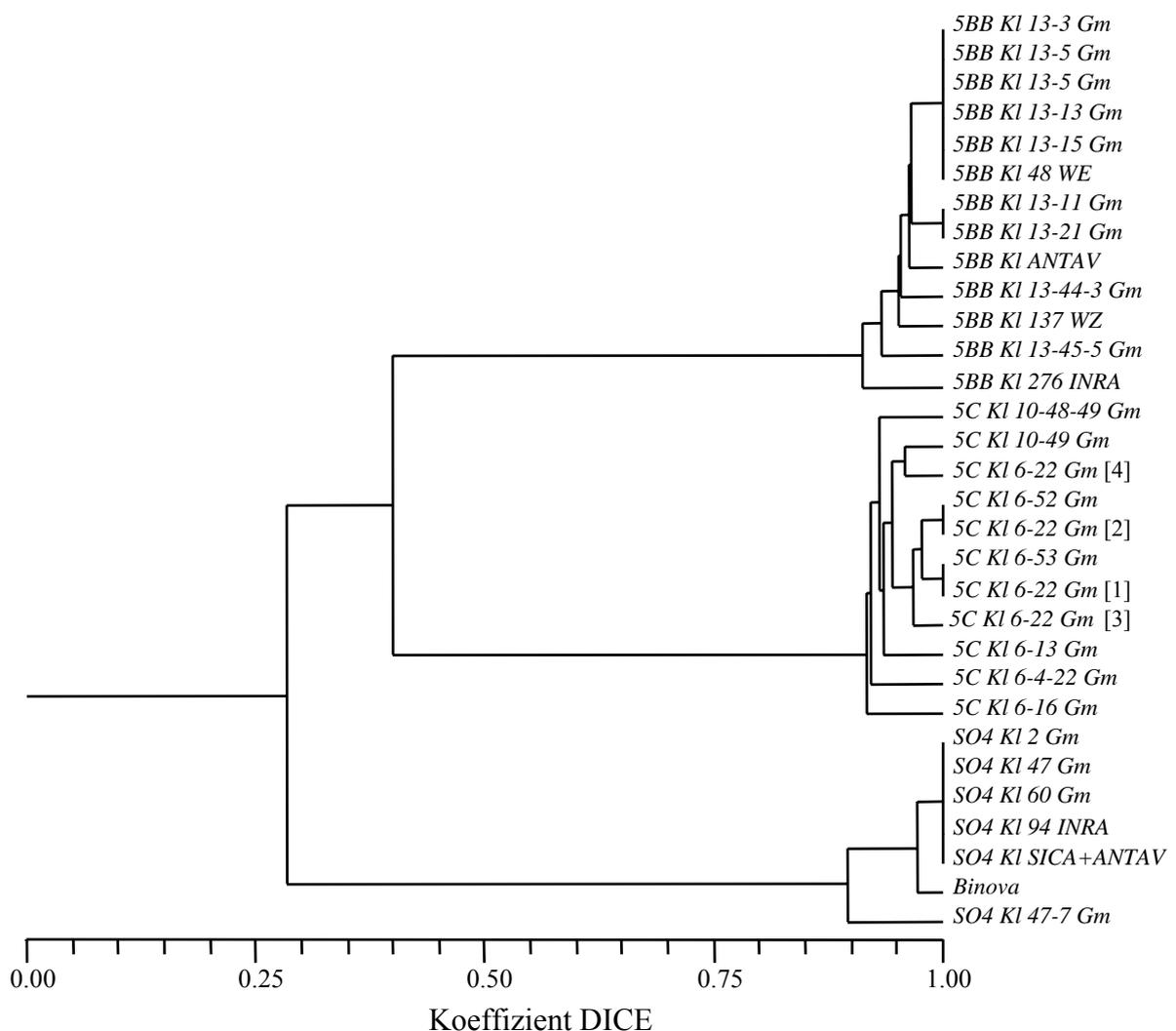


Abb. 45: Dendrogramm der Unterlagssorten *SO 4*, *5 C*, *5 BB*, ihrer Klone sowie der Unterlagssorte *Binova* mit den Werten der AFLP-Analyse. Das Dendrogramm wurde, basierend auf den kalkulierten Werten nach DICE, nach UPGMA erstellt.

Aufgrund der Daten, die durch die vier AFLP-Primerkombinationen erhalten wurden, ließen sich drei, den Sorten entsprechende Cluster erkennen. Dabei betragen die Ähnlichkeitsindices zwischen den einzelnen Sorten für 5 *BB* zu 5 *C* einen Wert von 0,37, von 5 *BB* zu *SO 4* einen Wert von 0,32 und von *SO 4* zu 5 *C* einen Wert von 0,23. Zwischen den Unterlagenklonen innerhalb einer Sorte betragen die Werte der Ähnlichkeitsindices für 5 *BB* 0,94, für 5 *C* 0,95 und für *SO 4* 0,95.

Binova zeigte für 5 *BB* einen Ähnlichkeitsindex von 0,32, zu 5 *C* einen Wert von 0,29 und zu *SO 4* einen Wert von 0,93.

Für die SAMPL-Analyse ergibt sich aus den durch die 4 Primerkombinationen ermittelten und durch DICE kalkulierten Werten ein nach UPGMA dargestelltes Dendrogramm (siehe Abbildung 46).

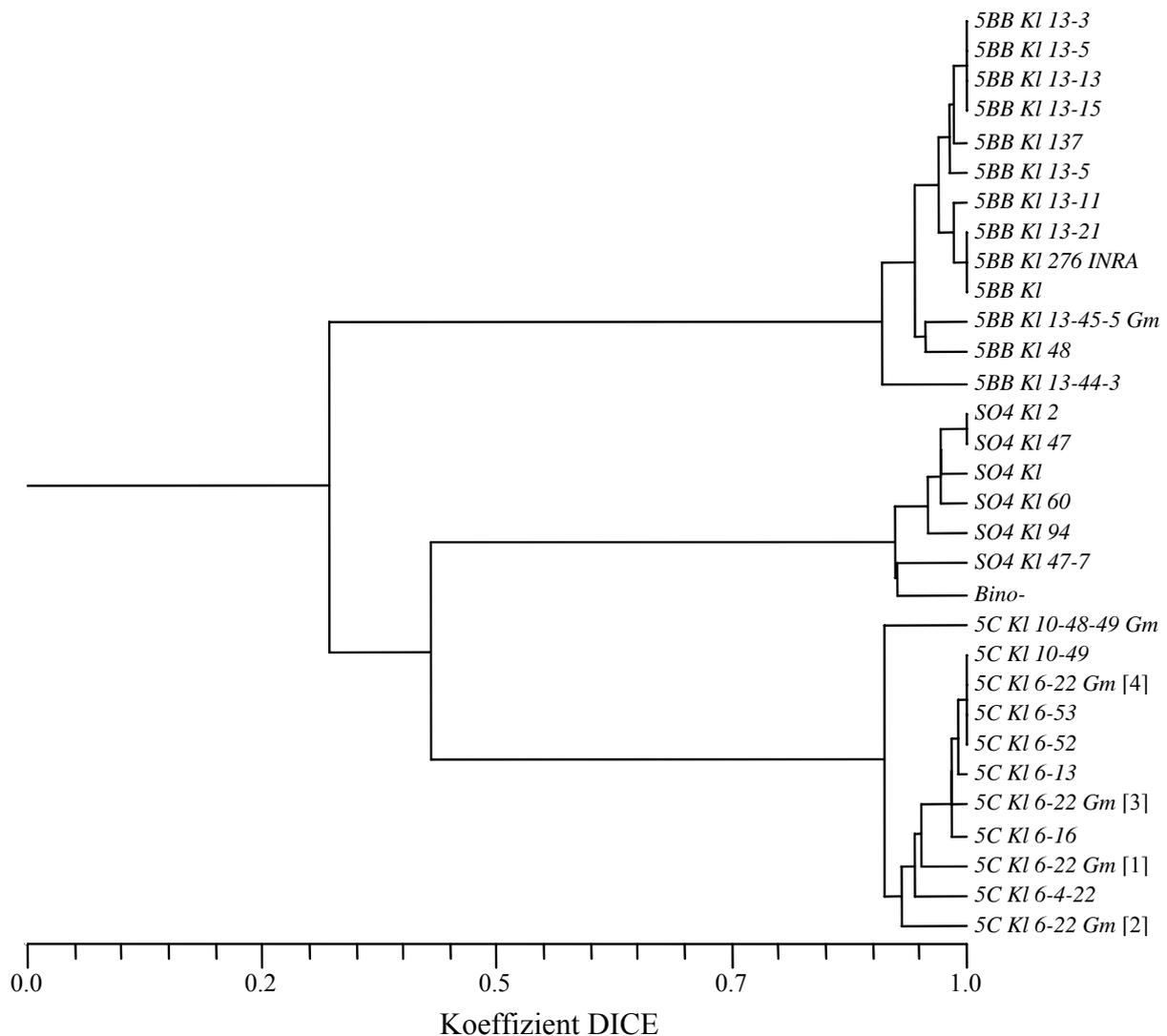


Abb. 46: Dendrogramm der Unterlagssorten *SO 4*, 5 *C*, 5 *BB*, ihrer Klone sowie der Unterlagssorte *Binova* mit den Werten der SAMPL-Analyse. Das Dendrogramm wurde, basierend auf den kalkulierten Werten nach DICE, nach UPGMA erstellt.

Auch in der SAMPL-Analyse fanden sich die drei Cluster von 5 *BB*, 5 *C* sowie *SO 4* mit *Binova* wieder. Die Ähnlichkeitsindices zeigten innerhalb einer Unterlagssorte zwischen den verschiedenen Klonen keine Unterschiede zu den Ähnlichkeitsindices, die durch die AFLP-Analyse erhalten wurden. Die Werte zwischen den Unterlagssorten waren etwas abgeändert. So zeigte etwa 5 *BB* mit 5 *C* einen Wert von 0,39, 5 *BB* zu *SO 4* 0,2 und 5 *C* zu *SO 4* einen Wert von 0,44. *Binova* wies zu 5 *BB* einen Ähnlichkeitsindex von 0,26 auf, zu 5 *C* einen Wert von 0,47. So war bei der SAMPL-Analyse im Vergleich zur AFLP-Analyse der Abstand zwischen *SO 4* und *Binova* zu 5 *BB* größer, während er zur 5 *C* kleiner war und zu 5 *BB* gleich blieb.

Es war auffällig, dass der Klon 5 *BB Kl 13-5 Gm*, der mit zwei Pflanzen vertreten war, Unterschiede zwischen den Pflanzen aufwies. Dieser Unterschied war allerdings in einer einzigen Bande begründet, die bei allen anderen 5 *BB* Klonen auftrat, nur nicht in dieser Pflanze. Dazu kam, dass es sich bei dieser Bande um eine nicht zur Unterscheidung geeignete Bande handelte. Es wurde ein neues Dendrogramm erstellt, diesmal ohne die zusätzlichen ‚polymorphen, nicht zur Unterscheidung geeigneten Banden‘ (siehe Abbildung 47).

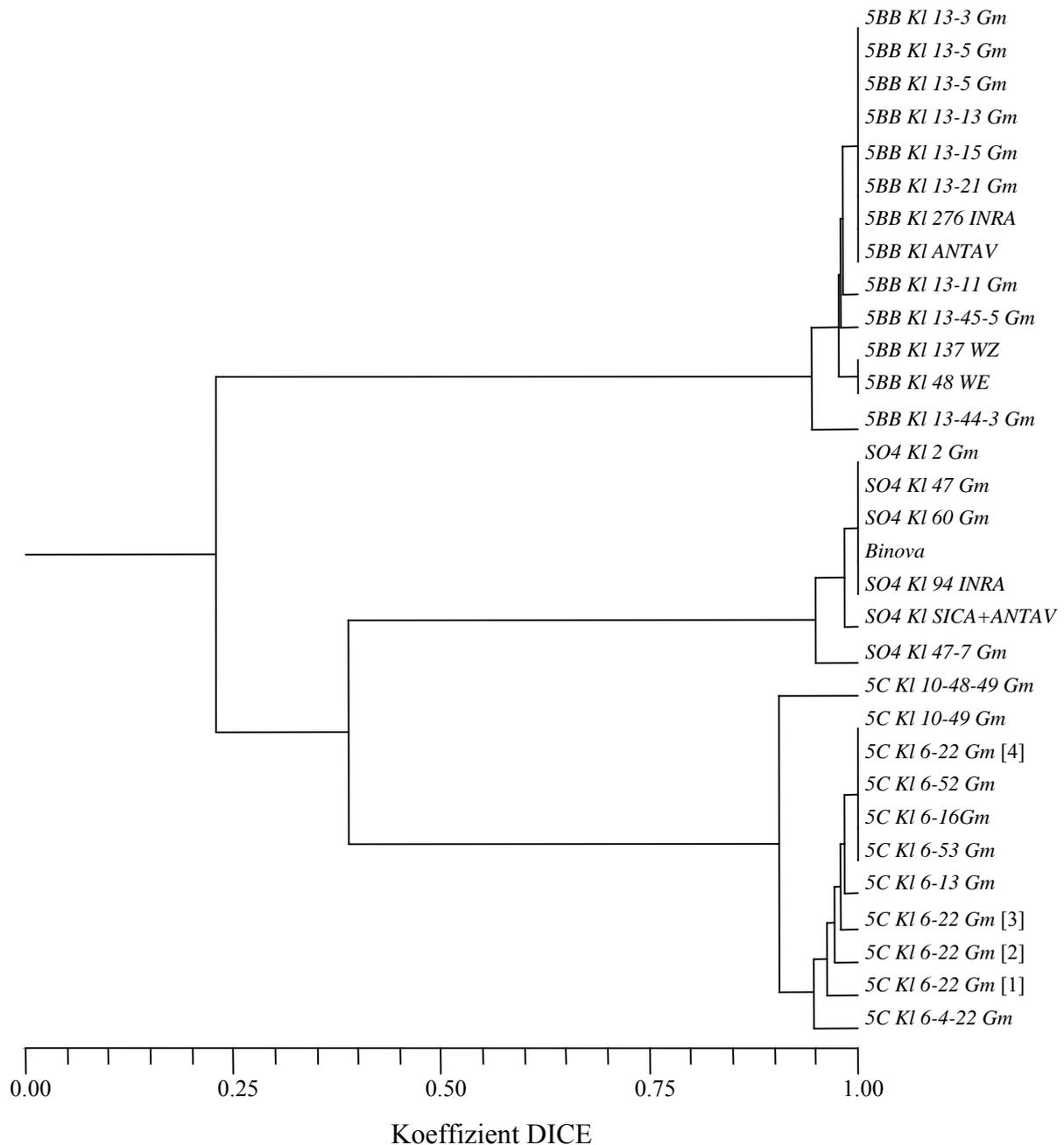


Abb. 47: Dendrogramm der Unterlagssorten *SO 4*, *5 C*, *5 BB*, ihrer Klone sowie der Unterlagssorte *Binova* mit den Werten der SAMPL-Analyse, ohne die ‚polymorphen, nicht zur Unterscheidung geeigneten Banden‘. Das Dendrogramm wurde, basierend auf den kalkulierten Werten nach DICE, nach UPGMA erstellt.

Die Clusterbildung trat noch intensiver hervor. So wiesen nun *5 BB* gegenüber von *5 C* einen Ähnlichkeitsindex von 0,26 auf, *5 BB* zu *SO 4* einen Wert von 0,17 sowie *SO 4* zu *5 C* einen Wert von 0,39. Die Ähnlichkeitsindizes von *Binova* zu den übrigen Unterlagssorten unterschied sich nicht signifikant von den Werten, die *SO 4* zu *5 C* und *5 BB* aufwies.

Das Dendrogramm der AFLP-Analyse, welches aufgrund dieser Feststellung nochmals ohne die ‚polymorphen, nicht zur Unterscheidung geeigneten Banden‘ erstellt wurde, zeigte keine signifikante Änderung. Innerhalb der AFLP trat nur ein geringer Prozentsatz von 1,81 % an diesen Banden auf, im Gegensatz zu SAMPL, wo der Prozentsatz bei 5,3 % lag. Die Werte beider Methoden wurden zusammen in einem Dendrogramm verarbeitet (siehe Abbildung 48).

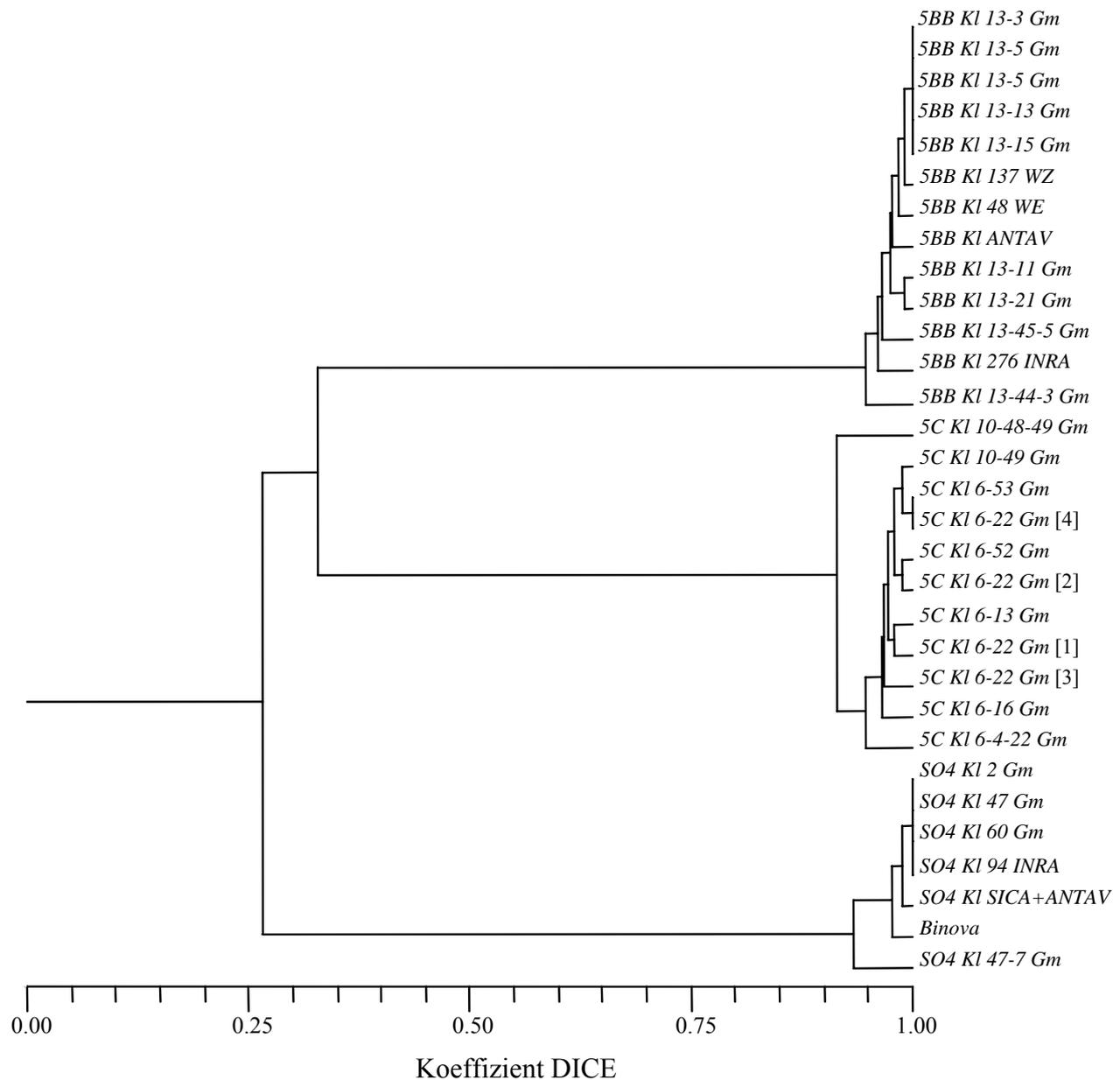


Abb. 48: Dendrogramm der Unterlagssorten *SO 4*, *5 C*, *5 BB*, ihrer Klone sowie der Unterlagssorte *Binova* mit den Werten der AFLP- und der SAMPL-Analyse. Das Dendrogramm wurde, basierend auf den kalkulierten Werten nach DICE, nach UPGMA erstellt. Die ‚polymorphen, nicht zur Unterscheidung geeigneten Banden‘ wurden ausgeschlossen.

In dieser Ähnlichkeitsanalyse zeigte sich ebenfalls die Clusterbildung der drei Sorten. Der Ähnlichkeitsindex der Unterlagssorten zueinander verschob sich geringfügig. Demnach zeigte 5 *BB* zu 5 *C* einen Wert von 0,32, 5 *BB* zu *SO 4* einen Wert von 0,24 und 5 *C* zu *SO 4* einen Wert von 0,34. Innerhalb der Unterlagenklone betragen die Ähnlichkeitsindices für 5 *BB* 0,96, für 5 *C* 0,94 und für *SO 4* 0,96. Die Werte, die für *Binova* errechnet wurden, in Bezug auf die anderen Unterlagssorten unterschieden sich nicht signifikant von den Werten, die für *SO 4* ermittelt wurden. Dies bestätigte die Clusterbildung und die Vermutung, dass *Binova* eine mutierte Variante der *SO 4* ist.

Im Laufe der Untersuchungen zur Klonunterscheidung, sowohl mit der RAPD-Analyse wie auch mit der AFLP- oder SAMPL-Methode, fiel die hohe Varianz der 5 *C* Stöcke auf. 5 *C Kl 6-22 Gm* war mit 4 Stöcken an den Untersuchungen beteiligt. Aus diesem Grund wurden 5 5 *C* Einzelstöcke, Nachkommen einer einzigen Pflanze, auf ihre genetische Varianz hin überprüft.

3.6 Betrachtung der 5 *C* Einzelstöcke

Während der Untersuchungen zur Unterscheidung von Unterlagenklonen fiel auf, dass innerhalb der Sorte 5 *C* die Unterlagenklone 5 *C Kl 6-22 Gm* eine große Varianz aufwiesen. Es wurden 5 Einzelstöcke des Klones 5 *C Kl 6-22 Gm* untersucht (Tabelle 38).

Unterlage	Stock	Standort
5 <i>C Kl 6-22</i>	9, Ausgangsstock	N-1-17
5 <i>C Kl 6-22-9</i>	1	N-1-55
5 <i>C Kl 6-22-9</i>	2	N-1-55
5 <i>C Kl 6-22-9</i>	3	N-1-55
5 <i>C Kl 6-22-9</i>	4	N-1-55
5 <i>C Kl 6-22-9</i>	5	N-1-55

Tab. 38: Standorte der 5 *C* Einzelstöcke.

Es wurden von einer einzigen Mutterpflanze, Stock 9 des Klons 5 *C Kl 6-22 Gm*, 5 Stecklinge geschnitten, bewurzelt und gepflanzt. Von diesen Stöcken und dem dazugehörigen

Mutterstock wurden Proben entnommen und mit 4 AFLP- und 4 SAMPL-Primerkombinationen (siehe 2.2.6.6 und 2.2.7) untersucht.

Dabei wurden zwei Typen von Polymorphismen gefunden:

- ‚Einzelbanden‘
- ‚Wiederholende Banden‘

AFLP zeigte 5 und SAMPL 10 ‚Einzelbanden‘. Folgende Stöcke wiesen Banden mit folgenden Primerkombinationen auf:

AFLP: - Stock 1	E 36+38 / G 31
- Stock 4	E 36+38 / G 31
- Stock 5	E 36+38 / G 29
- Mutterpflanze	E 36+38 / G 30

SAMPL: - Stock 1	SAMPL 2 / E+AC
- Stock 2	SAMPL 1 / E+AC
- Stock 4	SAMPL 1 / E+AG, SAMPL 2 / E+AC, SAMPL 2 / E+AG
- Stock 5	SAMPL 1 / E+AG, SAMPL 2 / E+AG

‚Wiederholende Banden‘ traten ebenfalls bei AFLP wie auch bei SAMPL auf. Allerdings war diese Form des Polymorphismus bei AFLP (2 Banden) nur bei einer Primerkombination vertreten (E 36+38 / G 30). Bei SAMPL hingegen traten bei allen vier Primerkombinationen ‚wiederholende Banden‘ auf (insgesamt 10 Banden).

Tabelle 39 zeigte die Ähnlichkeitsindices, basierend auf den Werten, die von den acht Primerkombinationen erhalten wurden, errechnet nach DICE.

	<i>5C Kl 6-22</i> <i>Gm</i> Ausgangsstock					
<i>5C Kl 6-22</i> <i>Gm</i> Ausgangsstock	1	<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 3				
<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 3	0,98	1	<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 4			
<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 4	0,87	0,88	1	<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 1		
<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 1	0,87	0,88	0,94	1	<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 5	
<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 5	0,95	0,97	0,86	0,85	1	<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 2
<i>5C Kl 6-22-9</i> <i>Gm</i> St. 2	0,97	0,99	0,88	0,87	0,97	1

Tab. 39: Ähnlichkeitsindices der 5 5 C Einzelstöcke und deren Mutterpflanze, basierend auf den Werten, die von den acht Primerkombinationen erhalten wurden, errechnet nach DICE.

Resultierend aus diesen Werten ergab sich folgendes Dendrogramm, dargestellt in Abbildung 49.

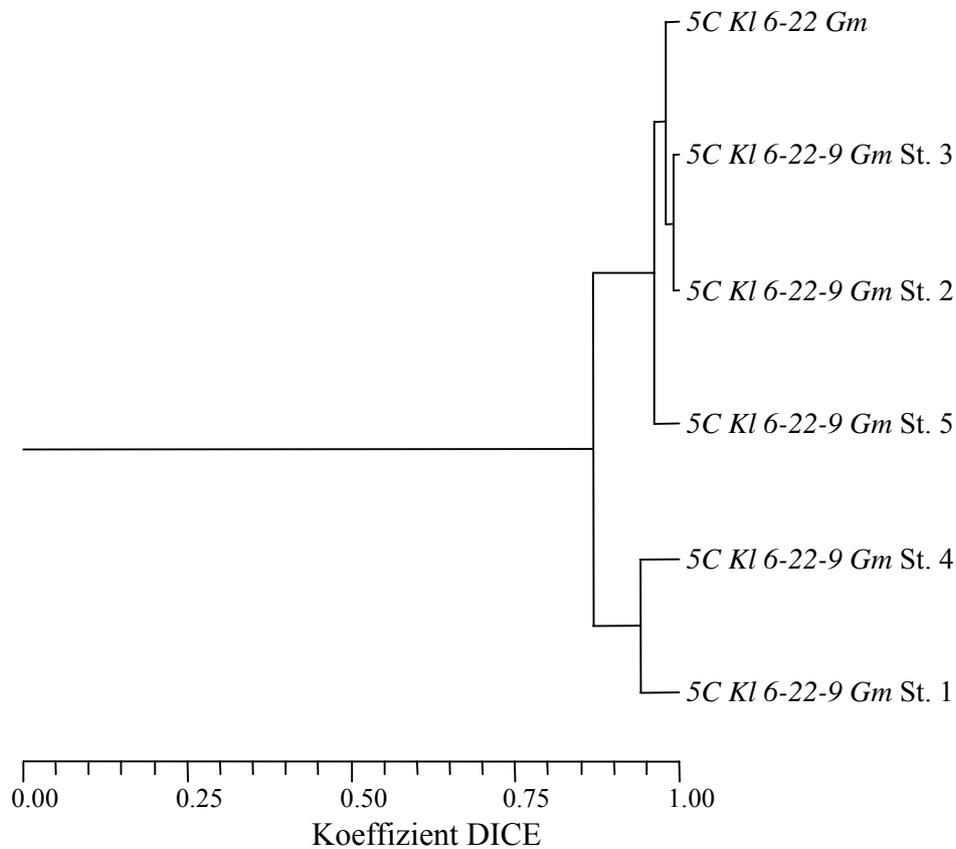


Abb. 49: Dendrogramm der 5 C Einzelstöcke mit den Werten der AFLP- und der SAMPL-Analyse. Das Dendrogramm wurde, basierend auf den kalkulierten Werten nach DICE, nach UPGMA erstellt.

Die Ähnlichkeitsindices erstreckten sich von 0,85 bis 0,99. Die Stöcke 4 und 1 hingegen waren mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,87 am weitesten von dem Originalstock entfernt. In Abbildung 50 wurde das Auftreten der Banden der 5 C Einzelstöcke exemplarisch dargestellt. Die Banden sind mit Pfeilen markiert.

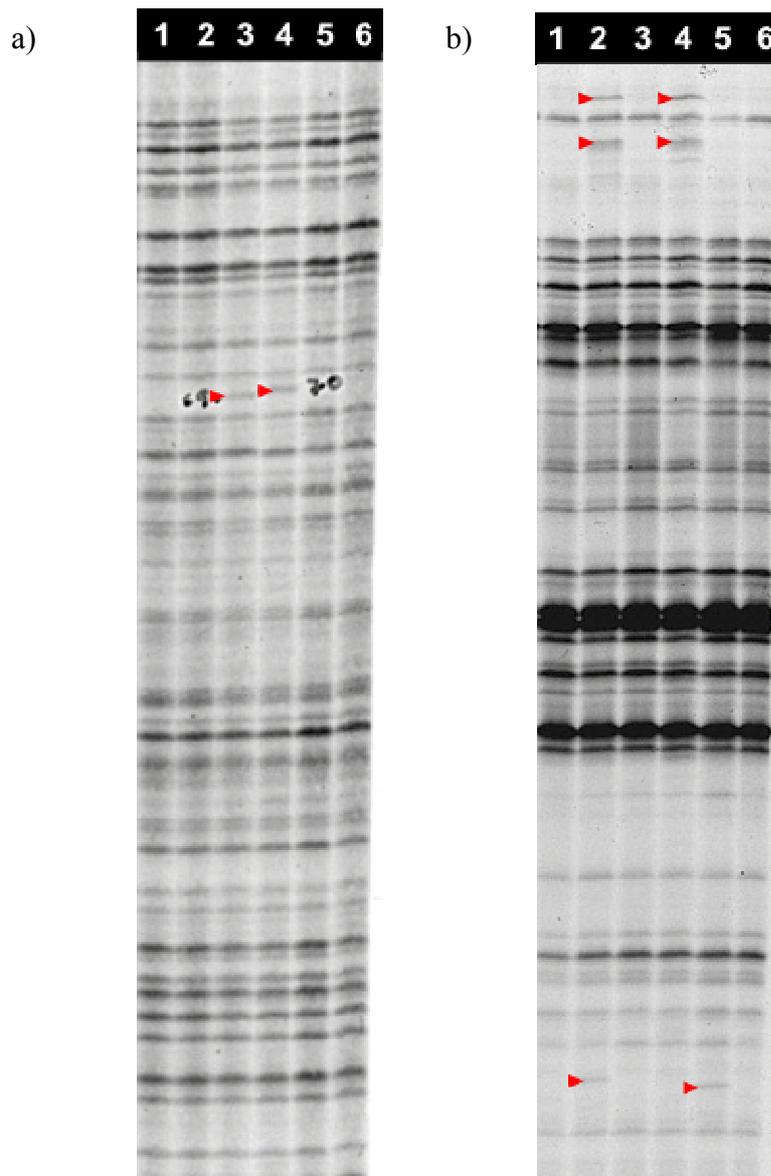


Abb. 50: Darstellung der 5 C Einzelstöcke zusammen mit ihrem Ausgangsstock.

Die hier gezeigten Proben wurden mit den Primerkombinationen

a) E 36+38 / G 30

b) SAMPL 2 / E+AG

amplifiziert und in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Pfeile markieren die bei den 5 C Einzelstöcken auftretenden Banden.

1: 5 C Kl 6-22 Gm, Ausgangsstock

2: 5 C Kl 6-22-9 Gm St. 3

3: 5 C Kl 6-22-9 Gm St. 4

4: 5 C Kl 6-22-9 Gm St. 1

5: 5 C Kl 6-22-9 Gm St. 5

6: 5 C Kl 6-22-9 Gm St. 2

4. Diskussion

Aufgrund jahrzehntelanger Züchtungsarbeit können für die jeweiligen Anforderungen des Weinbaus spezifische Unterlagssorten produziert werden. Somit tragen Unterlagsreben nicht unerheblich zur erfolgreichen Nutzung eines Weinberges bei. Es ist daher wichtig, dass die Möglichkeit einer Sortenidentifizierung von Unterlagen zu jedem Entwicklungs- und Verarbeitungsstadium gegeben ist.

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Sortentrennung von Unterlagsreben sowie erste Untersuchungen zur genetischen Varianz von Unterlagenklonen. Weiterhin sollten die Möglichkeiten der Sortendifferenzierung in einem Unterlagenbündel und die Sortenerkennung in einem schon bestehenden Weinberg anhand des Wurzelmaterials untersucht werden.

4.1 Die Extraktion von DNA aus Holz und Wurzeln von Freilandreben

Die Form des Aufschlusses von Holz in einem Flachbetthomogenisator und die anschließende DNA-Extraktion wurde bereits in WOLF (1996), modifiziert nach LODHI et al. (1994), dargestellt. Durch das Zerreiben des Pflanzenmaterials in Anwesenheit von CTAB-Extraktionspuffer und PVPP bei Raumtemperatur im Flachbetthomogenisator war es möglich, eine Anzahl von 50-60 Proben an einem Tag pro Person aufzuarbeiten, ohne dass dabei ein Verlust an DNA Qualität hinzunehmen gewesen wäre. Das zugegebene PVPP und CTAB binden die während des Aufschlusses der Zellen freigesetzten Polyphenole und Polysaccharide (HARDING und ROUBELAKIS-ANGELAKIS 1994, LODHI et al. 1994). Während der Fällung der DNA mit Ethanol wurde NaCl zugesetzt, damit die Polysaccharide in Lösung blieben. Speziell bei Holz, welches während der Holzausreife geschnitten wird, ist dies wichtig, da ansonsten die Qualität der DNA aufgrund der Polysaccharide verringert sein kann (LIN und WALKER 1997).

Holz- und Blattmaterial konnten auf die gleiche Art und Weise aufgeschlossen werden. Im Vergleich zu den überirdischen Pflanzenteilen ist Wurzelmaterial durch den die Wurzel umgebenden Boden einem größeren Kontaminationsdruck ausgesetzt. Dies stellte höhere Anforderungen an die Gewinnung von nicht mit Fremd-DNA kontaminierter DNA (BOBOWSKI et al. 1999). Aus diesem Grund wurde zunächst die Wurzeloberfläche mit Calcium-Hypochlorid desinfiziert und dann die Rinde mit einem Skalpell entfernt. Da-

durch sollten Kontaminationen in erster Linie durch die bei Freilandreben häufig vorkommende, sogenannte vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza (VA-Mykorrhiza) vorgebeugt werden. Der Wurzelpilz VA-Mykorrhiza lebt in der Wurzelrinde der Weinrebe und wächst in einem lockeren Verband von Hyphen in der näheren und weiteren Umgebung der Wurzel (MOHR 1993). Der Pilz erleichtert die Aufnahme von Mineralstoffen durch die Pflanze, insbesondere von Phosphat (KARAGIANNIDIS et al. 1997), aber auch von Kupfer und Zink (PETGEN et al. 1998); im Wechsel erhält er die für seinen Stoffwechsel benötigten Kohlenhydrate.

AUTIO et al. (1998) verglichen Blatt- und Wurzelproben mit dem Ziel, Apfelsorten anhand ihrer Blatt- und Wurzelproben durch die RAPD-Analyse zu identifizieren. Dabei stießen sie auf Probleme bezüglich der Reinheit der einzelnen Wurzelproben. Da diese Gruppe mit flüssigem Stickstoff zum Aufschluss ihres Pflanzengewebes arbeitete, war es für sie problematisch, im gefrorenen Zustand unerwünschte Rindenteile zu entfernen. Aus diesem Grund verwendeten sie später ausschließlich frische Wurzelteile. Sie gingen davon aus, dass Kontaminationen unter 10 % Fremd-DNA nicht in der RAPD-PCR detektierbar waren.

Die in dieser Arbeit verwendete Aufschlussmethode im Flachbetthomogenisator bei Raumtemperatur erwies sich als sehr praktikabel, da die Wurzel vorher entsprechend behandelt und gesäubert werden konnte. Dadurch war es möglich, die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination zu reduzieren. Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche zwischen Holz und Wurzelgewebe, sowie verschiedener Wurzeltypen untereinander zeigten, dass die in der RAPD mit Primer #751 erhaltenen Bandenmuster der untersuchten Pflanzengewebe gleich waren. Dies konnte ebenfalls durch AUTIO et al. (1998) bestätigt werden, welche Blattmaterial mit Wurzelmaterial und unterschiedliche Wurzelteile untereinander verglichen und ebenfalls keine Unterschiede fanden. CHEN et al. (1997) zeigten dagegen, dass es aber, nach intensiver Abklärung der Laborverhältnisse, auch möglich war, reproduzierbare Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzengeweben zu detektieren. So untersuchte diese Gruppe die genetische Varianz zwischen Blatt- und Wurzelgewebe der Sojabohne. Sie fanden in diesem Zusammenhang RAPD-Primer, die eine organspezifische Amplifikation in Form von qualitativen (Intensitätsunterschiede) und quantitativen (anwesend/abwesend) Banden zuließen.

4.2 Holzvermischungen in Unterlagenbündeln

Vor dem Hintergrund der Problematik der Vermischungen von Unterlagenholz in Bündeln (siehe auch 1.3.1) wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht eine Möglichkeit zu finden,

- a) aus einer repräsentativen Mischprobe von einer entsprechenden Menge an Holz DNA zu extrahieren und
- b) prozentual geringe Verunreinigungen mit Hilfe der RAPD-Analyse zu detektieren.

Es wurden zwei Bereiche untersucht:

- a) Zunächst wurden DNA-Proben zweier Unterlagssorten, *SO 4* und *5 C*, miteinander gemischt. Es wurde geprüft, bis zu welchem Prozentsatz Fremd-DNA in einer Probe durch die RAPD-Analyse nachweisbar war.
- b) Das Holz dieser zwei Unterlagssorten wurde in bestimmten Verhältnissen gemischt (siehe 3.2.2.3), Proben entnommen und die DNA extrahiert. Innerhalb der RAPD-Analyse wurde die so gewonnene DNA mit Primer #751 amplifiziert.

Aufgrund des großen Probenvolumens erfolgte der Aufschluss des Gewebes in einem Blender. Die extrahierte DNA war für eine RAPD-Analyse geeignet. Es konnten Verunreinigungen im Falle der Vermischung der DNA bis zu 6,25 % nachgewiesen werden. Bei einer Vermischung von Holz lag die Nachweisbarkeitsgrenze bei 10 %. In der Literatur werden 10 % als detektierbare Nachweisgrenze für Kontaminationen innerhalb der RAPD-PCR angegeben (JIANHUA et al. 1996, AUTIO et al. 1998). Dies würde den hier erhaltenen Ergebnissen entsprechen. Allerdings sind 10 % bei einer Vermischung innerhalb eines Unterlagenbündels von 200 Holzstücken zu hoch.

Die AFLP-Analyse ist sensitiver in Bezug auf kleinste Variationen innerhalb des Genoms. Allerdings ist die AFLP-Analyse aufgrund ihres Arbeitsablaufes im Vergleich zur RAPD-Analyse anfälliger gegenüber der DNA-Qualität. Werden verschiedene DNA-Proben gemischt, so wird sich die Restriktion nach der qualitativ höheren DNA ausrichten. Dies hat zur Folge, dass nur DNA-Fragmente entstehen und in der Präamplifikation vermehrt werden, die der qualitativ besseren DNA entsprechen (CERVERA pers. Mitteilungen). Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die DNA erst nach der Präamplifikation zu vermischen, damit alle DNA-Fragmente gleichmäßig vervielfältigt werden.

Zielsetzung war aber, innerhalb einer Mischprobe einen repräsentativen Querschnitt an Hölzern zu testen, keine Einzelstöcke. Die AFLP-Analyse ist für diesen Verwendungszweck zu sensitiv.

4.3 PCR-gestützte Methoden zur Untersuchung von genetischen Unterschieden von Pflanzensorten

DNA-basierende Marker besitzen mehrere Vorteile gegenüber Isoenzymen und anderen biochemischen Methoden zur Untersuchung von genetischen Unterschieden.

Die DNA-Sequenz ist unabhängig von Umweltbedingungen oder Bearbeitungspraktiken. Die Anwesenheit der gleichen DNA-Sequenz in jeder lebenden Zelle einer Pflanze erlaubt Untersuchungen an jedem verfügbaren Pflanzengewebe und in jedem Entwicklungsstadium der Pflanze. Der Einsatz der Polymerasekettenreaktion hat neue Methoden entstehen lassen, die relativ einfach und schnell durchzuführen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden PCR-gestützten Methoden gearbeitet: die RAPD-, AFLP- und SAMPL-Methoden.

Innerhalb der Literatur wurden die RAPD- und AFLP-Methoden bezüglich ihrer Tauglichkeit zur Analyse des Genoms unterschiedlichster Pflanzenarten im Vergleich zu anderen Marker-Systemen, wie Isoenzymen, RFLP und SSR untersucht (LIU und FURNIER 1993, THORMANN et al. 1994, POWELL et al. 1996, MILBOURNE et al. 1997, SUN et al. 1999). In den Studien von POWELL und MILBOURNE wurden als Messgrößen der Informationsgehalt des jeweiligen Marker-Systems ausgewertet und die Anzahl der pro Experiment gleichzeitig analysierten Loci festgelegt. Der Marker-Index ist ein Produkt aus beiden ermittelten Messgrößen für den jeweiligen polymorphen Marker. SSR-Marker hatten in diesen Studien den höchsten Informationsgehalt und AFLP-Marker die größte Anzahl an gleichzeitig pro Experiment analysierten Loci. RAPD-Marker lagen mit dem für diese Methode ermittelten Marker-Index zwischen SSR und AFLP. Die RAPD- und die AFLP-Analyse zeigten anhand von verschiedenen statistischen Vergleichsmodellen die größte Korrelation zueinander. Hierfür führten MILBOURNE et al. (1997) verschiedene Erklärungen an. Zum einen sind beides dominante Marker-Systeme. Dies könnte zu einer Über- oder Untergewichtung des Ähnlichkeitsindex führen, da nicht zwischen homo- und heterozygot unterschieden werden kann. Zum anderen betreffen RAPD- und AFLP-Marker das gesamte Genom, während SSR-Marker einen speziellen Teil ansprechen. Daraus ergibt sich, dass die RAPD- wie auch die AFLP-Analyse Variationen im Genom wie Insertion und Deletion detektieren. POWELL et al. (1996) sprachen in diesem Zusammenhang zusätzlich das Problem an, dass im Falle der RAPD, verglichen mit AFLP, besondere Vorsicht geboten wäre, da unter weniger stringenten Bedingungen eine Fehlbindung zwischen Primer und DNA-Matrix auftreten könne. Für die AFLP-Analyse ist diese Fehlerquelle

geringer, da der ersten Amplifikation ein Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme vorausgeht. Des Weiteren laufen beide Amplifikationen mit spezifischeren Primern und unter erheblich höheren Annealing-Temperaturen ab. Dies hat zur Folge, dass von vorneherein eine exakte Bindung des Primer an das DNA-Fragment vorausgesetzt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die RAPD-Methode die routinemäßige Trennung von Unterlagssorten ermöglichen. Die AFLP-Analyse und die aus ihr hervorgegangene SAMPL-Analyse sollten aufgrund ihrer Sensitivität zur Untersuchung von genetischen Varianzen genutzt werden.

4.3.1 Die Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse

Die RAPD-Analyse, 1990 von zwei unabhängigen Labors entwickelt (WELSH und McCLELLAND 1990, WILLIAMS et al. 1990), arbeitet meistens mit Dekamer-Primern, die synthetisch hergestellt werden und nicht für ein bestimmtes Genom oder einen Genomabschnitt spezifisch sind (WELSH und McCLELLAND 1991, WILLIAMS et al. 1993). RAPD-Marker sind vielseitig einsetzbar. Speziell im Bereich von Kulturpflanzen finden sie Verwendung in der Differenzierung von Genotypen (GERLACH und STÖSSER 1997, LING et al. 1997, DUARTE et al. 1999, SHIMADA et al. 1999), zur Untersuchung von Abstammungen (HURME und SAVOLAINEN 1999, JOYCE et al. 1999, NKONGOLO 1999), zur Erstellung von genetischen Karten (CARLSON et al. 1991) und zur Entwicklung von Markern zur Detektion von Genen (DEVOS und GALE 1992, STRIEM et al. 1994, POULSEN et al. 1995, CORRÊA et al. 2000). Für diese Fragestellungen wurde sie oftmals mit anderen Marker-Systemen, wie Isoenzymen (JENCZEWSKI et al. 1999), RFLP (BANERJEE et al. 1999), Mikrosatelliten (HICKS et al. 1998), sowie RFLP und AFLP (SPADA et al. 1998, LÜBBERSTEDT et al. 2000) kombiniert eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RAPD-Analyse zur Differenzierung von alten Genotypen und daraus hervorgegangenen, gezüchteten und selektierten, sowie kommerziell genutzten Unterlagssorten verwendet. In der Literatur wurde die RAPD-Methode vorrangig zur Sortendifferenzierung von *Vitis vinifera* (COLLINS und SYMONS 1993, VIDAL et al. 1998) eingesetzt. QU et al. (1996) untersuchten die genetische Diversität von 16 Muskadinien und amerikanischen Ertragsrebsorten. Dabei stellte sich heraus, dass innerhalb der Muskadinien eine geringe, zwischen den 8 untersuchten amerikanischen Ertragsrebsorten eine moderate genetische Diversität herrschte. STAVRAKAKIS und BINIARI

(1998) untersuchten 14 zur Muskatfamilie gehörende Ertragsrebsorten mit 11 RAPD-Primer auf ihre Differenzierbarkeit. Sie konnten bis auf zwei Sorten alle getesteten Ertragsrebsorten unterscheiden. Bei diesen nicht voneinander zu differenzierenden Sorten handelte es sich um die gleiche Ertragsrebsorte, welche unter verschiedenen Synonymen vertreten war. TESSIER et al. (1999) untersuchten 224 *Vitis vinifera* Sorten mit 21 RAPD-Primer und zwei Mikrosatelliten Loci. Davon erreichten 6 RAPD-Primer und 2 Mikrosatelliten-Primer einer Unterscheidung der von ihnen getesteten *Vitis vinifera* Sorten.

Unterlagsreben wurden im Verhältnis zu Ertragsrebsorten in der Literatur weniger intensiv behandelt. GRANDO et al. (1996) differenzierten 18 Unterlagssorten und 19 *Vitis vinifera* Sorten mit 40 RAPD-Primer, wobei für 7 dieser Primer keine polymorphen Banden gefunden wurden. GRANDO betonte die hohe Reproduzierbarkeit der RAPD-Marker. THIS et al. (1997) analysierten und differenzierten mit Hilfe der RAPD-Analyse 30 Unterlagssorten. Bei diesen 30 Unterlagssorten war es dieser Arbeitsgruppe möglich, 23 Sorten mit zwei Primer zu unterscheiden.

Mit der RAPD-Analyse wurden zusätzlich Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Rebsorten untersucht. So prüfte beispielweise VIDAL (VIDAL et al. 1999) die genetische Verbindung zwischen 32 Ertragsreben, die in unterschiedlichen Regionen Frankreichs und Spaniens wachsen. 33 Primer wurden hinsichtlich der Differenzierung aller Sorten untersucht. Keiner der Primer konnte alle getesteten Sorten voneinander unterscheiden. Es bildeten sich jedoch zwei geografische Gruppen heraus, die in sich gemeinsame Vorfahren besitzen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RAPD-Methode vorrangig zur Differenzierung von Unterlagssorten der Gattung *Vitis* genutzt. Ein Teil der hier aufgeführten Genotypen sind sehr alte, aus Amerika oder aus Asien importierte Formen. Da es sich bei diesen Reben um selektionierte Wildreben handelt, ist nichts über ihre Elternteile bekannt. Es ist anzunehmen, dass sie frei abblühten und eine dementsprechende Vermischung des Erbgutes zwischen ihnen oder ihren Vorfahren stattfand. Die Art *Vitis cinerea* ist in diesem Punkt auszuschließen, da sie einen anderen Blütezeitpunkt als *Vitis riparia*, *Vitis berlandieri*, *Vitis rupestris* etc. aufweist.

Am Beispiel der Art *Vitis riparia* wird deutlich, dass die Reben, die unter die Artbezeichnung ‚*Riparia*‘ fallen, ampelographisch deutliche Unterschiede zeigen. Darauf verwies bereits MOOG (1957) in seiner allgemeinen morphologischen Betrachtung. Hier wurde angegeben: ‚Triebspitze von Ripariatypus. Triebe kahl (*Riparia* 1 G. A (Börner), *Riparia grand glabre*, *Riparia gloire de Montpellier*), beborstet (*Riparia pubescens bleu* (Despetis),

Riparia pubescens (Klosterneuburg) oder nur an den Knoten beborstet (*Riparia 2 G.*). Ausgewachsenes Blatt lang keilförmig, dreilappig.' Das heißt, es gibt eine Zusammenfassung an Reben, die ähnliche Eigenschaften und Aussehen miteinander teilen. Diese werden zu einer Formengruppe zusammengefasst.

Aus diesem Grund ist es oftmals schwer, wenn nicht die exakte Sortenbezeichnung der Elternteile einer F1-Generation angegeben sind, diese nachzuvollziehen. Selbst bei Ertragsrebsorten ergeben sich Probleme, die ehemaligen Kreuzungspartner zu identifizieren (BÜSCHER et al. 1994, TSCHAMMER und ZYPRIAN 1994, REGNER et al. 1996)

Im Falle der Unterlagssorten ist oftmals nur bekannt, dass beispielsweise *Vitis riparia* mit *Vitis cinerea* gekreuzt wurde. Wurden keine detailliertere Aussage über die genaue Bezeichnung der Wildformen gegeben, so ist es schwierig, die ehemaligen Kreuzungspartner zu finden. Die Unterlagssorten, die aus diesen Wildformen hervorgegangen sind, sind heterozygot.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ‚Nicht vinifera Typen‘ waren alte Wildrebenformen und daraus hervorgegangene, selektionierte Unterlagssorten. Die Trennung der ‚Nicht vinifera Typen‘ stützte sich in erster Linie auf Primer #751 einen Dinukleotidprimer mit einem G/C-Anteil von 70 %. Mit ihm war es möglich von 151 untersuchten Genotypen 144 zu differenzieren. Es ist sehr ungewöhnlich, dass ein einzelner RAPD-Primer eine so große Auftrennungsfähigkeit besitzt. Wie bei THIS et al. (1997) oder bei TESSIER et al. (1999) beschrieben, konnte eine Differenzierung von Unterlags- oder Ertragsorten nur durch eine Kombination von Primern erfolgen. Primer #751 besitzt eine Dinukleotidsequenz (CCC ACC ACA C). POWELL et al. (1996) stellten für die Sojabohne fest, dass gerade AC beinhaltende SSR einen höheren Grad an Polymorphismen aufwiesen im Vergleich zu AG-Motiven. Auch ECHT et al. (1996) wiesen in Kiefern eine große Anzahl an polymorphen AC-Motiven nach. THOMAS und SCOTT (1993) wendeten erstmals die Mikrosatelliten-Analyse auf *Vitis vinifera* an. Sie betonten in diesem Zusammenhang das häufige Auftreten und das über das gesamte Genom verstreute Vorkommen der verschiedenen Mikrosatellitenklassen, insbesondere der Dinukleotid-Sequenzen GA und GT.

LODHI und REISCH (1995) verwiesen darauf, dass das Genom der Rebe von einer Größe von $4,75 \cdot 10^8$ bp/C nur eine kodierende Region von 3,8 % besitzt. Der Rest des Genoms, $4,57 \cdot 10^8$ bp, ist wahrscheinlich repetitiv oder nicht kodierend. Der Primer #751 könnte demnach in solchen Strukturen binden.

Die auf diese Weise differenzierten Unterlagssorten und Genotypen wurden in einer Tabelle mit Ähnlichkeitsindices und einem Dendrogramm, erstellt nach UPGMA, basierend auf

den Werten kalkuliert nach DICE, dargestellt. Es sollte hiermit aber kein phylogenetischer Anspruch erhoben werden, da zu diesem Zweck die Anzahl der hierfür erhaltenen Marker zu niedrig wäre (FANIZZA et al. 1999, McGRATH et al. 1999).

Es wurde die Trennfähigkeit des Primer #751 in Bezug auf die getesteten Unterlagssorten dargestellt und den Einsatz der RAPD-Analyse zur routinemäßigen Differenzierung von Unterlagssorten aufgezeigt.

4.3.1.1 Unterscheidung der Unterlagssorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A Goseck*

Verschiedenen Autoren war es nicht möglich, die Sorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A* zu differenzieren. WALKER und LIU (1995) testeten beide Unterlagssorten mit insgesamt 7 verschiedenen Isoenzymen. Sie fanden keine Unterschiede zwischen beiden Sorten, weder mit Isoenzymen, noch ampelographisch. GUERRA und MEREDITH (1995) untersuchten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A* innerhalb der RFLP-Analyse mit 12 Kombinationen von Restriktionsenzymen und DNA-Sonden, bestehend aus *Eco* RV und *Hind* III und 6 unterschiedlichen DNA-Sonden. Allerdings verwendeten sie das gleiche Pflanzenausgangsmaterial wie WALKER und LIU. GUERRA und MEREDITH fanden mit der RFLP-Analyse ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Sorten. THOMAS et al. (1994) testeten im Zuge der Anwendung von Mikrosatellitenmarkern auf Reben ebenfalls *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A*. Eine Trennung der Sorten war auch mit dieser Technik nicht möglich. Deshalb tendierten auch sie dazu, *Kober 5 BB* mit *Teleki 5 A* gleich zu setzen. 1998 untersuchten LIN und WALKER 58 Unterlagssorten mit Mikrosatelliten-Markern. Auch hier stellten sie fest, dass *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A* nicht zu trennen waren, ebenso wie *Paulsen 775 E* und *Paulsen 779 E* nicht differenziert werden konnten.

Die im Sortiment der Forschungsanstalt Geisenheim des Fachgebietes Rebenzüchtung und Rebenveredlung gepflanzten Unterlagssorten *Kober 5 BB* sowie *Teleki 5 A* stammten als Originalmaterial aus dem ehemaligen Sortiment von Seliger (Preussischer Rebschnittgarten, Hochheim, 1936). Die Sorte *Teleki 5 A* wird im Geisenheimer Sortiment als *5 A Goseck* bezeichnet, wobei diese Bezeichnung gleich zu setzen ist mit *Teleki 5 A* und ‚Goseck‘ der Flurbezeichnung entspricht (KONRAD pers. Mitteilungen 2000). Im Zuge der Differenzierung der verschiedenen Unterlagssorten und Genotypen wurden beide Sorten mit Primer #751 in der RAPD-PCR untersucht. Es war möglich beide Sorten eindeutig voneinander zu trennen. Im Gegensatz zu dem Pflanzenmaterial, das von WALKER und LIU

sowie von GUERRA und MEREDITH getestet wurde, zeigen beide Sorten auch ampe-
lographische Unterschiede.

Dies warf nun die Frage auf, ob das Material, das von den jeweiligen Arbeitsgruppen un-
tersucht wurde, das Originalmaterial war oder ob in der Vergangenheit Verwechslungen
aufgetreten sein könnten. WALKER berief sich in seinem Artikel auf GALET (1988).
GALET ließ keinen Zweifel zu, dass aufgrund von Verwechslungen Anfang des 20. Jahr-
hunderts die Sorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A* vermischt wurden. TELEKI und KOBER
verwendeten beide den gleichen Code zur Bezeichnung der selektionierten Sorten, aller-
dings für unterschiedliche Selektionen. Die Nachkommen dieser Sorten wurden unter ana-
logen Bezeichnungen verkauft.

MOOG (MOOG 1957) sprach ebenfalls diese Problematik an: 'A. Manaresi (1947) hat eine
Berlandieri x Riparia 5 BB (Teleki) (= 5 A Teleki) abgebildet, welche ebenfalls doppelt
gegabelte Ranken aufweist, wie solche auch der Berlandieri Ressayguier Nr. 1 zu eigen zu
sein scheinen. Die von A. Manaresi als 5 BB bzw. als 5 A Teleki dargestellte Rebensorte
ist zwar kaum mit der echten Kober 5 BB identisch.' Demzufolge ist es sehr wahrschein-
lich, dass verschiedene 5 BB Typen vorhanden sind. So beschreibt DÜMMLER
(DÜMMLER 1922) die Gruppeneinteilung der von KOBER im
Jahre 1902 von TELEKI erhaltenen *Berlandieri-Riparia-Teleki-Sämlinge*, auf die unsere
heutigen Unterlagen zurückgehen:

A ist rotwipflig, rottriebig, borstig behaart,

B rotwipflig, rottriebig, aber glänzend,

C grünwipflig, grüntriebig oder nur sonnenseits etwas rötlich und behaart,

D grünwipflig, grüntriebig mit roten Knoten, glänzend glatt.

Aus diesen vier Gruppen wurden in den folgenden Jahren die kräftigen und widerstandsfä-
higen Pflanzen herausselektioniert und mit den Doppelbuchstaben AA, BB, CC, DD und
Selektionsnummern bezeichnet. DÜMMLER unterschied weiterhin zwischen normaler
Selektionsform und der Zusatzbezeichnung ‚Type‘. Unter dieser Zusatzbezeichnung fasste
er alle die zusammen, die der vorher beschriebenen Selektionsform ähnelten, aber inner-
halb der Gruppe nicht homogen waren. Zudem findet sich hier der Zusatz: 'Obwohl die 5
BB von einem Stocke abstammen soll, machen sich in unseren Anlagen mehrere Typen
bemerktbar, so dass eine weitere Selektion notwendig fällt.' Die morphologischen Unter-
schiede der beiden Unterlagssorten im Geisenheimer Sortiment entsprechen auch den von
KOBER angegebenen Einteilungen und Buchstabencodes: So steht das A für borstig be-
haart und das B für glänzend, bzw. glatt. Weiterhin weist 5 BB im Gegensatz zu 5 A eine

stärkere Anthocyanfärbung auf, die sich auch in die großen Blattnerve fortsetzt. Zudem bildet die Stilbucht der 5 *BB* ein U, während die 5 *A* im Vergleich dazu ein V und weitaus weniger Anthocyanfärbung zeigt (KONRAD pers. Mitteilungen 2000).

Dies alles lässt den Schluss zu, dass es durchaus eine Vermischung von unterschiedlichem Material gegeben haben könnte. Demzufolge wäre das Material in der USA und Australien ein anderes als das im Sortiment der Forschungsanstalt Geisenheim. Dies würde die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Ein vergleichender Test zwischen den Sortimenten wäre hier wünschenswert.

4.3.1.2. Stabilität und Reproduzierbarkeit der RAPD-Primer

RAPD-Primer werden oftmals als ungenügend verlässlich oder als nicht reproduzierbar angesehen (XU et al. 1995, BAUER und ZYPRIAN 1997). JONES et al. (1997) verglichen die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die sie durch RAPD, AFLP und SSR Marker erhielten, zwischen verschiedenen Labors. Jedes der partizipierenden Laboreinrichtungen entwickelte einen Ansatz für einen speziellen Markertyp und versandte diesen an die anderen Laboratorien. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen und AFLP stellte sich hierbei als die zu Beginn am schwierigsten durchzuführende Methode, aber letztendlich als die reproduzierbarste der drei Methoden heraus. Die erhaltenen Ergebnisse von 50 RAPD-Primer waren zu 75 % reproduzierbar.

Die Standardisierung und Optimierung von Laborbedingungen sind entscheidend, damit die Methode verlässlich und reproduzierbar ist. THIS et al. (1997) betonten den Einsatz von stabilen RAPD-Markern, ebenso MULCAHY et al. (1995) und GRANDO et al. (1996). SKOV (1998) erreichte eine 93 % Reproduzierbarkeit der erhaltenen Bandenmuster in zwei unterschiedlichen Labors, indem er die Bedingungen für seine stabilen RAPD-Primer standardisierte und optimierte. Da RAPD-Primer synthetisch hergestellt werden und zunächst nicht spezifisch für ein bestimmtes Genom sind, müssen sie entsprechend auf ihre Stabilität in dem jeweils untersuchten Genom überprüft werden. Aufgrund der Vielzahl dieser Primer ist die geeignete Auswahl sehr wichtig, um letztendlich die erforderliche Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit zu erhalten.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einsatz von RAMP-Zeiten zur zusätzlichen Standardisierung von RAPD-PCR überprüft. Die ungenügende Amplifikation im Falle des Strategie-Thermocyclers könnte mit der Arbeitsweise des Thermocyclers zusammenhängen. Der

Thermocycler arbeitet mit einem Schwenkarm. Er besitzt vier Blöcke, die jeweils mit der entsprechenden Temperatur beheizt werden. Die Proben des Reaktionsansatzes werden automatisch aus den Blöcken herausgehoben und in einen anderen Block mit der programmierten Temperatur hineingesetzt. Die bei den anderen beiden Thermocyclern verwendeten RAMP-Zeiten konnten hier nicht einprogrammiert werden. Die Proben, die sich in den anderen Thermocyclern während der RAMP-Zeiten mit aufwärmen oder abkühlen konnten, wurden hier direkt in den bereits vorgeheizten oder vorgekühlten Block eingesetzt. Deshalb könnte hier die Zeit, welche der Reaktionsansatz benötigt, um die Reaktionsstemperatur anzunehmen und die entsprechende Reaktion ablaufen zu lassen, zu kurz gewesen sein.

Die Zeitspanne des Abkühlens und Aufheizens konnte mit einer RAMP-Zeit von 0,3 °/s standardisiert und die Reaktionsbedingungen für alle Proben gleich gehalten werden.

4.3.1.3 Identifikation von Unterlagssorten mit Hilfe der RAPD-Analyse

Die Verlängerung der Primer von Dekamer-Primern zu 12mer Primern setzt die Bindungswahrscheinlichkeit im Genom herab. Die Spezifität der Primer wird somit erhöht. Allerdings kann dies auch dazu führen, dass es zu keiner klaren Bandenbildung mehr kommt wie im Falle der Primer #726b und #726c. Primer #751b und #751c zeigten keine sortenspezifischen Banden. Weiterhin konnte durch ihre Verwendung keine Abtrennung aller untersuchter Unterlagssorten erreicht werden. REGNER et al. (1993) testeten die Differenzierfähigkeit von 10mer, 15mer und 16mer Primern anhand von 12 Rebsorten. Sie stellten fest, dass einzig der 10mer primer eine zufriedenstellende Abtrennung der Sorten ergab.

Im Gegensatz dazu führte im Rahmen dieser Arbeit der Einsatz von 12mer Primer #722b und #722c zu sortenspezifischen Banden für die Unterlagssorten *Börner*, *8 B*, *3309 C* (Primer #722b) und *5 BB* (Primer #722c). Durch die Verwendung dieser Primer konnten diese vier Unterlagssorten identifiziert werden.

Ein anderer Ansatz zur Identifikation von Unterlagssorten wurde auf der Basis der durch Primer #751 erhaltenen Ergebnisse untersucht. Durch die Standardisierung und Optimierung der RAPD-Analyse wurden auf der Basis der mit Primer #751 erhaltenen Bandenmuster die ersten Berechnungen durchgeführt, um mit Hilfe der RAPD-Analyse mit Dekamer-Primern nicht nur eine Sortendifferenzierung, sondern auch eine Sortenidentifizierung zu erreichen. Durch die ermittelte lineare Transformation der Banden an einer Referenzbande (KIRCHNER-NESS pers. Mitteilungen) konnten die

renzbande (KIRCHNER-NESS pers. Mitteilungen) konnten die Bandenmuster der 7 in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten errechnet werden. Die 7 Unterlagssorten wurden 6 mal mit Primer #751 amplifiziert, in einem 1,3 %gen Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die so erhaltenen Bandenmuster dienten als Grundlage für die erfolgten Berechnungen.

Die lineare Transformation mit allen verfügbaren Banden zeigte keine sinnvolle Zuordnung der Banden zu bestimmten Molekulargewichten, damit eine dem Bandenmuster entsprechende Verteilung ersichtlich wurde. Erst mit der Ermittlung einer aussagekräftigen Referenzbande war das Errechnen der Bandenmuster der 7 Unterlagssorten durchführbar. Es wurden 3 unterschiedliche Banden, die allen Unterlagssorten gemeinsam waren, einzeln und als Kombination geprüft. Die Durchschnittswerte des Molekulargewichts der möglichen Referenzbanden ergaben sich aus den Werten der Molekulargewichte der jeweiligen Bande, die pro Gel für jede Unterlagssorte ermittelt wurden. Die Bande mit dem Durchschnittswert von 1073 bp war zur linearen Ausrichtung der übrigen Banden einer untersuchten Sorte am besten geeignet. Mit dieser Referenzbande, in Kombination mit der Zuordnung von Bewertungen der Intensität einer jeden Bande, war eine mit dem Bandenmuster übereinstimmende Errechnung der Banden möglich.

Da RAPD-Marker dominante Marker sind, fließt die Bewertung der Intensität üblicherweise nicht in die Auswertung ein. Es wird nach anwesend/nicht anwesend (1/0) entschieden. In diesem Fall ergaben sich durch das Einbeziehen der Intensitäten Informationen, die es ermöglichten, die Bandenmuster der 7 Sorten rechnerisch darzustellen. Es wurde dadurch zwischen Banden unterschieden, die immer und mit gleicher Intensität vorhanden waren und Banden, die nicht immer durchgängig und mit geringer Intensität vertreten waren. Dies beinhaltete in der Regel die Banden, deren Intensität mit 1 bewertet wurde. THORMANN et al. (1994) erkannten, dass es sich bei den in ihrer Intensität schwachen Banden nicht unbedingt um Fragmente handelte, die in ihrer Kopie innerhalb des Genoms weniger häufig auftraten. Sie führten zwei Gründe für Bandenintensitätsunterschiede an: Der Grad der Homologie zwischen Primer und DNA Matrize, sowie die Amplifikation anderer Fragmente. Demnach konnten die mit Intensität 1 bewerteten Banden vernachlässigt werden.

Bisher wurden Untersuchungen in der Richtung Identifikation von Unterlagssorten anhand der RAPD-Analyse über ein Rechenmodell noch nicht dargestellt. Ziel war es, gestützt auf einen stabilen RAPD-Primer, die Möglichkeit einer Identifikation von Unterlagssorten am Beispiel der 7 am häufigsten in Deutschland verwendeten Unterlagssorten durch die RAPD-Methode kombiniert mit einem Rechenmodell vorzustellen.

Im Rahmen dieser Untersuchung war es möglich, durch die lineare Transformation der Banden an einer Referenzbande unter Berücksichtigung der Bandenintensitäten das jeweilige Bandenmuster zu errechnen. Somit könnte innerhalb der vorgegebenen Bedingungen des Labors eine Identifizierung der in diesem Zusammenhang getesteten Unterlagssorten ermöglicht werden.

4.3.2 Genetischer Zusammenhang der Unterlagssorten 5 C, 5 BB, 8 B, 125 AA, SO 4 sowie Börner und 3309 C

Die Unterlagssorten 5 C, 5 BB, 8 B, 125 AA und SO 4 sind Produkte der gleichen Kreuzungsgruppe *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*. Börner und 3309 C sind über *Vitis riparia*, welche die Mutter der beiden Sorten darstellt, mit diesen ‚verwandt‘. Mit 5 RAPD-Primer ergaben sich 70 Banden für die Unterlagssorten, 56 waren davon polymorph. Das in 3.3 dargestellte Dendrogramm, errechnet nach DICE und dargestellt nach UPGMA, zeigte die genetische Beziehung der sieben Sorten zueinander. So bildeten die 5 Abkömmlinge der gleichen Kreuzungsgruppe zusammen ein Cluster, während Börner und 3309 C außerhalb standen.

Die sieben in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten zeigen morphologisch und physiologisch Unterschiede. Die Unterlagssorten 5 BB und 125 AA sind weibliche, SO 4, 5 C, 8 B, Börner sowie 3309 C männliche Pflanzen. Es bestehen vom Bundesortenamt festgelegte Richtlinien, nach denen die Unterlagssorten morphologisch beurteilt werden (BUNDESSORTENAMT, BESCHREIBENDE SORTENLISTE REBEN 2000). Diese Kriterien enthalten Bewertungen der Triebspitze in Form, Wollbehaarung und Anthocyanfärbung, Bewertungen des Triebes in Wüchsigkeit, Geiztriebbildung sowie Borstenbehaarung der Knoten und Internodien, Bewertungen der Holzfarbe sowie Bewertungen des Blattes in Bezug auf Größe, Blasigkeit der Oberfläche, Zahl der Lappen, Stielbuchtform, Anthocyanfärbung der Nervenoberseite sowie die Borstenbehaarung der Nervenunterseite und des Stiels (OIV-Richtlinien, UPOV). Weitergehende Beurteilungen sind die Holzausreife, der Holztertrag, die Affinität der Unterlage zum Edelreis, die Bewurzelungsfähigkeit sowie die Anfälligkeit gegenüber der Wurzel- und Blattreblaus. Diese Kriterien werden für die jeweilige angesprochene Unterlagssorte nach einem Punkteschema von 1-9 beurteilt und charakterisieren zusammen die entsprechende Pflanzensorte.

Folgende Kriterien treffen auf alle Unterlagssorten der gleichen Kreuzung gleichermaßen zu: sehr geringe Wollbehaarung der Triebspitze, Blatt im Riparia-Typ, weit offene Stielbucht des Blattes, dunkelbraune Holzfarbe, Anfälligkeit gegenüber der Wurzelreblaus ist vorhanden, die Schäden sind jedoch gering sowie eine sehr hohe Anfälligkeit gegenüber der Blattrauben.

Innerhalb des Dendrogramms standen im Cluster der Kreuzungsgruppe *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* die Abkömmlinge *SO 4*, *125 AA* und *5 BB* auf der einen Seite den Abkömmlingen *5 C* und *8 B* gegenüber. In Verbindung mit den ampelographischen Bewertungskriterien des Bundessortenamtes decken sich die Kriterien Anthocyanfärbung der Triebspitze und Geiztriebbildung des Triebes mit der Aufteilung innerhalb des Dendrogramms. Allerdings vermittelt die alleinige Betrachtung des Dendrogramms ohne die ermittelten Ähnlichkeitsindices kein korrektes Bild. So stand *5 BB* mit einem Ähnlichkeitsindex von 0,72 für *SO 4* und 0,72 für *5 C* zwischen beiden Sorten. *SO 4* war von *5 C* und *8 B* am weitesten entfernt. Es bestand ein Ähnlichkeitsindex von *SO 4* zu *8 B* von 0,63 und *SO 4* zu *5 C* von 0,55. Ampelographisch sind die Sorten *SO 4* und *5 C* schwer zu trennen, die Triebspitze der *5 C* ist lediglich grün, die der *SO 4* bronziert.

5 C und *8 B* zeigten zueinander den höchsten Index von 0,8. *125 AA* und *5 BB* wiesen dagegen mit *5 C* und *8 B* Indices von 0,71-0,74 auf. Diese Verteilungen werden nicht immer von den morphologischen Kriterien gestützt. So weisen beispielsweise die Unterlagssorten *5 C* und *8 B* mit dem höchsten Ähnlichkeitsindex von 0,8 nur drei übereinstimmende Kriterien auf, beide sind männlich, weisen eine mittel bis starke Geiztriebbildung auf und die Triebspitze besitzt eine geringe Anthocyanfärbung.

Die Unterlagssorten Börner und *3309 C* weichen in ihren morphologischen Charakteristika von den übrigen Sorten stark ab. Das Blatt der *Börner* ist im Vergleich zu den Blättern der übrigen Unterlagssorten sehr groß. Die Blätter im Triebspitzenbereich besitzen einen karminroten Rand, das Holz ist beborstet und die Blüte besitzt 6 statt 5 Staubgefäße (RIES pers. Mitteilungen).

Das Blatt der *3309 C* ist im Vergleich zu den anderen Unterlagssorten klein und kurz, breiter als lang. In der Form ähnelt es dem Blatt einer *Rupestris*-Art. Weiterhin ist das Holz der *3309 C* rötlich braun und kahl, das der übrigen Sorten dunkelbraun, die Internodien sind deutlich kürzer als bei allen anderen Sorten (RIES pers. Mitteilungen).

Die Verwendung der RAPD zur Verwandtschaftsanalyse ist nicht unproblematisch. Zunächst ist die Sequenz der Banden unbekannt. Banden, die auf einer Höhe laufen, können somit die gleiche Sequenz besitzen, müssen aber nicht. Während bei RFLP aufgrund der

Bindung einer gesamten DNA-Probe die Sequenz homolog sein muss, ist dies im Falle der RAPD nur für den Dekamer-Primer der Fall. Untersuchungen von THORMANN et al. (1994) zeigten, dass die Daten der RFLP- verglichen mit denen der RAPD-Analyse auf intraspezifischer Ebene ähnlich waren, auf interspezifischer Ebene sich unterschieden. Dies führten sie darauf zurück, dass nicht homologe Fragmente innerhalb der RAPD als ‚identisch‘ gezählt wurden, da sie im Gel auf der gleichen Höhe liefen. RAPD-Marker sind dominante Marker. Das bedeutet, dass kein Unterschied zwischen homo- und heterozygot möglich ist. Dadurch können Über- oder Unterbewertungen der Ähnlichkeiten auftreten (MILBOURNE et al. 1997). Es bedarf daher einer intensiven Prüfung der durch die RAPD-Analyse erhaltenen Daten damit die Aussage der Dendrogramme den tatsächlichen Verhältnissen entspricht.

4.3.3 Untersuchungen zur genetischen Varianz der Unterlagenklone der Sorten *SO 4*, *5 BB* und *5 C* sowie der Unterlagssorte *Binova*

Unteralagenklone sind ampelographisch nicht zu unterscheiden. Es handelt sich bei diesen um die Nachkommen einer einzelnen Rebe. Spontane Mutationen bewirken Änderungen in der physiologischen Leistung einzelner Stöcke, bleiben ampelographisch aber meist unerkannt (SCHÖFFLING und STELLMACH 1993).

Innerhalb der Literatur wurden Klone von Ertragsreben hinsichtlich ihrer Differenzierbarkeit mit Methoden wie Mikrosatelliten- und RAPD- (SILVESTRONI et al. 1997, REGNER et al. 1998, REGNER et al. 2000) sowie AFLP-Analysen (CERVERA et al. 1998) untersucht.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen sollten erstmals die genetischen Varianzen bei Unterlagenklonen untersucht werden. Da die Entstehung von Klonen bereits durch Punktmutationen ausgelöst werden kann, sind Methoden wie RAPD, AFLP und SAMPL sinnvoll in der Anwendung, da sie in der Lage sind, Punktmutationen wie Deletion oder Insertion, zu detektieren. Weiterhin stehen für diese Methoden eine unbegrenzte Anzahl von Markern zur Verfügung.

Die Auftrennung der 5 C Klone in einem Polyacrylamidgel, amplifiziert innerhalb der RAPD mit einem Tetranukleotid-Primer, zeigte, dass eine Detektion von genetischen Varianzen mit dieser Methode möglich ist. Durch die Auftrennung der Proben in einem Polyacrylamidgel und die Anfärbung der Proben mit Silberfärbung wurden die Fragmente, die im Agarose-Gel mit Ethidiumbromidfärbung unentdeckt blieben, nachweisbar.

Im Rahmen eines gemeinsamen Projektes, gefördert durch den DAAD, sollte geklärt werden, inwieweit genetische Varianzen zwischen Unterlagenklonen mit Hilfe der AFLP- und SAMPL-Methoden nachgewiesen werden konnten. Dazu wurden exemplarisch folgende Unterlagssorten und deren Klone ausgewählt: *SO 4*, *Binova*, *5 C* und *5 BB*.

4.3.3.1 Die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analyse

Von VOS et al. 1995 entwickelt stellt die Amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analytik eine verhältnismäßig neue Methode dar. Sie bietet die Möglichkeit, auch kleinste Abweichungen im Genom zu erfassen. Die Methode beruht auf dem Schneiden der genomischen DNA mit zwei Restriktionsenzymen, einer Preamplifikation (1. selektiven Amplifikation) und einer 2. selektiven Amplifikation.

Der Grund, weshalb zwei Restriktionsenzyme verwendet werden, liegt in der Optimierung der Fragmentanzahl. Das verhältnismäßig oft schneidende Enzym, in diesem Fall *Mse I*, produziert kleine Fragmente, die gut amplifizieren und eine optimale Größe zur Auftrennung innerhalb eines Polyacrylamidgels haben. Die Anzahl der amplifizierten DNA-Fragmente wird durch das selten schneidende Enzym reduziert, hier *Eco RI*, da nur die Fragmente amplifiziert werden, die beide Schnittstellen aufweisen.

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme werden anschließend mit Adaptoren verlängert, die späteren Bindungsstellen der eingesetzten Primer. Danach werden innerhalb zweier aufeinanderfolgender selektiven Amplifikationen die Anzahl der Fragmente so verringert, dass sie auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können.

Die ‚Ausdünnung‘ der Anzahl der Fragmente wird durch die Wahl der selektiven Nukleotide der *Eco RI* und *Mse I* Primer erreicht (CERVERA pers. Mitteilungen). Innerhalb der selektiven Amplifikation werden zwei *Eco RI* (mit je 3 selektiven Nukleotiden) aber nur ein *Mse I* Primer (mit 3 selektiven Nukleotiden) eingesetzt. Der Grund liegt in einer Optimierung der am Ende ausgewählten Fragmente (CERVERA et al. 1998). Es muss ein Optimum geschaffen werden zwischen der Anzahl an Banden und dem Grad der erhaltenen Polymorphismen. Bei einer Verwendung von einem *Eco RI* Primer mit 2 selektiven

Nukleotiden bekäme man einen Wert von $\frac{1}{4}$ ($1/4$: eine Base von 4 möglichen Basen). Das bereits in der Präamplifikation verwendete Nukleotid (,0') wird nicht berücksichtigt und steht deshalb in Klammern.

Primer (*Eco* RI 0) 1 = $\frac{1}{4}$

Hierbei wäre die Selektivität (Polymorphismus) sehr gering, die Bandenanzahl aber sehr hoch, da die Bindungswahrscheinlichkeit des Primers verhältnismäßig groß ist.

Im zweiten Fall würde ein *Eco* RI Primer mit 3 selektiven Nukleotiden eingesetzt werden, wobei das selektive Nukleotid aus der Präamplifikation wiederum in die Rechnung nicht miteinbezogen wird.

Primer (*Eco* RI 0) 1 1 = $\frac{1}{4} * \frac{1}{4} = 1/16$

Die Selektivität (Polymorphismus) wäre sehr hoch, die Bandenanzahl aber zu gering. SENSI et al. (1996) untersuchten die Differenzierbarkeit von 16 italienischen Ertragsreb-sorten mit Hilfe der AFLP und ISTR (inverse sequence-tagged repeat analysis)–Analyse. Durch den Einsatz eines *Eco* RI Primers mit drei selektiven Nukleotiden erhielten sie mit der AFLP-Methode weniger Polymorphismen im Vergleich zu der ISTR-Analyse.

Wenn nun zwei *Eco* RI Primer mit 3 selektiven Nukleotiden eingesetzt werden, so ergibt sich eine Kombination aus den beschriebenen Fällen. Bei beiden *Eco* RI Primer werden die selektiven Nukleotide aus der Präamplifikation nicht berücksichtigt. Der erste *Eco* RI Primer erhält für seine beiden selektiven Nukleotide jeweils $\frac{1}{4}$ ($2 * \frac{1}{4}$). Der zweite *Eco* RI Primer bringt nur ein selektives Nukleotid mit ein ($1 * \frac{1}{4}$), da das erste der beiden selektiven Nukleotide das gleiche Nukleotid wie bei dem ersten *Eco* RI Primer ist.

Daraus ergibt sich: $\frac{1}{4} * \frac{1}{4} + \frac{1}{4} = 1/8$.

Damit ist es möglich, die angestrebte Optimierung zwischen Bandenanzahl und Polymorphismus zu erreichen.

Zusammen mit dem *Mse* I Primer (Primer (*Mse* I 0) 1 1 = $1/16$) ergibt sich ein Wert von $1/128$ Fragmenten, die aus dem Pool der präamplifizierten Fragmente isoliert werden können.

4.3.3.2 Die Unterlagssorten *SO 4* und *Binova*

Die Unterlagsreben *SO 4* und *Binova* werden in Deutschland als jeweils eigenständige Sorten beim Bundessortenamt (BUNDESSORTENAMT 2000) geführt. Es wird davon ausgegangen, dass *Binova* als Mutation aus der *SO 4* hervorgegangen ist. Beide Sorten sind

morphologisch sehr ähnlich mit dem Unterschied, dass *SO 4* männlich und nicht traubentragend ist, *Binova* dagegen ist zwittrig und traubentragend. Mit Hilfe der RAPD-Analyse war eine Unterscheidung der Sorten voneinander nicht möglich. Im Vergleich dazu sind die Sorten *5 C*, *5 BB*, *8 B* und *125 AA*, die aus der gleichen Kreuzungsgruppe abstammen, relativ einfach voneinander zu trennen (siehe 4.3.2). Es wurde geprüft, ob beide Sorten voneinander mit der AFLP- oder SAMPL-Analyse abgrenzbar sind.

Binova war zwar über wiederholende Banden von den übrigen *SO 4* Klonen abzutrennen, wurde aber trotzdem eindeutig innerhalb des *SO 4* Cluster gruppiert. So wies *SO 4* zu *Binova* für die AFLP-Analyse einen Ähnlichkeitsindex von 0,93, für die SAMPL-Analyse 0,975 auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei *Binova* tatsächlich um eine mutierte Variante der Sorte *SO 4* handelt und nicht um eine ursprünglich eigenständige Sorte. Das Genom der Rebe ist sehr heterozygot. Aus diesem Grund wäre eine zufällige, in diesem Grade enge Verwandtschaft zwischen zwei Sorten sehr unwahrscheinlich.

4.3.3.3 Untersuchungen zur genetischen Varianz von Unterlagenklonen mit der AFLP- und SAMPL-Analyse

Innerhalb der Untersuchungen zur genetischen Varianz mit der AFLP- und SAMPL-Analyse ergaben sich verschiedene Bandentypen: ‚monomorphe Banden‘ und ‚polymorphe Banden‘, davon ‚Einzelbanden‘, ‚wiederholende Banden‘ und ‚polymorphe, nicht zur Unterscheidung geeignete Banden‘ (siehe 3.5.2.1).

Beide Methoden zeigten eine hohe Anzahl an Banden. AFLP lieferte insgesamt 277 Banden, davon waren 67 Banden polymorph. Die polymorphen Banden setzten sich aus 68,18 % ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘, 28,36 % ‚Einzelbanden‘ und 4,5 % ‚wiederholende Banden‘ zusammen (Werte in Prozent bezogen auf polymorphe Banden).

SAMPL zeigte insgesamt 283 Banden, 73 Banden wurden als polymorph ermittelt. Von diesen erwiesen sich 76,71 % als ‚unterlagssortenspezifische Banden‘, 17,81 % als ‚Einzelbanden‘ und 5,48 % als ‚wiederholende Banden‘.

Im Vergleich zueinander waren für die SAMPL-Analyse 8,53 % mehr ‚unterlagssortenspezifische Banden‘ zu ermitteln. Dafür zeigte die AFLP-Analyse 10,55 % mehr ‚Einzelbanden‘. Für die ‚wiederholenden Banden‘ wiesen beide Methoden keine signifikanten Unterschiede zueinander auf.

Die ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘ stellten den größten Anteil an polymorphen Banden dar. Mit diesen war es möglich, mit beiden Methoden die Unterlassorten *SO 4*, *5 C* und *5 BB* klar voneinander zu trennen. Dieser Bandentyp war für die Clusterbildung der Sorten verantwortlich. So zeigte es sich, dass in der AFLP-Analyse *5 BB* und *5 C* zusammenstanden und *SO 4* zu *5 C* den größten Abstand zueinander aufwiesen. In der SAMPL-Analyse standen *SO 4* und *5 C* zusammen, während *5 BB* zu *SO 4* den größten Abstand zeigte. Innerhalb des Dendrogramms basierend auf den Daten beider Methoden zeigte sich wiederum die Aufteilung nach der AFLP-Analyse. Insgesamt wiesen die Ähnlichkeitsindices der Sorten untereinander wesentlich niedrigere Werte und damit größere Distanzen auf im Vergleich zu denen der RAPD-Analyse. Die Ähnlichkeitsindices der drei Unterlagssorten für AFLP und SAMPL lagen zwischen 0,2 und 0,4, während die der RAPD-Analyse zwischen 0,5 und 0,7 anzusiedeln waren.

Dies erklärt sich durch den höheren Grad an Differenzierung der AFLP- und SAMPL-Methoden. Sie können geringe genetische Unterschiede nachweisen und dementsprechend zwischen sehr eng verwandten Sorten unterscheiden (BARKER et al. 1999, YEE et al. 1999). Die Verwendung von AFLP- und SAMPL-Methoden zur Untersuchung der genetischen Varianzen der Unterlagssorte zeigte, dass eine genetische Varianz auftrat. Die hierbei detektierten Polymorphismen, ‚Einzelbanden‘, ‚wiederholende Banden‘ und ‚polymorphe, nicht zur Unterscheidung geeignete Banden‘ könnten auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein.

a) Partielles Schneiden der Restriktionsenzyme

Das generelle Bandenmuster der untersuchten Unterlagssorten war uniform. Die Unterlagssorten unterschieden sich untereinander klar durch die ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘. Innerhalb der Klone einer Unterlagssorte traten Polymorphismen auf, die unterteilt werden müssen in ‚Einzelbanden‘ und ‚wiederholende Banden‘ einerseits sowie ‚polymorphe, nicht zur Unterscheidung geeignete Banden‘ andererseits.

Innerhalb der Klone der Unterlagssorten bestand eine nachweisbare genetische Varianz. Insbesondere die *5 C* Klone und Einzelstöcke fielen in diesem Zusammenhang auf. Handelte es sich bei den auftretenden Polymorphismen um methodische Artefakte, so dürften die übrigen Unterlagssorten bzw. die Sorte *Binova* im Verhältnis zu den übrigen Klonen der Sorte *SO 4* keine so hohe Übereinstimmung aufweisen. *Binova* ist als eigenständige Sorte eingetragen. Dennoch ist sie nur schwer, wenn überhaupt von den übrigen *SO 4* Klonen abtrennbar.

Die 5 C Klone zeigten aber auch innerhalb der RAPD-Analyse, aufgetrennt in einem Polyacrylamidgel, genetische Varianzen auf.

Daraus kann geschlossen werden, dass die auftretenden Polymorphismen ihre Ursache nicht in dem partiellen Schneiden der Restriktionsenzyme haben.

b) Polymorphismen aufgrund von somatischen Mutationen

Somatische Mutationen wurden innerhalb von In-Vitro Kulturen und speziell bei der Regeneration von Pflanzen aus Zellkulturen dokumentiert (SCHNEIDER et al. 1996, BREGITZER et al. 1998). AL-ZAHIM et al. (1999) wiesen mit Hilfe der RAPD-Methode somaklonale Variationen innerhalb von Knoblauchpflanzen nach, welche aus somatischen Embryonen regeneriert wurden. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Bedingungen innerhalb der In-Vitro Kultur Mutationen induzierten, die auch bei Pflanzen, gewachsen innerhalb ihrer natürlichen Umgebung, vorkommen könnten. FOURRÉ et al. (1997) fanden bei 4 embryonalen Klonen von *Picea abies* L. nach der Regeneration phänotypische Variationen. Genetisch konnten sie mit Hilfe der RAPD-Methode eine hohe intraklonale, aber keine interklonale Variation feststellen.

Unterlagenklone werden vegetativ vermehrt, indem Stecklinge von einem Mutterstock geschnitten, bewurzelt und gepflanzt werden. Aus dem Auge des Stecklings wächst die neue Unterlage heran. Treten Mutationen innerhalb der Zellen von Knospen auf, wie Deletion oder Insertion, so weist auch die später aus dem Ein-Augen-Steckling hervorgegangene Pflanze diese Veränderung auf.

Die hier getesteten Klone sind aus alten Beständen entstanden und weitervermehrt worden. Über den Zeitraum von 20-30 Jahren könnten entsprechende Mutationen aufgetreten sein, die phänotypisch nicht auffallen, aber molekularbiologisch nachweisbar sind.

c) Methylierung der DNA

Im Pflanzengenom treten Cytosin-Methylierungen in Form von symmetrischen Sequenzen CpG und CpNpG (GRUENBAUM et al. 1981), und in nichtsymmetrischen Sequenzen, wie z. B. CpApTp und CpTpTp (FINNEGAN et al. 2000) auf. Methylierungen variieren in ihrem Auftreten entlang des Chromosoms und sind für die Regulierung der Genexpression auf transkriptionaler Ebene mitverantwortlich (BURN et al. 1993, PARK et al. 1996, RICHARDS 1997, FINNEGAN et al. 2000). Der Wechsel zwischen Methylierung und Demethylierung führt zu unterschiedlichen Methylierungsmustern, die eng mit der Regulierung der Replikation und Differenzierung von somatischen Zellen zusammen-

hängen (HSIEH 2000). XIONG et al. (1999) nutzten die Sensitivität von Restriktionsenzymen auf methyliertes Cytosin zur Untersuchung des Methylierungsgrades im Reisgenom. Dabei erkannten sie, dass der Grad der Methylierung gewebsspezifisch war. Zudem stellten sie Unterschiede im Methylierungsgehalt der Elternlinien und ihrer Nachkommen fest. KOVAŘÍK et al. (1997) fanden in repetitiven DNA-Sequenzen bei *Brassica*, Birne und Tabak einen hohen Grad an methylierten CpG Strukturen.

Eco RI erkennt und schneidet die Sequenz: 5'GAATTC'3. Folgt auf das Cytosin ein Guanin (5'GAATTCG'3), so könnte das Cytosin methyliert sein. Damit würde diese Stelle von *Eco* RI nicht geschnitten werden, was zu einem Verlust der Bande führt.

d) Bereiche mit hohem Grad an genetischer Variabilität

Mit dem Bandentyp ‚polymorphe, nicht zur Unterscheidung geeignete Banden‘ könnten Bereiche des Genoms getroffen worden sein, die einen hohen Grad an genetischer Variabilität besitzen. Die Restriktionsenzyme *Eco* RI und *Mse* I schneiden aufgrund ihrer Erkennungssequenzen in A+T reichen Regionen des Genoms (YOUNG et al. 1999). Die erhaltenen AFLP-Fragmente können repetitive Sequenzen aufweisen (REAMON-BÜTTNER et al. 1999). REAMON-BÜTTNER et al. (1999) untersuchten die in *Asparagus officinalis* L. erhaltenen AFLP-Fragmente auf repetitive Sequenzen. Sie stellten fest, dass die von ihnen untersuchten Fragmente repetitive Sequenzen enthielten und damit zu Satellitenstrukturen gehörten, die über das Pflanzengenom verstreut liegen. Hydrolytische Deaminierung von 5' methyliertem Cytosin führt zur Konvertierung des Cytosins in Thymin und damit zu einer C/G zu T/A Transition (KOVAŘÍK et al. 1997). Somit könnte es zu einer Veränderung der Schnittstellen der Restriktionsenzyme kommen. Von CERVERA (pers. Mitteilungen) untersuchte SAMPL-Fragmente zeigten einen engen Zusammenhang zu Retrotransposons in der Rebe, die erstmals von BÖHM und ZYPRIAN (1998) erwähnt wurden. Die SAMPL-Methode zeigt hier mit 5,3 % einen um 3,5 % höheren Anteil an polymorphen, nicht zur Unterscheidung geeigneten Banden im Vergleich zur AFLP-Methode. Der Ausschluss dieses Bandentyps aus dem Dendrogramm basierend auf den SAMPL-Daten bewirkte, dass der Grad an genetischer Varianz geringer wurde. Die Klone der Unterlagssorte 5 C blieben von dieser Veränderung relativ unberührt. Bei der Unterlagssorte 5 BB waren nun zwischen 5 Klonen keine Unterscheidung mehr möglich, davor waren es 4 Klone. Bei SO 4 zeigten 4 Klone zusammen mit *Binova* keinen Unterschied im Bandenmuster.

Die AFLP-Methode wurde hier erstmals auf Unterlagsreben und ihre Klone angewendet. Generell ist die Anwendung der AFLP-Analyse auf Reben im Gegensatz zu den älteren Methoden noch nicht sehr verbreitet.

In der Literatur wird die AFLP-Analyse zur Differenzierung von Ertragsrebsorten eingesetzt. Die von CERVERA et al. (1998) untersuchten spanischen Ertragsrebsorten wiesen untereinander Ähnlichkeitsindices von 0,70-0,90 auf. Ab einem Index von 0,90 bis 1,00 wurden die Pflanzen als sortenzugehörig definiert.

Die innerhalb dieser Arbeit untersuchten Unterlagssorten zeigten Indices von 0,17 bis 0,44, die zu einer Sorte zugehörigen Klone 0,91 bis 1,0. Nur die 5 C Klone unterschieden sich diesbezüglich. Sie zeigten Werte von 0,88 bis 1,0.

Des Weiteren wurden mit Hilfe der AFLP-Methode phylogenetische Studien betrieben. So untersuchten SENSI et al. (1996) die genetische Diversität von 16 italienischen Ertragsrebsorten *Sangiovese* und *Colorino* mit acht verschiedenen AFLP Primerkombinationen und 5 ISTR (inverse sequence-tagged repeat analysis) Primer.

LABRA et al. (1999) klärten den Ursprung der italienischen Ertragsrebsorte *Ansonica* von der Insel Giglio mit Hilfe der AFLP- und SSR (simple sequence repeat)-Analysen. Es zeigte sich, dass diese Sorte ursprünglich von griechischen Sorten abstammte.

GOTO-YAMAMOTO (2000) untersuchte 6 asiatische, 6 nicht asiatische Ertragsrebsorten und 4 Wildreben mit Hilfe der AFLP auf ihre genetische Distanz. Sie gruppierten sich entsprechend ihrer Morphologie und geographischen Herkunft.

SAMPL-Analyse wurde in dieser Form bisher noch nicht an Unterlagsreben getestet. CERVERA et al. (unveröffentlicht) untersuchten mit dieser Methode spanische Ertragsrebsorten und verwendeten diese Methode zum Kartieren deren Genome.

Die AFLP- und SAMPL-Methode sind sehr gut zur Differenzierung von Unterlagssorten geeignet. Aufgrund der ausgeprägten Heterozygotie der Rebe zeigen sie große Divergenzen innerhalb der Rebengenome auf. Die hohe Sensitivität beider Methoden lässt den Schluss zu, dass nach entsprechender Optimierung beider Methoden für das Genom der Unterlagsreben eine Unterscheidung von Klonen möglich sein kann. In wie weit ‚Einzelbanden‘ tatsächlich charakteristisch für einen bestimmten Klon sind und genetische Unterschiede detektieren, muss in weiteren Arbeiten erst noch geprüft werden.

5. Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Rechenmodell sollte es ermöglichen, mit Hilfe der RAPD nicht nur Unterlagssorten zu differenzieren, sondern diese auch zu identifizieren. Das dargestellte Berechnungssystem müsste auf die Bandenmuster der übrigen 144 Unterlagssorten übertragen werden. Primer #751 produzierte keine einheitlichen Banden für alle untersuchten Sorten, die als Referenzbanden dienen könnten. Daher müssten die Unterlagssorten zu sinnvollen Gruppen zusammengefasst werden, damit Referenzbanden festgelegt werden könnten. Entsprechend der Vorversuchen arbeiten wäre es nötig, die entstehenden Referenzbanden zu prüfen, ob das an ihnen ausgerichtete Bandenmuster dem tatsächlichen Muster entspricht.

Die RAPD-Methode erreicht mit einer Nachweisgrenze von 10 % für Vermischungen eine noch zu hohe Fehlerquote von Fremdstöcken in Unterlagenholzbündeln. Ein anderer Ansatz für dieses Problem wäre, wenn eine bestimmte Vorstellung von der vermischten Sorte herrschte. Dann könnte mit Hilfe von sortenspezifischen Markern eine Verunreinigung durch eine bestimmte Unterlagssorte festgestellt werden. In wie weit sortenspezifische Marker Verunreinigungen unter 10 % nachweisen können, müsste erst noch geprüft werden.

Ausgehend von Dekamer Primern wurden 12er Primer untersucht. Darunter waren Primer, die für einzelne Unterlagssorten sortenspezifische Banden besaßen. Diese gilt es auszuschneiden und zu sortenspezifischen Markern (SCAR-Marker) umzuwandeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der AFLP- und SAMPL-Analyse erhaltenen ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘ und ‚Einzelbanden‘ ausgeschnitten. Im Folgenden müsste geprüft werden, in wie weit die ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘ tatsächlich in ihrer Sequenz bei allen übrigen Unterlagsklonen einer Sorte gleich sind. Unterlagssortenspezifische Marker können sehr nützlich sein für eine genetische Charakterisierung von Unterlagssorten. Speziell bei den ‚Einzelbanden‘ muss nachgeprüft werden, ob die erhaltene Sequenz tatsächlich spezifisch für diesen einen Klon ist, oder ob sie auch bei anderen noch nicht getesteten Klonen in Erscheinung tritt. Weiterhin müsste abgeklärt werden, inwieweit diese Bande innerhalb eines Klons stabil ist, das heißt, ob diese Bande auch bei anderen Pflanzen des gleichen Klons vorhanden ist. Diese ermittelten Sequenzen stellen die Basis für die zu synthetisierenden SCAR Marker dar. Diese könnten als Marker fungieren, um eine Identifizierung von Unterlagsklonen zu erreichen.

Somit könnten hoch informative PCR Marker entwickelt werden, die letztlich zur Evaluierung von Züchtungsmaterial dienen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Extraktion von DNA aus Reben dahingehend erweitert, dass aus jedem bei Unterlagen verfügbaren Pflanzenmaterial, Holz- und Wurzelmaterial DNA gewonnen werden konnte. Mit Hilfe von Oberflächensterilisierung und dem Entfernen der Rinde ist es gelungen, aus Wurzelmaterial DNA zu gewinnen, die in molekulargenetischen Untersuchungen eingesetzt werden kann.

Große Holzprobenvolumina konnten mit Hilfe eines Blenders zerkleinert und für die DNA-Extraktion aufgeschlossen werden. Vermischungen von Holz zweier unterschiedlicher Unterlagssorten konnten bis zu einer Grenze von 10 % durch die RAPD-Analyse nachgewiesen werden.

Der Einsatz von 12mer Primer, entstanden aus Primern, welche die 7 in Deutschland am häufigsten eingesetzten Unterlagssorten abtrennen konnten, lieferte im Vergleich zu den ursprünglichen Dekamer-Primern keine komplette Abtrennung der 7 Unterlagssorten. Für die 12er Primer, ausgehend von Primer #722, ergab sich, dass Primer #722b charakteristische Banden für *Börner* (1900 bp), *8 B* (1350 bp) und *3309 C* (785 bp) zeigte. Primer #722c wies für die Unterlagssorte *5 BB* eine charakteristische Bande (1760 bp) auf. Die 12er Primer, entstanden aus der Sequenz von Primer #726, ergaben keine verwertbaren Ergebnisse. Die 12er Primer, ausgehend von Primer #751, lieferten keine ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘. Primer #751b trennte die untersuchten Sorten bis auf *SO 4* und *125 AA* ab, Primer #751c konnte bis auf *5 BB* und *8 B* die restlichen Unterlagssorten differenzieren.

Untersuchungen zur Stabilität und Optimierung der RAPD-Analyse zeigten, dass mit Hilfe der Einstellung von RAMP-Zeiten das grundsätzliche Bandenmuster mit zwei verschiedenen Thermocyclern reproduzierbar war. Zudem zeigte die Untersuchung zur Veränderlichkeit der Muster durch verschiedene Herkünfte der Pflanzen, dass die Ergebnisse der RAPD-Analyse durch diesen Faktor nicht beeinflusst wurden.

Mit RAPD-Primer #751 wurden 151 verschiedene Unterlagssorten und Wildarten differenziert, 14 konnten nicht voneinander abgetrennt werden. Für folgende Unterlagssorten und Wildarten ergaben sich ‚Einzelbanden‘: *V. riparia Quebec A* (2760 bp), *V. riparia semis Oberlin* (2510 bp), *V. riparia splendens* (2470 bp), *V. riparia Montreal 2 NW 5158-37* (2450 bp), *V. riparia Montreal 5 NW 5258-11* (2410 bp), *Fercal Kl 242 Gm* (1930 bp), *V. riparai Klosterneuburg* (2260 bp), *41 B* (1910 bp), *Paulsen 779 E* (2140 bp), *V. cinerea Barret 9* (530 bp) und *V. slavinii Rhoeder* (490 bp). Innerhalb dieser Untersuchung konnte

auch zwischen den Unterlagssorten *Kober 5 BB* und *Teleki 5 A Goseck* differenziert werden.

Die Betrachtung des genetischen Zusammenhanges zwischen den 7 in Deutschland am häufigsten verwendeten Unterlagssorten bestätigte die Kreuzungsgruppe *V. berlandieri* x *V. riparia*. Die Nachkommen aus dieser Kreuzung, *5 BB*, *SO 4*, *5 C*, *125 AA* und *8 B*, bildeten ein Cluster.

Es wurde untersucht, in wie weit es möglich war, in der RAPD-Analyse entstandene Bandenmuster mathematisch auszudrücken und somit eine Identifikation der Sorten zu erreichen. Anhand der Unterlagssorten *5 BB*, *SO 4*, *5 C*, *125 AA*, *8 B*, *3309 C* und *Börner*, aufgetrennt in der RAPD-Analyse mit Primer #751, wurde ein solches Modell entwickelt. Dazu wurden durch eine lineare Transformation der Banden, ausgerichtet an einer Referenzbande unter Berücksichtigung der Bandenintensitäten, die Bandenmuster errechenbar. Die Sorten ließen sich durch ihre errechneten Banden voneinander unterscheiden. Die mathematisch dargestellten Muster der einzelnen Sorten deckten sich mit den tatsächlichen Bandenmustern.

Für die Untersuchung von genetischen Varianzen der Unterlagenklone der Sorten *5 BB*, *SO 4* und *5 C* sowie der Sorte *Binova* wurden die RAPD-, AFLP- und SAMPL-Methoden eingesetzt. Alle drei Methoden waren in der Lage, Varianzen nachzuweisen. Für AFLP- und SAMPL-Analyse wurde zwischen folgenden Bandentypen unterschieden: ‚Einzelbanden‘, ‚wiederholende Banden‘, ‚unterlagssortenspezifische Banden‘ und ‚polymorphe, nicht zur Unterscheidung geeignete Banden‘. Durch die ‚unterlagssortenspezifischen Banden‘ trennten sie die drei Sorten voneinander ab. ‚Einzelbanden‘ traten für folgende Klone auf:

AFLP: *5 BB Kl 137 WZ*, *5 C Kl 6-4-22 Gm*, *5 C Kl 6-22 Gm*, *5 BB Kl 13-45-5 Gm*, *5 BB Kl 13-44-3 Gm*, *5 BB Kl 276 INRA*, *5 C Kl 10-48-49 Gm*, *5 C Kl 10-49 Gm*, *5 C Kl 6-13 Gm*, *5 C Kl 6-16 Gm*, *SO 4 Kl 47-7Gm*

SAMPL: *SO 4 Kl 47-7 Gm*, *5 C Kl 10-48-49 Gm*, *5 BB Kl 13-11 Gm*, *5 C Kl 6-22 Gm*, *SO 4 Kl SICA ANTAV*, *5 BB Kl 13-45-5 Gm*, *5 C Kl 6-22 Gm*

Bei diesen Untersuchungen zeigten die Klone der Unterlagssorte *5 C* die größte genetische Varianz.

Binova ließ sich von einem Teil der *SO 4* Klone durch den Bandentyp ‚wiederholende Banden‘ abtrennen. Die Stellung dieser Sorte im Cluster der Unterlagssorte *SO 4* unterstützte die Aussage, dass es sich bei dieser Sorte um eine mutierte Form der *SO 4* handelt.

7. Literatur

- Al-Zahim, M.A., Ford-Lloyd, B.V. und Newbury, H.J. (1999): Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep.* 18: 473-477.
- Autio, W.E., Schupp, J.R., Ferree, D.C., Glavin, R. und Mulcahy, D.L. (1998): Application of RAPDs to DNA extracted from apple rootstocks. *Hort. Science* 33: 333-335.
- Banerjee, H., Pai, R.A. und Sharma, R.P. (1999): Restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of chickpea accessions. *Biol. Plan.* 42: 197-208.
- Barcaccia, G., Albertini, E. und Falcinelli, M. (1999): AFLP fingerprinting in *Pelargonium peltatum*: Its development and potential in cultivar identification. *J. Hort. Sci. Biotechnology* 74: 243-250.
- Barker, J.H.A., Matthes, M. und Arnold, G.M. (1999): Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. *Genome* 42: 173-183.
- Bauer, F. und Zyprian, E. (1997): Identification of grapevine rootstock cv. Börner and differentiation of 125 AA from 5 BB and SO 4. *Vitis* 36: 185-189.
- Becker, H. (1980): Vine improvement and clonal selection in Germany. *Austr. Grape-grower Winemaker, Ann. Tech. Issue* 196: 69-80.
- Beckmann, J.S. und Soller, M. (1983): Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 35-43.
- Bobowski, B.R., Hole, D., Wolf, G. und Bryant, L. (1999): Identification of roots of woody species using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. *Mol. Ecol.* 8: 485-491.
- Böhm, A. und Zyprian, E. (1998): RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant Retrotransposons. *Plant Cell Reports* 17: 415-421.
- Bourquin, J.-C., Otten, L. und Walter, B. (1991): Identification of grapevine rootstocks by RFLP. *C. R. Acad. Sci. Paris* 312: 593-598.
- Bourquin, J.-C., Tournier, P., Otten, L. und Walter, B. (1992): Identification of sixteen rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. *Vitis* 31: 157-162.
- Bourquin, J.-C., Sonko, A., Otten, L. und Walter, B. (1993): Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 87: 431-438.

- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R. und Meredith, C.P. (1996) : Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39: 628-633.
- Bradley, K.F., Rieger, M.A. und Collins, G.G. (1996): Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Austr. J. Exp. Agri.* 36: 613-618.
- Bregitzer, P., Halbert, S.E. und Lemaux, P.G. (1998): Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 421-425.
- Bundessortenamt (2000): Beschreibende Sortenliste, Reben. Landbuch Verlagsgesellschaft mbH: 98 ff.
- Bundesverband der Rebenpflanzguterzeuger pers. Mitteilungen.
- Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S. und Peacock, W.J. (1993): DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 287-291.
- Büscher, N., Zyprian, E. und Blaich, R. (1993): Identification of grapevine cultivars by DNA analysis: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. *Vitis* 32: 15-17.
- Büscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O. und Blaich, R. (1994): On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis* 33: 15-17.
- Caetano-Anollés, G. (1998): DNA analysis of turfgrass genetic diversity. *Crop Sci.* 38: 1415-1424.
- Caicedo, A.L., Gaitán, E., Duque, M.C., Toro Chica, O., Debouck, D.G. und Tohme, J. (1999): AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Sci.* 39: 1497-1507.
- Cao, W., Hucl, P., Scoles, G. und Chibbar, R.N. (1998): Genetic diversity within spelta and macha wheats based on RAPD analysis. *Euphytica* 104: 181-189.
- Carlson, J.E., Tulsieram, L.K., Glaubitz, J.C., Luk, V.W.K., Kauffeldt, C. und Rutledge, R. (1991): Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of cornifers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 194-200.
- Cervera, M.-T., Gusmao, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Vanden Broeck, A., Van Montagu, M. und Boerjan, W. (1996): Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.* 93: 733-737.
- Cervera, M.-T., Cabezas, J.A., Sancha, J.C., Martínez de Toda, F. und Martínez-Zapater, J.M. (1998) : Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.* 97: 51-59.

Cervera, M.-T., persönliche Mitteilungen.

Chaparro, J.X., Werner, D.J., O'Malley, D. und Sederoff, R.R. (1994): Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.* 87: 805-815.

Chen, L.-F.O., Kuo, H.-Y., Chen, M.-H., Lai, K.-N. und Chen, S.-C.G. (1997): Reproducibility of the differential amplification between leaf and root DNAs in soybean revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1033-1043.

Collins, G.G. und Symons, R.H. (1993): Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 105-112.

Conner, P.J., Brown, S.K. und Weeden, N.F. (1997): Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 350-359.

Corrêa, R.X., Costa, M.R., Good-God, P.I., Ragagnin, V.A., Faleiro, F.G., Moreira, M.A. und de Barros, E.G. (2000): Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. *Crop Sci.* 40: 804-807.

Debener, T., Bartels, C. und Mattiesch, L. (1996): RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Mol. Breed.* 2: 321-327.

Demeke, T., Adams, R.P. und Chibbar, R. (1992): Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 990-994.

Devanand, P.S., Wan, J., Rangaswamy, M. und Ikehashi, H. (1999): Isozyme divergence between maintainers and restorers in hybrid rice breeding programs in India. *Crop Sci.* 39: 831-835.

Devos, K.M. und Gale, M.D. (1992): The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.

Duarte J.M., dos Santos, J.B. und Melo, L.C. (1999): Genetic divergence among common bean cultivars from different races based on RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.* 22: 419-426.

Dümmler, A. (1922): *Der Weinbau mit Amerikanerreben*. Selbstverlag des Verfassers.

Echt, C.S., May-Marquardt, P., Hseih, M. und Zahorchak, R. (1996): Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39: 1102-1108.

Eimert, K. persönliche Mitteilungen 1996.

Ellis, R.P., McNicol, J.W., Baird, E., Booth, A., Lawrence, P., Thomas, B. und Powell, W. (1997): The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breed.* 3: 359-369.

- Fanizza, G., Colonna, G., Resta, P. und Ferrara, G. (1999): The effect of the number of RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*. *Euphytica* 107: 45-50.
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W. und Roose, M.L. (1998): Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96: 812-822.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. und Dennis, E.S. (2000): DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 217-223.
- Fowler, J.C.S., Kijas, J.M.K., Thomas, M.R. (1994): Current molecular methods for plant genome identification. *Austr. Biotechnology* 4: 153-157.
- Fourré, J.-L., Berger, P., Niquet, L. und André, P. (1997): Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Genet.* 94: 159-169.
- Galet, P. (1988): Cépages et vignobles de France. Tome 1 Les vignes Americaines. (2nd Edition). Imprimerie Paul Déhan, Montpellier: 246 ff.
- Gerlach, H.K. und Stösser, R. (1997): Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angew. Bot.* 71: 212-218.
- Geuna, F., Scienza, A. und Hartings, H. (2000): Discrimination of clones of *Vitis vinifera* L. based on the polymorphism of stilbene synthase-chalcone synthase 5'untranslated genomic regions. *Acta Hort.* 528: 257-261.
- Gogorcena, Y., Arulsekar, S., Dandekar, A.M. und Parfitt, D.E. (1993): Molecular markers for grape characterization. *Vitis* 32: 183-185.
- Goto-Yamamoto, N. (2000): Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis. *Breed. Science* 50: 53-57.
- Grando, M.S., De Micheli, L., Biasetto, L. und Scienza, A. (1995): RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. *Vitis* 34: 37-39.
- Grando, M.S., De Micheli, L. und Scienza, A. (1996): Characterization of *Vitis* germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. *Gen. Res. Crop Evol.* 43: 187-192.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H. und Razin, A. (1981): Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292: 860-862.
- Guerra, B. und Meredith, C.P. (1995): Comparison of *Vitis Berlandieri* x *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis* 34: 109-112.
- Harding, K. und Roubelakis-Angelakis, K.A. (1994): The isolation and purification of DNA from *Vitis vinifera* L. plants and *in vitro* cultures. *Vitis* 33: 247-248.

- Hicks, M., Adams, D., O'Keefe, S., Macdonald, E. und Hodgetts, R. (1998): The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*). *Genome* 41: 797-805.
- Hsieh, C. (2000): Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 224-228.
- Hurme, P. und Savolainen, O. (1999): Comparison on homology and linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers between individual trees of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Mol. Ecol.* 8: 15-22.
- Hüttel, B., Winter, P., Weising, K., Choumane, W., Weigand, F. und Kahl, G. (1999): Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 42: 210-217.
- Ingle, K. (1993): DNA extraction from plants of *Arabidopsis thaliana*, in David Flanders and Caroline Dean (Eds.) *Arabidopsis: The compleat guide*. Electronic version 1.4. John Innes Centre for Plant research, Norwich, UK: 68-69. (<http://www.arabidopsis.org/comguide.html>).
- Jenczewski, E., Prosperi, J.M. und Ronfort, J. (1999): Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Mol. Ecol.* 8: 1317-1330.
- Jianhua, Z., McDonald, M.B. und Sweeney, P.M. (1996): Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from seeds of differing soybean and maize genotypes. *Seed Sci. Technol.* 24: 513-522.
- Jianhua, Z., McDonald, M.B. und Sweeney, P.M. (1996): Soybean cultivar identification using RAPD. *Seed Sci. Technol.* 24: 589-592.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C., Brede-meijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., und Karp, A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390.
- Joyce, T.A., Abberton, T.M., Michaelson-Yeates, T.P.T., Forster, J.W. (1999): Relationships between genetic distance measured by RAPD-PCR and heterosis in inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica* 107: 159-165.
- Karagiannidis, N., Velemis, D. und Stavropoulos, N. (1997): Root colonization and spore population by VA-mycorrhizal fungi in four grapevine rootstocks. *Vitis* 36: 57-60.
- Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S. und Thomas, M.R. (1995): An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome* 38: 349-355.
- Kirchner-Ness, R. pers. Mitteilungen 2000.

- Klein-Lankhorst, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. und Zabel, P. (1991): Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.
- Konrad, H. persönliche Mitteilungen 2000.
- Kovařík, A., Matyášek, R., Leitch, A., Gazdová, B., Fulneček, J. und Bezděk, M. (1997): Variability in CpNpG methylation in higher plant genomes. *Gene* 204: 25-33.
- Labra, M., Failla, O., Fossati, T., Castiglione, S., Scienza, A. und Sala, F. (1999): Phylogenetic analysis of grapevine cv. Ansonica growing on the island of Giglio, Italy by AFLP, and SSR markers. *Vitis* 38: 161-166.
- Lin, H. und Walker, A. (1997): Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *Hort. Science* 32: 1264-1266.
- Ling, J.-T., Sauve, R. und Gawel, N. (1997): Identification of poinsettia cultivars using RAPD markers. *Hort. Science* 32: 122-124.
- Linz, U. und Degenhardt, H. (1990): Die Polymerase-Kettenreaktion. *Naturwissenschaften* 77: 515-530.
- Liu, Z. und Furnier, G.R. (1993): Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87: 87-97.
- Lodhi, M.A., Ye, G.-N., Weeden, N.F. und Reisch, B.I. (1994): A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 6-13.
- Lodhi, M.A. und Reisch, B.I. (1995): Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the Vitaceae. *Theor. Appl. Genet.* 90: 11-16.
- Lübberstedt, T., Melchinger, A.E., Dußle, C., Vuylsteke, M. und Kuiper, M. (2000): Relationships among early European maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD, and pedigree data. *Crop Sci.* 40: 783-791.
- Mauro, M.-C., Strefeler, M., Weeden, N.F. und Reisch, B.I. (1992): Genetic analysis of restriction fragment length polymorphisms in *Vitis*. *J. Heredity* 83: 18-21.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T. und Blair, M. (1997): Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35: 89-99.
- McGrath, J.M., Derrico, C.A. und Yu, Y. (1999): Genetic diversity in selected, historical US sugarbeet germplasm and *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Theor. Appl. Genet.* 98: 968-976.

- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. und Waugh, R. (1997): Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3: 127-136.
- Mohr, H.D. (1993): Mykorrhiza bei Reben: Eine Lebensgemeinschaft mit Perspektiven. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch*, 44: 133-148.
- Moog, H. (1957): Einführung in die Rebensortenkunde. Verlag Eugen Ulmer.
- Mulcahy, D.L., Cresti, M., Linskens, H.F., Intrieri, C., Silvestroni, O., Vignani, R. und Pancaldi, M. (1995): DNA fingerprinting of italian grape varieties: a test of reliability in RAPDs. *Adv. Hort. Sci.* 9: 185-187.
- Muluvi, G.M., Sprent, J.I., Soranzo, N., Provan, J., Odee, D., Folkard, G., McNicol, J.W. und Powell, W. (1999): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Mol. Ecol.* 8: 463-470.
- Nilsson, M. (2001): The use of RAPD and AFLP genetic markers to distinguish clones of grapevine (*Vitis*) rootstocks. Swedish University of Agricultural Sciences. ISSN 1403-0993.
- Nkongolo, K.K. (1999): RAPD and cytological analyses of *Picea* spp. From different provenances: genomic relationships among taxa. *Hereditas* 130: 137-144.
- Ortlieb, C. (1999): Untersuchungen zur Sortenunterscheidung von Unterlagen an Holz und Wurzel. Diplomarbeit Fachhochschule Geisenheim.
- Palacios, C., Kresovich, S. und González-Candelas, F. (1999): A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Mol. Ecol.* 8: 645-657.
- Paglia, G. und Morgante, M. (1998): PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Mol. Breed.* 4: 173-177.
- Papa, R., Attene, G., Barcaccia, G., Ohgata, A. und Konishi, T. (1998): Genetic diversity in landrace populations of *Hordeum vulgare* L. from Sardinia, Italy, as revealed by RAPDs, isozymes and morphological traits. *Plant Breed.* 117: 523-530.
- Paran, I. und Michelmore, R.W. (1993): Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Parfitt, D.E. und Arulsekhar, S. (1989): Inheritance and isoenzyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 486-491.
- Park, Y.-D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M. und Matzke, M.A. (1996): Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant Journal* 9: 183-194.

- Petgen, M., Schropp, A., George, E. und Römheld, V. (1998): Einfluss unterschiedlicher Inokulationstiefen mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* auf die Mykorrhizierung bei Reben (*Vitis* sp.) in Wurzelbeobachtungskästen. *Vitis* 37: 99-105.
- Poulsen, D.M.E., Henry, R.J., Johnston, R.P., Irwin, J.A.G. und Rees, R.G. (1995): The use of bulked segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 91: 270-273.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. und Rafalski, A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Qu, X., Lu, J. und Lamikanra, O. (1996): Genetic diversity in Muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 1020-1023.
- Reamon-Büttner, S.M., Schmidt, T. und Jung, C. (1999): AFLPs represent highly repetitive sequences in *Asparagus officinalis* L. *Chromosome Res.* 7: 297-304.
- Regner, F. und Messner, R. (1993): Molekulare Differenzierung von Rebsorten mittels RAPD-Analyse. *Mitt. Klosterneuburg* 43: 160-164.
- Regner, F., Steinkellner, H., Turetschek, E., Stadlhuber, A., Glössl, J. (1996): Genetische Charakterisierung von Rebsorten (*Vitis vinifera*) durch Mikrosatelliten-Analyse. *Mitt. Klosterneuburg* 46: 52-62.
- Regner, F., Stadlbauer, A., Kaserer, H. und Eisenheld C. (1998): Evaluierung von Burgunder-Klonen unter agrarischen und genetischen Aspekten. *Mitt. Klosterneuburg* 48: 193-202.
- Regner, F., Stadlbauer, A., Eisenheld, C. und Kaserer, H. (2000): Genetic relationship among Pinots and related cultivars. *Am. J. Enol. Vitc.* 51: 7-14.
- Richards, E.J. (1997): DNA methylation and plant development. *Trends Genet.* 13: 319-323.
- Ries pers. Mitteilungen.
- Ruas, P.M., Bonifacio, A., Ruas, C.F., Fairbanks, D.J. und Andersen, W.R. (1999): Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). *Euphytica* 105: 25-32.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): Molecular cloning – A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. ISBN 0-87969-309-6.

- Sánchez-Escribano, E.M., Martín, J.P., Carreno, J. und Cenis, J.L. (1999): Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. *Genome* 42: 87-93.
- Schneider, S., Reustle, G. und Zyprian, E. (1996): Detection of somaclonal variation in grapevine regenerants from protoplasts by RAPD-PCR. *Vitis* 35: 99-100.
- Schöffling, H. und Stellmach, G. (1993): Klon-Züchtung bei Weinreben in Deutschland: Von der antiken Auslesevermehrung bis zur systematischen Erhaltungszüchtung. Waldkircher Verlag.
- Sefc, K.M., Steinkellner, H., Wagner, H.W., Glössl, J. und Regner, F. (1997): Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis* 36: 179-183.
- Sensi, E., Vignani, R., Rhode, W. und Biricolti, S. (1996): Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35: 183-188.
- Shimada T., Shiratori, T., Hayama, H., Nishimura, K., Yamaguchi, M und Yoshida, M. (1999): Genetic diversity of cherries characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Japa. Soc. Hort. Sci.* 68: 984-986.
- Silvestroni, O., Di Pietro, D., Intriari, C., Vignani, R., Filippetti, I., Del Casino, C., Scali, M. und Cresti, M. (1997): Detection of genetic diversity among clones of cv. Fontana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. *Vitis* 36: 147-150.
- Skov, E. (1998): Are RAPD-markers reproducible between different laboratories? *Silvae Gen.* 47: 283-287.
- Sneath, P.H.A. und Sokal, R.R. (1973): The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman, San Francisco.
- Spada, A., Caporali, E., Marziani, G., Portaluppi, P., Restivo, F.M., Tassi, F. und Falavigna, A. (1998): A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1083-1089.
- Sun, G.-L., Díaz, O., Salomon, B. und von Bothmer, R. (1999): Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers. *Genome* 42: 420-431.
- Stavrakakis, M.N. und Biniari, K. (1998): Genetic study of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 37: 119-122.
- Striem, M.J., Ben-Hayyim, G. und Spiegel-Roy, P. (1994): Developing molecular genetic markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedures. *Vitis* 33: 53-54.
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J.M. und Charrier, A. (1999): Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98: 171-177.

- This, P., Cuisset, C. und Boursiquot, J.M. (1997): Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 492-501.
- Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P. und Scott, N.S. (1993): Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 86: 173-180.
- Thomas, M.R. und Scott, N.S. (1993): Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as a sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.
- Thomas, M.R., Cain, P. und Scott, N.S. (1994): DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* 25: 939-949.
- Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G. und Osborn, T.C. (1994): Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88: 973-980.
- Tschammer, J. und Zyprian, E. (1994): Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis* 33: 249-250.
- Vidal, J.R., Moreno, S., Masa, A. und Ortiz, J.M. (1998): Study of the genetic homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isozyme and RAPD markers. *Vitis* 37: 145-146.
- Vidal, J.R., Coarer, M. und Defontaine, A. (1999): Genetic relationship among grapevine varieties grown in different French and Spanish regions based on RAPD markers. *Euphytica* 109: 161-172.
- Vogel, J. pers. Mitteilungen.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. und Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Walker, M.A. und Boursiquot, J.M. (1992): Ampelographic and Isozyme data correcting the misnaming of the grape rootstock SO 4 at the University of California, Davies. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 261- 265.
- Walker, M.A. und Liu, L. (1995): The use of isozymes to identify 60 grapevine rootstocks (*Vitis* spp.). *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 299-305.
- Walters, T.W. und Posluszny, U. (1989): Isozyme analysis of the grape (*Vitis*). I. A practical solution. *Can. J. Bot.* 67: 2894-2899.
- Weeden, N.F., Reisch, B.I. und Martens, M.-H.E. (1988): Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 765-769.

- Welsh, J. und McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Welsh, J. und McClelland, M. (1991): Genomic fingerprinting using arbitrary primers PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nuc. Acids Res.* 19: 5275-5279.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. und Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Reiter, R.S., Young, R.M. und Scolnik, P.A. (1993): Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nuc. Acids Res.* 21: 2697-2702.
- Winter, P. und Kahl, G. (1995): Molecular marker technologies for plant improvement. *World J. Microb. Biotechnology* 11: 438-448.
- Wolf, T. (1996): Untersuchungen an Holz zur Sortenidentifikation von Rebuterlagssorten mit Hilfe der RAPD-Methode. *Joh. Gutenberg Univ. Mainz*.
- Wolf, T., Eimert, K. und Ries, R. (1999): Reliable identification of grapevine rootstock varieties using RAPD PCR on woody samples. *Austr. J. Grape Wine Res.* 5: 34-38.
- Wolf, T., Eimert, K., Ries, R. und Rühl, E.H. (2000): Differentiation of grapevine rootstock varieties using RAPD-PCR. 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenologie, Melbourne, Victoria, Australia.
- Wolf, T., Ortlieb, C., Eimert, K. und Ries, R. (2000): Routine extraction of DNA from grapevine (*Vitis* ssp.) canes and roots for variety identification by RAPD-PCR. International Symposium on Molecular Markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in horticulture, ISHS, Montpellier, France, in press.
- Wong, H.-L., Yeoh, H.-H. und Lim, S.-H. (1999): Customisation of AFLP analysis for cassava varietal identification. *Phytochemistry* 50: 919-924.
- Wu, K.-S. und Tanksley, S.D. (1993): Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235.
- Xiong, L.Z., Xu, C.G., Saghai Maroof, M.A. und Zhang, Q. (1999): Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.* 261: 439-446.
- Xu, H., Wilson, D.J., Arulsekhar, S. und Bakalinsky, A.T. (1995): Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 714-720.
- Xu, H. und Bakalinsky, A.T. (1996): Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *Hort Sci.* 31: 267-268.

- Yamamoto, N., Ono, G., Takashima, K. und Totsuka, A. (1991): Restriction fragment length polymorphisms of grapevine DNA with phenylalanine ammonia-lyase cDNA. *Japan. J. Breed.* 41: 365-368.
- Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R. und Lumpkin, T.A. (1999): Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39: 268-275.
- Young, W.P., Schupp, J.M. und Keim, P. (1999): DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor. Appl. Genet.* 99: 785-790.
- Zhu, J., Gale, M.D., Quarrie, S., Jackson, M.T. und Bryan, G.J. (1998): AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor. Appl. Genet.* 96: 602-611.

8. Anhang

	Banden Total	Polymorphe Banden	Unterlagssorten spez. Banden	Einzelbanden	Wiederholende Banden	Polymorphe Banden Nicht zur Unterscheidg. geeignet
Banden Total	560	140 25%	101 18,04%	32 5,71%	7 1,25%	20 3,57%
AFLP	277	67 24,19%	45 16,25%	19 6,86%	3 1,1%	5 1,81%
G 24	63	16 25,4%	11 20,75%	4 6,35%	1 1,59%	0
G 29	51	3 5,88%	1 1,96%	1 1,96%	1 1,96%	1 2,56%
G 30	76	26 34,2%	16 21,05%	9 11,8%	1 1,32%	3 3,95%
G 31	87	22 25,29%	17 19,77%	5 5,75%	0	1 1,15%
SAMPL	283	73 25,8%	56 19,79%	13 4,5%	4 1,41%	15 5,3%
SAMPL 1	57	19 33,3%	17 29,8%	2 3,5%	0	1 1,75%
E+AC	53	12 22,6%	6 11,3%	5 9,43%	1 1,89%	2 3,78%
E+AG	77	14 18,18%	12 21,05%	2 2,6%	0	3 3,9%
SAMPL 2	96	28 29,16%	21 21,88%	4 4,17%	3 3,13%	9 9,38%

Tab. I: Ergebnisse zur Unterscheidung der Unterlagssorten und deren Klone mit der AFLP- SAMPL-Analyse

	Banden Total	Polymorphe Banden	Unterlagssorten spez. Banden	Einzelbanden	Wiederholende Banden	Polymorphe Banden Nicht zur Unterscheidg. geeignet
Banden Total	560	140 25%	101 18,04%	32 5,71%	7 1,25%	20 3,57%
AFLP Total	277	67 24,19%	45 16,24%	19 6,86%	3 1,1%	5 1,81%
G 24	63	16 25,4%	SO 4 3 5 BB 5 5 C 3	SO 4 0 5 BB 2 5 C 2	SO 4 0 5 BB 0 5 C 1	0
G 29	51	3 5,88%	SO 4 1 5 BB 0 5 C 0	SO 4 0 5 BB 1 5 C 0	SO 4 0 5 BB 0 5 C 1	1 1,96%
G 30	76	26 34,2%	SO 4 2 5 BB 13 5 C 2	SO 4 0 5 BB 4 5 C 5	SO 4 0 5 BB 1 5 C 0	3 3,95%
G 31	87	22 25,29%	SO 4 2 5 BB 13 5 C 2	SO 4 3 5 BB 0 5 C 2	SO 4 0 5 BB 0 5 C 0	1 1,15%
SAMPL Total	283	73 25,8%	56 19,79%	13 4,5%	4 1,41%	15 5,3%
E+AC	57	19 33,3%	SO 4 2 5 BB 13 5 C 2	SO 4 2 5 BB 0 5 C 0	SO 4 0 5 BB 0 5 C 0	1 1,75%
E+AG	53	12 22,6%	SO 4 2 5 BB 3 5 C 1	SO 4 1 5 BB 0 5 C 4	SO 4 0 5 BB 1 5 C 0	2 3,78%
E+AC	77	14 18,18%	SO 4 4 5 BB 3 5 C 5	SO 4 0 5 BB 1 5 C 1	SO 4 0 5 BB 0 5 C 0	3 3,9%
E+AG	96	28 29,16	SO 4 13 5 BB 5 5 C 3	SO 4 1 5 BB 1 5 C 2	SO 4 0 5 BB 1 5 C 2	9 9,38%

Tab. II: Ergebnisse zur Unterscheidung der Unterlagssorten und deren Klone mit der AFLP- SAMPL-Analyse

Tab. III: Darstellung der Ähnlichkeitsindices der 151 untersuchten Unterlagssorten und Genotypen berechnet nach DICE.

Abb. I: Dendrogramm der 151 untersuchten Unterlagssorten und Genotypen, basierend auf den RAPD-Daten, berechnet nach DICE und dargestellt mit Hilfe von UPGMA.

	<i>V. solonis</i> Richter				
<i>V. solonis</i> Richter	1	127 BB			
127 BB	0,7272727	1	Baco 22 A		
Baco 22 A	0,6666667	0,7692308	1	208 G	
208 G	0,5	0,4615385	0,5714286	1	199 G
199 G	0,5454545	0,5	0,4615385	0,4615385	1
Oberlin 604	0,6666667	0,6153846	0,7142857	0,5714286	0,7692308
<i>V. rip.</i> du terroire	0	0	0	0	0
<i>V. rip.</i> 5016 Californien	0,8	0,7272727	0,6666667	0,5	0,5454545
3309 C	0,7272727	0,6666667	0,6153846	0,4615385	0,5
1103 Paulsen Kl. 9	0,5	0,4615385	0,5714286	0,5714286	0,3076923
<i>V. rip.</i> grand feuille	0,7272727	0,6666667	0,7692308	0,6153846	0,5
162 Kl 38 Gm	0,8	0,7272727	0,6666667	0,5	0,5454545
Seibel 867	0,6	0,5454545	0,5	0,6666667	0,5454545
<i>V. solonis longii</i> Prince	0,3333333	0,3076923	0,5714286	0,4285714	0,3076923
<i>V. rup.</i> Dieffenbach	0,4	0,375	0,5882353	0,4705882	0,25
<i>V. rip.</i> Quebec 3	0,5454545	0,5	0,6153846	0,6153846	0,5
<i>V. slavinii</i> Rhoeder	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,5333333
Binova	0,5714286	0,6666667	0,75	0,5	0,4
SO 4	0,5714286	0,6666667	0,75	0,5	0,4
71 B	0,5333333	0,625	0,8235294	0,4705882	0,375
<i>V. slavinii</i> Rochester	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,3529412
<i>V. Thunbergii</i>	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,5
<i>V. rip.</i> grand glabre	0,3333333	0,3076923	0,4285714	0,4285714	0,3076923
Tel C	0,4615385	0,4285714	0,5333333	0,4	0,2857143
Dr. Decker rebe	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,5333333	0,4285714
Tel 5 A Goseck	0,5	0,5882353	0,6666667	0,5555556	0,3529412
Na 1201-10	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,5882353
<i>V. rip.</i> Trier	0,6666667	0,6153846	0,7142857	0,5714286	0,4615385
159 G	0,4615385	0,4285714	0,4	0,4	0,2857143
125 AA	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,4285714
Sori F2	0,5	0,4615385	0,5714286	0,5714286	0,4615385
Tel 52 A	0,5333333	0,625	0,7058824	0,4705882	0,375
75 BB	0,5333333	0,625	0,7058824	0,4705882	0,375

<i>V. arizonica</i>	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,5
<i>Oberlin 605</i>	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,5333333	0,4285714
<i>V. rip. sauvage</i>	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,4
<i>V. coignetia</i>	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,4
<i>V. rip. Pailleres</i>	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,4
<i>2 Ganzin</i>	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,5333333	0,4285714
<i>101-14 Kl. 8</i>	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,4
<i>V. rip. rouge pub.</i>	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
<i>V. rip. Montr. 1NW 5058-12</i>	0,4705882	0,4444444	0,5263158	0,4210526	0,3333333
<i>209 G</i>	0,5714286	0,5333333	0,625	0,625	0,4
<i>V. rip. Montr. Fr.</i>	0,2666667	0,25	0,3529412	0,3529412	0,375
<i>V. rip. Quebec 1NW</i>	0,3076923	0,2857143	0,4	0,4	0,2857143
<i>V. rip. 64G</i>	0,3076923	0,2857143	0,4	0,4	0,2857143
<i>V. rip. 68G</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,5714286
<i>V. rip Urbana 2NW 4858-11</i>	0,2857143	0,2666667	0,5	0,375	0,2666667
<i>V. rip. 183G</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,4285714
<i>V. rip. 75G</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,4285714
<i>V. rip. Montr. 2NW 5158-11</i>	0,2666667	0,375	0,5882353	0,3529412	0,25
<i>V. rip. Quebec 2</i>	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,5333333	0,4285714
<i>88G</i>	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
<i>V. cin. New York</i>	0,4705882	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,3333333
<i>V. novae anglicae Rochester</i>	0,2857143	0,2666667	0,375	0,375	0,2666667
<i>V. rip. Geneva 04</i>	0,2666667	0,25	0,3529412	0,3529412	0,375
<i>V. cin. 5015</i>	0,1333333	0,125	0,2352941	0,2352941	0,125
<i>V. rip. Montr. 2NW 5158-30</i>	0,2352941	0,2222222	0,3157895	0,3157895	0,3333333
<i>109-4 C</i>	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,4705882
<i>V. rip. Montr. 1NW 5058-8</i>	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
<i>68B</i>	0,6153846	0,7142857	0,6666667	0,4	0,4285714
<i>Barret 503</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,5714286
<i>1616C</i>	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,5333333	0,5714286
<i>4 A Teleki</i>	0,5714286	0,5333333	0,5	0,375	0,6666667
<i>V. rip. 80G</i>	0,6666667	0,6153846	0,5714286	0,4285714	0,4615385
<i>V. amurensis</i>	0,5	0,4615385	0,5714286	0,5714286	0,4615385
<i>174G</i>	0,5	0,4615385	0,5714286	0,5714286	0,4615385
<i>66G</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,5333333	0,5714286

<i>V. cordifolia</i>	0,375	0,3529412	0,4444444	0,4444444	0,4705882
141G	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,5714286
<i>V. rip. Alberta Fr</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,4285714
<i>V. rip. pub. Typ Börner</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,4285714
<i>V. rip. Gloire de Montpellier</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,5333333	0,4285714
<i>V. rip. 78G</i>	0,4285714	0,2666667	0,375	0,375	0,2666667
316 Gm	0,4285714	0,4	0,5	0,5	0,5333333
<i>V. novo mexicana</i>	0,4	0,375	0,4705882	0,4705882	0,375
1616Tr	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,5333333
<i>V. berlandieri</i>	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,4
8B	0,6666667	0,5	0,5882353	0,4705882	0,5
Tel 19C	0,5	0,5882353	0,6666667	0,5555556	0,3529412
<i>V. rip. Mandan</i>	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4	0,5714286
Na 61-99	0,4285714	0,2666667	0,375	0,375	0,2666667
<i>V. rip. Baron Perrier</i>	0,4	0,375	0,3529412	0,3529412	0,375
Masannes	0,5714286	0,5333333	0,5	0,375	0,6666667
<i>V. rup. du Lot</i>	0,4444444	0,4210526	0,5	0,4	0,4210526
23G	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,5
<i>V. cin. Barret 1</i>	0,2857143	0,4	0,375	0,375	0,2666667
Na 5024-9	0,7142857	0,5333333	0,625	0,5	0,4
99 Richter	0,4	0,5	0,7058824	0,4705882	0,375
67B	0,5333333	0,625	0,5882353	0,4705882	0,375
Na 5024-15	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,5333333
Cina	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
Rici	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
Na 5153-48	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,5333333
Na 5004-846	0,1333333	0,125	0,3529412	0,2352941	0,125
<i>V. rip. 1G</i>	0,6666667	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
Na 5153-76	0,4615385	0,4285714	0,4	0,2666667	0,2857143
<i>V. cin. Missouri</i>	0,4	0,375	0,4705882	0,3529412	0,25
<i>V. cin. Arnold</i>	0,3333333	0,4210526	0,5	0,3	0,2105263
Börner	0,4285714	0,4	0,5	0,375	0,2666667
Sori	0,5333333	0,5	0,4705882	0,3529412	0,375
<i>V. cin. Barret 9</i>	0,375	0,4705882	0,4444444	0,4444444	0,3529412
420A	0,375	0,4705882	0,4444444	0,4444444	0,3529412

<i>V. andersonii</i> Rochester	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,5
<i>V. berlandieri</i> Resseguier	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,3529412
Tel 112 D	0,4705882	0,4444444	0,5263158	0,5263158	0,3333333
Tel 9BB	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,4705882
5C	0,5	0,5882353	0,5555556	0,3333333	0,3529412
5BB	0,5333333	0,5	0,4705882	0,3529412	0,375
<i>V. rip.</i> 1G Engers	0,25	0,3529412	0,4444444	0,3333333	0,2352941
161-49C	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,4705882
<i>V. rip.</i> 179G	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,4705882
<i>V. vulpina</i> Linne	0,4444444	0,4210526	0,5	0,4	0,5263158
Na 162-35	0,4444444	0,4210526	0,5	0,4	0,5263158
110 Richter	0,4444444	0,4210526	0,5	0,4	0,4210526
<i>V. cin.</i> Illinois	0,4444444	0,4210526	0,5	0,4	0,3157895
Oh Budo	0,3076923	0,2857143	0,4	0,4	0,2857143
1202C	0,6666667	0,6153846	0,5714286	0,4285714	0,4615385
143A	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
157G	0,4705882	0,5555556	0,6315789	0,4210526	0,5555556
Na 5162-98	0,1176471	0,1111111	0,3157895	0,2105263	0,2222222
62G	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,6666667
43G	0,5714286	0,5333333	0,625	0,5	0,4
<i>V. treleasii</i> N29-30	0,4	0,375	0,4705882	0,3529412	0,25
236-39 Gm	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,4705882
112G	0,4	0,375	0,3529412	0,3529412	0,375
26G	0,5333333	0,625	0,5882353	0,3529412	0,375
110G	0,5333333	0,5	0,5882353	0,4705882	0,375
Na 5095-4Z	0,4705882	0,4444444	0,5263158	0,4210526	0,3333333
106-8MG	0,375	0,3529412	0,4444444	0,4444444	0,4705882
<i>Isabella</i> Labrusca Var.	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,3529412
<i>V. labrusca</i> Carolina	0,4	0,375	0,5882353	0,3529412	0,25
41B	0,4285714	0,4	0,5	0,5	0,4
1103 Paulsen KI 1G	0,4	0,5	0,5882353	0,5882353	0,375
Tel D	0,5714286	0,5333333	0,625	0,375	0,4
<i>V. rip.</i> Klosterneuburg	0,5333333	0,5	0,5882353	0,5882353	0,375
<i>V. rip.</i> Quebec 4	0,6666667	0,6153846	0,7142857	0,5714286	0,4615385
Fercal	0,4285714	0,4	0,5	0,5	0,4

<i>V. rip. Montr. 2NW 5158-7</i>	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,5333333	0,4285714
<i>V. rip. 49173 California</i>	0,4285714	0,4	0,5	0,5	0,4
<i>140 Ruggeri KI 1</i>	0,4	0,375	0,4705882	0,3529412	0,375
<i>V. rip. pub. bleu</i>	0,4615385	0,4285714	0,4	0,5333333	0,4285714
<i>Paulsen 775E</i>	0,3529412	0,4444444	0,4210526	0,5263158	0,3333333
<i>Paulsen 779E</i>	0,4	0,375	0,4705882	0,4705882	0,375
<i>V. rip. Montr. 5NW 5258-11</i>	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4444444	0,3529412
<i>140 Ruggeri KI 4</i>	0,4285714	0,4	0,375	0,375	0,4
<i>V. rip. Quebec B3</i>	0,3636364	0,3333333	0,3076923	0,3076923	0,3333333
<i>V. rip. Montr. 2NW 5158-37</i>	0,5	0,4705882	0,4444444	0,3333333	0,3529412
<i>V. rip. splendens</i>	0,2857143	0,2666667	0,375	0,375	0,2666667
<i>V. rip. semis Oberlin</i>	0,4285714	0,4	0,375	0,375	0,2666667

Oberlin 604					
1	V. rip. du territoire				
0	1	V. rip. 5016 Californien			
0,6666667	0	1	3309 C		
0,6153846	0,1666667	0,9090909	1	1103 Paulsen Kl. 9	
0,5714286	0	0,5	0,4615385	1	V. rip. grand feuille
0,7692308	0	0,7272727	0,6666667	0,6153846	1
0,6666667	0	0,8	0,7272727	0,5	0,7272727
0,5	0	0,6	0,5454545	0,3333333	0,5454545
0,4285714	0,1538462	0,3333333	0,3076923	0,4285714	0,4615385
0,4705882	0,125	0,4	0,375	0,3529412	0,5
0,6153846	0	0,7272727	0,6666667	0,4615385	0,6666667
0,75	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,625	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,625	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,5555556	0,1176471	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,7058824	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,4285714	0,1538462	0,3333333	0,3076923	0,4285714	0,6153846
0,5333333	0	0,6153846	0,5714286	0,4	0,5714286
0,6666667	0,1428571	0,7692308	0,7142857	0,5333333	0,7142857
0,5555556	0	0,625	0,5882353	0,5555556	0,5882353
0,7777778	0	0,625	0,5882353	0,5555556	0,5882353
0,7142857	0	0,6666667	0,6153846	0,5714286	0,7692308
0,4	0	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,4285714
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,5714286	0	0,6666667	0,6153846	0,4285714	0,6153846
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625

0,7058824	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,6666667	0	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,7142857
0,625	0	0,5714286	0,5333333	0,625	0,6666667
0,625	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,625	0,1333333	0,5714286	0,5333333	0,5	0,8
0,6666667	0	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,7142857
0,625	0,1333333	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,5882353	0,125	0,5333333	0,5	0,4705882	0,75
0,5263158	0,1111111	0,5882353	0,5555556	0,4210526	0,5555556
0,625	0,1333333	0,5714286	0,5333333	0,5	0,6666667
0,4705882	0,125	0,2666667	0,25	0,3529412	0,375
0,4	0	0,3076923	0,2857143	0,4	0,4285714
0,4	0	0,3076923	0,2857143	0,4	0,4285714
0,6666667	0,1428571	0,6153846	0,5714286	0,4	0,5714286
0,375	0,1333333	0,2857143	0,2666667	0,375	0,4
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,3529412	0,125	0,4	0,375	0,2352941	0,375
0,6666667	0	0,7692308	0,7142857	0,5333333	0,7142857
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,4210526	0	0,5882353	0,5555556	0,3157895	0,4444444
0,375	0,1333333	0,2857143	0,2666667	0,25	0,5333333
0,4705882	0,125	0,2666667	0,25	0,3529412	0,5
0,2352941	0,125	0,2666667	0,25	0,3529412	0,375
0,4210526	0	0,3529412	0,3333333	0,3157895	0,4444444
0,6666667	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,5882353	0	0,5333333	0,5	0,5882353	0,625
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,6666667	0,1428571	0,7692308	0,8571429	0,4	0,5714286
0,8	0	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,7142857
0,75	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,5333333
0,5714286	0	0,6666667	0,6153846	0,4285714	0,6153846
0,5714286	0	0,5	0,4615385	0,4285714	0,6153846
0,5714286	0	0,5	0,4615385	0,4285714	0,6153846
0,6666667	0	0,6153846	0,5714286	0,4	0,5714286

0,4444444	0,2352941	0,375	0,4705882	0,3333333	0,4705882
0,6666667	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,4	0,5714286
0,5333333	0	0,7692308	0,7142857	0,5333333	0,5714286
0,375	0,1333333	0,4285714	0,4	0,375	0,4
0,625	0	0,5714286	0,5333333	0,375	0,5333333
0,4705882	0	0,5333333	0,5	0,3529412	0,5
0,75	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,625	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,5555556	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,6666667	0	0,6153846	0,5714286	0,5333333	0,5714286
0,375	0,1333333	0,2857143	0,2666667	0,375	0,4
0,3529412	0,125	0,4	0,5	0,3529412	0,375
0,75	0	0,5714286	0,5333333	0,5	0,5333333
0,6	0,1052632	0,4444444	0,4210526	0,5	0,5263158
0,7058824	0	0,6666667	0,625	0,5882353	0,625
0,375	0,2666667	0,2857143	0,2666667	0,25	0,4
0,625	0,1333333	0,5714286	0,5333333	0,5	0,6666667
0,4705882	0,125	0,5333333	0,5	0,3529412	0,5
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,75	0	0,5714286	0,5333333	0,5	0,6666667
0,5882353	0	0,5333333	0,5	0,4705882	0,625
0,5882353	0	0,5333333	0,5	0,4705882	0,625
0,75	0	0,5714286	0,5333333	0,5	0,6666667
0,2352941	0,25	0,1333333	0,125	0,1176471	0,25
0,5882353	0,125	0,5333333	0,5	0,4705882	0,625
0,4	0	0,6153846	0,5714286	0,2666667	0,4285714
0,4705882	0	0,5333333	0,5	0,3529412	0,5
0,4	0	0,4444444	0,4210526	0,4	0,4210526
0,5	0,1333333	0,5714286	0,6666667	0,375	0,5333333
0,4705882	0	0,6666667	0,625	0,3529412	0,5
0,4444444	0	0,5	0,4705882	0,3333333	0,4705882
0,4444444	0	0,5	0,4705882	0,3333333	0,4705882

0,7058824	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,5555556	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,5263158	0	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556
0,6666667	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,4444444	0,1176471	0,625	0,7058824	0,3333333	0,4705882
0,4705882	0,125	0,6666667	0,75	0,3529412	0,5
0,3333333	0,2352941	0,375	0,4705882	0,2222222	0,3529412
0,6666667	0,1176471	0,625	0,7058824	0,4444444	0,5882353
0,6666667	0	0,5	0,4705882	0,5555556	0,5882353
0,7	0	0,5555556	0,5263158	0,6	0,5263158
0,7	0	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158
0,6	0	0,5555556	0,5263158	0,4	0,6315789
0,5	0	0,5555556	0,5263158	0,4	0,6315789
0,4	0,1428571	0,4615385	0,4285714	0,2666667	0,4285714
0,5714286	0	0,6666667	0,6153846	0,4285714	0,6153846
0,5882353	0	0,6666667	0,625	0,4705882	0,625
0,7368421	0	0,4705882	0,4444444	0,4210526	0,5555556
0,3157895	0,2222222	0,1176471	0,1111111	0,1052632	0,2222222
0,875	0	0,5714286	0,5333333	0,5	0,6666667
0,625	0	0,7142857	0,6666667	0,5	0,6666667
0,4705882	0,25	0,4	0,375	0,3529412	0,5
0,6666667	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,3529412	0	0,4	0,375	0,2352941	0,375
0,4705882	0	0,5333333	0,5	0,3529412	0,5
0,5882353	0,125	0,5333333	0,5	0,4705882	0,625
0,5263158	0	0,5882353	0,5555556	0,4210526	0,5555556
0,5555556	0	0,5	0,4705882	0,3333333	0,4705882
0,5555556	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,4705882	0	0,4	0,375	0,5882353	0,5
0,5	0	0,5714286	0,5333333	0,375	0,5333333
0,4705882	0	0,5333333	0,5	0,3529412	0,5
0,5	0	0,5714286	0,5333333	0,5	0,5333333
0,5882353	0,125	0,5333333	0,5	0,4705882	0,75
0,7142857	0	0,6666667	0,6153846	0,5714286	0,7692308
0,5	0	0,5714286	0,5333333	0,375	0,5333333

0,6666667	0	0,6153846	0,5714286	0,6666667	0,7142857
0,5	0	0,4285714	0,4	0,5	0,5333333
0,5882353	0,125	0,5333333	0,5	0,4705882	0,5
0,4	0,1428571	0,4615385	0,5714286	0,4	0,4285714
0,4210526	0	0,4705882	0,4444444	0,5263158	0,4444444
0,4705882	0	0,5333333	0,5	0,3529412	0,625
0,5555556	0	0,625	0,5882353	0,4444444	0,5882353
0,375	0	0,5714286	0,5333333	0,25	0,4
0,3076923	0	0,3636364	0,3333333	0,3076923	0,3333333
0,4444444	0,1176471	0,5	0,5882353	0,4444444	0,4705882
0,375	0,1333333	0,4285714	0,4	0,25	0,4
0,375	0	0,4285714	0,4	0,5	0,4

162 KI 38 Gm					
1	Seibel 867				
0,8	1	V. solonis longii Prince			
0,5	0,5	1	V. rup. Dieffenbach		
0,5333333	0,4	0,5882353	1	V. rip. Quebec 3	
0,7272727	0,7272727	0,6153846	0,5	1	V. slavinii Rhoeder
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,8	1
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,8	0,7777778
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,8	0,7777778
0,6666667	0,5333333	0,5882353	0,6	0,75	0,7368421
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,7
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,7368421
0,5	0,5	0,5714286	0,3529412	0,6153846	0,5
0,4615385	0,3076923	0,2666667	0,5555556	0,5714286	0,5882353
0,6153846	0,4615385	0,4	0,4444444	0,7142857	0,7058824
0,5	0,375	0,3333333	0,4761905	0,5882353	0,6
0,5	0,375	0,3333333	0,3809524	0,5882353	0,7
0,8333333	0,6666667	0,5714286	0,5882353	0,7692308	0,75
0,6153846	0,4615385	0,4	0,3333333	0,5714286	0,5882353
0,7692308	0,6153846	0,4	0,4444444	0,7142857	0,7058824
0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,4705882	0,9230769	0,75
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,7368421
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,7368421

0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,8421053
0,7692308	0,6153846	0,5333333	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,7142857	0,5714286	0,5	0,6315789	0,6666667	0,6666667
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,8	0,7777778
0,5714286	0,4285714	0,375	0,5263158	0,5333333	0,5555556
0,7692308	0,6153846	0,5333333	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,8	0,7777778
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,6	0,625	0,6315789
0,5882353	0,4705882	0,4210526	0,4545455	0,6666667	0,6666667
0,7142857	0,5714286	0,5	0,6315789	0,6666667	0,6666667
0,4	0,4	0,5882353	0,4	0,5	0,5263158
0,3076923	0,3076923	0,4	0,3333333	0,4285714	0,3529412
0,4615385	0,4615385	0,5333333	0,4444444	0,5714286	0,4705882
0,7692308	0,6153846	0,4	0,4444444	0,5714286	0,7058824
0,4285714	0,4285714	0,625	0,4210526	0,5333333	0,4444444
0,7692308	0,6153846	0,4	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,7692308	0,6153846	0,4	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,4	0,4	0,5882353	0,6	0,625	0,5263158
0,7692308	0,6153846	0,5333333	0,5555556	0,8571429	0,8235294
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,7368421
0,5882353	0,4705882	0,3157895	0,5454545	0,5555556	0,5714286
0,4285714	0,4285714	0,5	0,5263158	0,5333333	0,4444444
0,4	0,4	0,4705882	0,3	0,5	0,4210526
0,2666667	0,2666667	0,4705882	0,4	0,5	0,4210526
0,3529412	0,3529412	0,4210526	0,3636364	0,5555556	0,4761905
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,8
0,5333333	0,4	0,3529412	0,4	0,5	0,5263158
0,6153846	0,4615385	0,2666667	0,3333333	0,5714286	0,5882353
0,6153846	0,4615385	0,2666667	0,3333333	0,5714286	0,7058824
0,6153846	0,4615385	0,4	0,4444444	0,5714286	0,7058824
0,5714286	0,4285714	0,25	0,3157895	0,5333333	0,6666667
0,8333333	0,6666667	0,4285714	0,4705882	0,6153846	0,625
0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,4705882	0,7692308	0,625
0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,4705882	0,7692308	0,625
0,7692308	0,6153846	0,4	0,5555556	0,5714286	0,7058824

0,5	0,5	0,4444444	0,3809524	0,5882353	0,5
0,7692308	0,6153846	0,4	0,4444444	0,7142857	0,8235294
0,7692308	0,6153846	0,4	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,7692308	0,6153846	0,4	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,7692308	0,6153846	0,4	0,4444444	0,7142857	0,7058824
0,4285714	0,4285714	0,625	0,4210526	0,6666667	0,5555556
0,5714286	0,5714286	0,5	0,4210526	0,8	0,7777778
0,5333333	0,5333333	0,4705882	0,4	0,75	0,6315789
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,8	0,8888889
0,7142857	0,5714286	0,5	0,6315789	0,8	0,7777778
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,7368421
0,625	0,5	0,4444444	0,5714286	0,7058824	0,7
0,7692308	0,6153846	0,4	0,4444444	0,5714286	0,7058824
0,4285714	0,4285714	0,5	0,5263158	0,5333333	0,4444444
0,5333333	0,5333333	0,3529412	0,4	0,5	0,4210526
0,7142857	0,5714286	0,375	0,4210526	0,5333333	0,6666667
0,5555556	0,4444444	0,4	0,4347826	0,5263158	0,6363636
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,8421053
0,2857143	0,2857143	0,375	0,4210526	0,4	0,3333333
0,5714286	0,4285714	0,375	0,4210526	0,5333333	0,5555556
0,4	0,4	0,4705882	0,4	0,625	0,5263158
0,5333333	0,4	0,3529412	0,5	0,625	0,6315789
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,6666667	0,7777778
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,625	0,6315789
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,625	0,6315789
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,6666667	0,7777778
0,2666667	0,2666667	0,4705882	0,5	0,375	0,3157895
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,625	0,6315789
0,6153846	0,4615385	0,2666667	0,3333333	0,5714286	0,5882353
0,5333333	0,4	0,3529412	0,4	0,625	0,6315789
0,4444444	0,3333333	0,3	0,3478261	0,5263158	0,5454545
0,5714286	0,4285714	0,375	0,4210526	0,6666667	0,6666667
0,6666667	0,5333333	0,3529412	0,4	0,625	0,6315789
0,5	0,5	0,4444444	0,3809524	0,7058824	0,6
0,5	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,6

0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,75	0,8421053
0,625	0,5	0,4444444	0,5714286	0,7058824	0,7
0,5882353	0,4705882	0,4210526	0,4545455	0,6666667	0,6666667
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,8
0,625	0,5	0,3333333	0,3809524	0,5882353	0,6
0,6666667	0,5333333	0,3529412	0,4	0,625	0,6315789
0,375	0,375	0,4444444	0,4761905	0,5882353	0,5
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,8
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,5882353	0,7
0,5555556	0,4444444	0,4	0,4347826	0,6315789	0,7272727
0,5555556	0,4444444	0,4	0,4347826	0,6315789	0,7272727
0,5555556	0,4444444	0,4	0,4347826	0,6315789	0,7272727
0,5555556	0,4444444	0,4	0,5217391	0,6315789	0,6363636
0,4615385	0,4615385	0,5333333	0,5555556	0,7142857	0,5882353
0,8333333	0,6666667	0,4285714	0,4705882	0,6153846	0,625
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,6	0,75	0,7368421
0,5882353	0,4705882	0,4210526	0,4545455	0,5555556	0,6666667
0,2352941	0,2352941	0,4210526	0,4545455	0,3333333	0,3809524
0,5714286	0,4285714	0,375	0,4210526	0,5333333	0,6666667
0,5714286	0,4285714	0,375	0,4210526	0,6666667	0,6666667
0,5333333	0,4	0,4705882	0,6	0,5	0,5263158
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,8
0,5333333	0,5333333	0,3529412	0,4	0,5	0,4210526
0,6666667	0,5333333	0,3529412	0,4	0,5	0,5263158
0,6666667	0,5333333	0,4705882	0,5	0,625	0,6315789
0,5882353	0,4705882	0,4210526	0,4545455	0,6666667	0,6666667
0,5	0,5	0,4444444	0,3809524	0,7058824	0,7
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,7
0,5333333	0,4	0,5882353	0,5	0,5	0,5263158
0,5714286	0,5714286	0,5	0,4210526	0,8	0,6666667
0,5333333	0,6666667	0,4705882	0,4	0,75	0,6315789
0,7142857	0,5714286	0,5	0,5263158	0,5333333	0,5555556
0,5333333	0,4	0,3529412	0,5	0,5	0,5263158
0,8333333	0,6666667	0,5714286	0,5882353	0,7692308	0,75
0,5714286	0,5714286	0,5	0,4210526	0,8	0,6666667

0,7692308	0,6153846	0,5333333	0,5555556	0,7142857	0,7058824
0,5714286	0,5714286	0,5	0,5263158	0,6666667	0,5555556
0,4	0,2666667	0,3529412	0,3	0,5	0,5263158
0,4615385	0,6153846	0,2666667	0,3333333	0,4285714	0,3529412
0,3529412	0,3529412	0,3157895	0,2727273	0,5555556	0,4761905
0,4	0,4	0,3529412	0,4	0,625	0,5263158
0,625	0,5	0,4444444	0,4761905	0,7058824	0,7
0,5714286	0,5714286	0,375	0,3157895	0,6666667	0,5555556
0,5454545	0,5454545	0,4615385	0,25	0,5	0,4
0,625	0,5	0,3333333	0,3809524	0,4705882	0,5
0,4285714	0,4285714	0,5	0,5263158	0,6666667	0,5555556
0,5714286	0,4285714	0,375	0,4210526	0,4	0,4444444

<i>Binova</i>					
1	SO 4				
1	1	71 B			
0,8421053	0,8421053	1	<i>V. slavonii Rochester</i>		
0,7	0,7	0,6666667	1	<i>V. Thunbergii</i>	
0,7368421	0,7368421	0,7	0,7619048	1	<i>V. rip. grand glabre</i>
0,5	0,5	0,4705882	0,5555556	0,4705882	1
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,2666667
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,7	0,7	0,6666667	0,5454545	0,5714286	0,3333333
0,6	0,6	0,6666667	0,5454545	0,6666667	0,3333333
0,75	0,75	0,7058824	0,6666667	0,7058824	0,5714286
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,4
0,8235294	0,8235294	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,75	0,75	0,7058824	0,6666667	0,7058824	0,5714286
0,8421053	0,8421053	0,9	0,6666667	0,7	0,4705882
0,8421053	0,8421053	0,9	0,6666667	0,7	0,4705882

0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667	0,8	0,4705882
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5333333
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,7777778	0,7777778	0,7368421	0,7	0,7368421	0,5
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158	0,5
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5333333
0,7777778	0,7777778	0,7368421	0,7	0,7368421	0,5
0,6315789	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6	0,5882353
0,6666667	0,6666667	0,6363636	0,6086957	0,6363636	0,5263158
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,4210526	0,4210526	0,4	0,4761905	0,4	0,4705882
0,3529412	0,3529412	0,3333333	0,3157895	0,3333333	0,4
0,4705882	0,4705882	0,4444444	0,4210526	0,4444444	0,5333333
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,4
0,4444444	0,4444444	0,5263158	0,4	0,4210526	0,5
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,6315789	0,6315789	0,7	0,4761905	0,5	0,3529412
0,8235294	0,8235294	0,7777778	0,7368421	0,7777778	0,5333333
0,7368421	0,7368421	0,7	0,7619048	0,9	0,4705882
0,5714286	0,5714286	0,5454545	0,5217391	0,5454545	0,4210526
0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,5	0,5263158	0,5
0,4210526	0,4210526	0,4	0,4761905	0,5	0,5882353
0,4210526	0,4210526	0,4	0,4761905	0,5	0,4705882
0,4761905	0,4761905	0,4545455	0,5217391	0,5454545	0,5263158
0,7	0,7	0,6666667	0,6363636	0,7619048	0,4444444
0,5263158	0,5263158	0,5	0,4761905	0,5	0,3529412
0,7058824	0,7058824	0,7777778	0,5263158	0,5555556	0,2666667
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,2666667
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,4
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,6315789	0,25
0,625	0,625	0,5882353	0,6666667	0,7058824	0,4285714
0,625	0,625	0,5882353	0,6666667	0,7058824	0,5714286
0,625	0,625	0,5882353	0,6666667	0,7058824	0,5714286
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,4

0,5	0,5	0,4761905	0,4545455	0,4761905	0,4444444
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,4
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158	0,5
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667	0,8	0,4705882
0,7777778	0,7777778	0,7368421	0,7	0,7368421	0,5
0,7777778	0,7777778	0,7368421	0,7	0,7368421	0,5
0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667	0,7	0,4705882
0,9	0,9	0,7619048	0,6363636	0,6666667	0,4444444
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,4
0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,4	0,4210526	0,375
0,4210526	0,4210526	0,4	0,4761905	0,4	0,4705882
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,6315789	0,375
0,6363636	0,6363636	0,5217391	0,5833333	0,6086957	0,5
0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667	0,7	0,4705882
0,3333333	0,3333333	0,3157895	0,3	0,3157895	0,25
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158	0,375
0,6315789	0,6315789	0,7	0,5714286	0,5	0,4705882
0,6315789	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6	0,3529412
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667	0,7	0,4705882
0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667	0,7	0,4705882
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,3157895	0,3157895	0,4	0,2857143	0,3	0,2352941
0,6315789	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6	0,4705882
0,5882353	0,5882353	0,6666667	0,5263158	0,5555556	0,2666667
0,7368421	0,7368421	0,6	0,5714286	0,6	0,3529412
0,6363636	0,6363636	0,6086957	0,5833333	0,6086957	0,4
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,375
0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667	0,7	0,3529412
0,6	0,6	0,5714286	0,5454545	0,5714286	0,4444444
0,6	0,6	0,5714286	0,5454545	0,5714286	0,4444444

0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667	0,7	0,4705882
0,7	0,7	0,6666667	0,7272727	0,6666667	0,4444444
0,6666667	0,6666667	0,7272727	0,6956522	0,7272727	0,4210526
0,7	0,7	0,6666667	0,6363636	0,7619048	0,4444444
0,7	0,7	0,6666667	0,5454545	0,5714286	0,3333333
0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667	0,6	0,3529412
0,6	0,6	0,5714286	0,5454545	0,5714286	0,3333333
0,7	0,7	0,6666667	0,6363636	0,6666667	0,4444444
0,6	0,6	0,5714286	0,5454545	0,5714286	0,4444444
0,6363636	0,6363636	0,6086957	0,5833333	0,6956522	0,4
0,6363636	0,6363636	0,6956522	0,5833333	0,6956522	0,4
0,6363636	0,6363636	0,6956522	0,5833333	0,6086957	0,6
0,6363636	0,6363636	0,6086957	0,5833333	0,6086957	0,6
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5263158	0,5555556	0,4
0,625	0,625	0,5882353	0,5555556	0,5882353	0,4285714
0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667	0,7	0,4705882
0,6666667	0,6666667	0,6363636	0,5217391	0,6363636	0,4210526
0,2857143	0,2857143	0,3636364	0,2608696	0,2727273	0,2105263
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,6315789	0,375
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,5263158	0,5263158	0,5	0,4761905	0,5	0,3529412
0,7	0,7	0,6666667	0,7272727	0,6666667	0,4444444
0,4210526	0,4210526	0,4	0,3809524	0,4	0,4705882
0,6315789	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6	0,3529412
0,6315789	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6	0,4705882
0,6666667	0,6666667	0,6363636	0,6956522	0,7272727	0,4210526
0,6	0,6	0,5714286	0,5454545	0,6666667	0,4444444
0,7	0,7	0,6666667	0,7272727	0,7619048	0,4444444
0,5263158	0,5263158	0,6	0,4761905	0,5	0,4705882
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789	0,5
0,7368421	0,7368421	0,7	0,5714286	0,6	0,4705882
0,5555556	0,5555556	0,6315789	0,5	0,5263158	0,375
0,5263158	0,5263158	0,5	0,5714286	0,6	0,4705882
0,75	0,75	0,7058824	0,6666667	0,7058824	0,5714286
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,7	0,7368421	0,5

0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5333333
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158	0,5
0,5263158	0,5263158	0,6	0,5714286	0,6	0,4705882
0,3529412	0,3529412	0,3333333	0,3157895	0,3333333	0,2666667
0,4761905	0,4761905	0,4545455	0,4347826	0,4545455	0,3157895
0,5263158	0,5263158	0,5	0,4761905	0,5	0,4705882
0,7	0,7	0,6666667	0,6363636	0,6666667	0,4444444
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158	0,375
0,4	0,4	0,375	0,3529412	0,375	0,4615385
0,5	0,5	0,4761905	0,4545455	0,4761905	0,3333333
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5	0,5263158	0,375
0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,4	0,4210526	0,5

<i>Tel C</i>					
1	<i>Dr. Decker rebe</i>				
0,75	1	<i>Tel 5 A Goseck</i>			
0,6315789	0,7368421	1	<i>Na 1201-10</i>		
0,6315789	0,7368421	0,6363636	1	<i>V. rip. Trier</i>	
0,6666667	0,8	0,6666667	0,6666667	1	<i>159 G</i>
0,5	0,625	0,5263158	0,5263158	0,6666667	1
0,625	0,75	0,6315789	0,6315789	0,8	0,75
0,6666667	0,8	0,6666667	0,6666667	0,8571429	0,6666667
0,6666667	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,8235294	0,6666667
0,6666667	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,8235294	0,6666667

0,6666667	0,7777778	0,6666667	0,7619048	0,8235294	0,6666667
0,625	0,75	0,6315789	0,7368421	0,9333333	0,625
0,7058824	0,7058824	0,6	0,7	0,875	0,5882353
0,7058824	0,8235294	0,7	0,7	0,875	0,7058824
0,5882353	0,5882353	0,5	0,5	0,625	0,3529412
0,5	0,625	0,5263158	0,5263158	0,8	0,625
0,5882353	0,7058824	0,6	0,6	0,75	0,5882353
0,5555556	0,5555556	0,4761905	0,4761905	0,7058824	0,4444444
0,6	0,7	0,6086957	0,6086957	0,7368421	0,6
0,4705882	0,5882353	0,6	0,5	0,75	0,4705882
0,2222222	0,3333333	0,2857143	0,3809524	0,4705882	0,3333333
0,375	0,375	0,3157895	0,3157895	0,4	0,25
0,375	0,375	0,3157895	0,3157895	0,5333333	0,5
0,375	0,5	0,4210526	0,5263158	0,6666667	0,5
0,2352941	0,3529412	0,3	0,3	0,5	0,3529412
0,625	0,625	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,625
0,625	0,625	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,625
0,4444444	0,4444444	0,4761905	0,3809524	0,4705882	0,3333333
0,625	0,75	0,6315789	0,6315789	0,8	0,625
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7058824	0,5555556
0,6	0,5	0,5217391	0,4347826	0,5263158	0,5
0,3529412	0,3529412	0,3	0,3	0,5	0,2352941
0,2222222	0,3333333	0,2857143	0,3809524	0,4705882	0,3333333
0,3333333	0,3333333	0,3809524	0,2857143	0,3529412	0,3333333
0,4	0,4	0,3478261	0,4347826	0,4210526	0,4
0,5263158	0,6315789	0,5454545	0,6363636	0,6666667	0,5263158
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,6666667	0,7058824	0,4444444
0,5	0,625	0,6315789	0,6315789	0,5333333	0,5
0,5	0,625	0,5263158	0,6315789	0,5333333	0,5
0,5	0,625	0,5263158	0,7368421	0,6666667	0,375
0,4705882	0,5882353	0,5	0,8	0,5	0,4705882
0,4	0,5333333	0,4444444	0,4444444	0,7142857	0,5333333
0,4	0,5333333	0,4444444	0,4444444	0,7142857	0,4
0,4	0,5333333	0,4444444	0,4444444	0,7142857	0,4
0,375	0,5	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,5

0,3157895	0,4210526	0,3636364	0,3636364	0,5555556	0,3157895
0,5	0,625	0,5263158	0,6315789	0,6666667	0,625
0,625	0,625	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,625
0,625	0,625	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,625
0,5	0,625	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,75
0,3529412	0,4705882	0,4	0,4	0,5	0,4705882
0,4705882	0,5882353	0,5	0,6	0,625	0,4705882
0,4444444	0,5555556	0,4761905	0,4761905	0,5882353	0,4444444
0,5882353	0,7058824	0,6	0,7	0,75	0,5882353
0,7058824	0,7058824	0,6	0,6	0,75	0,5882353
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7058824	0,5555556
0,5263158	0,6315789	0,7272727	0,5454545	0,6666667	0,5263158
0,375	0,5	0,4210526	0,6315789	0,6666667	0,5
0,3529412	0,3529412	0,3	0,4	0,5	0,2352941
0,3333333	0,3333333	0,2857143	0,3809524	0,4705882	0,3333333
0,3529412	0,4705882	0,4	0,7	0,625	0,4705882
0,3809524	0,4761905	0,4166667	0,5833333	0,6	0,3809524
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,7619048	0,7058824	0,5555556
0,4705882	0,4705882	0,4	0,4	0,5	0,2352941
0,5882353	0,7058824	0,6	0,6	0,75	0,4705882
0,5555556	0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,5882353	0,4444444
0,7777778	0,7777778	0,6666667	0,6666667	0,7058824	0,5555556
0,5882353	0,7058824	0,6	0,7	0,875	0,5882353
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,8235294	0,5555556
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,8235294	0,5555556
0,5882353	0,7058824	0,6	0,7	0,875	0,5882353
0,3333333	0,3333333	0,2857143	0,2857143	0,4705882	0,2222222
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,8235294	0,5555556
0,5	0,625	0,5263158	0,6315789	0,6666667	0,625
0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7058824	0,5555556
0,4761905	0,5714286	0,6666667	0,5	0,6	0,4761905
0,5882353	0,7058824	0,6	0,6	0,75	0,5882353
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7058824	0,6666667
0,5263158	0,6315789	0,5454545	0,5454545	0,6666667	0,5263158
0,6315789	0,6315789	0,5454545	0,5454545	0,6666667	0,5263158

0,6666667	0,7777778	0,6666667	0,7619048	0,8235294	0,6666667
0,7368421	0,7368421	0,6363636	0,6363636	0,7777778	0,6315789
0,6	0,7	0,6086957	0,6956522	0,7368421	0,7
0,6315789	0,7368421	0,6363636	0,7272727	0,7777778	0,6315789
0,5263158	0,6315789	0,6363636	0,5454545	0,6666667	0,6315789
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7058824	0,6666667
0,5263158	0,5263158	0,5454545	0,4545455	0,5555556	0,4210526
0,6315789	0,7368421	0,6363636	0,7272727	0,7777778	0,6315789
0,5263158	0,6315789	0,5454545	0,7272727	0,7777778	0,5263158
0,5714286	0,6666667	0,6666667	0,8333333	0,7	0,5714286
0,5714286	0,6666667	0,5833333	0,9166667	0,7	0,5714286
0,5714286	0,6666667	0,5833333	0,75	0,7	0,5714286
0,6666667	0,6666667	0,5833333	0,5833333	0,7	0,5714286
0,5	0,5	0,4210526	0,4210526	0,5333333	0,375
0,4	0,5333333	0,4444444	0,4444444	0,7142857	0,5333333
0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7058824	0,5555556
0,5	0,6	0,6086957	0,6956522	0,7368421	0,5
0,3	0,3	0,2608696	0,3478261	0,4210526	0,2
0,4705882	0,5882353	0,5	0,7	0,625	0,3529412
0,5882353	0,7058824	0,6	0,6	0,625	0,4705882
0,4444444	0,4444444	0,3809524	0,3809524	0,5882353	0,3333333
0,5263158	0,6315789	0,5454545	0,6363636	0,6666667	0,5263158
0,4444444	0,4444444	0,3809524	0,3809524	0,5882353	0,4444444
0,4444444	0,5555556	0,5714286	0,4761905	0,7058824	0,5555556
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,8235294	0,5555556
0,6	0,7	0,6086957	0,6086957	0,7368421	0,6
0,4210526	0,5263158	0,4545455	0,5454545	0,5555556	0,4210526
0,6315789	0,7368421	0,6363636	0,6363636	0,7777778	0,6315789
0,4444444	0,5555556	0,4761905	0,5714286	0,7058824	0,5555556
0,5882353	0,7058824	0,6	0,6	0,75	0,5882353
0,4444444	0,5555556	0,5714286	0,4761905	0,5882353	0,4444444
0,4705882	0,5882353	0,6	0,5	0,75	0,5882353
0,4444444	0,5555556	0,5714286	0,4761905	0,5882353	0,3333333
0,5333333	0,6666667	0,5555556	0,5555556	0,8571429	0,5333333
0,4705882	0,5882353	0,5	0,5	0,625	0,4705882

0,5	0,625	0,5263158	0,6315789	0,8	0,5
0,4705882	0,5882353	0,5	0,6	0,75	0,4705882
0,5555556	0,6666667	0,5714286	0,7619048	0,5882353	0,5555556
0,375	0,375	0,3157895	0,4210526	0,4	0,25
0,5	0,6	0,5217391	0,6086957	0,5263158	0,5
0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,5882353	0,4444444
0,6315789	0,7368421	0,6363636	0,6363636	0,7777778	0,6315789
0,4705882	0,5882353	0,5	0,5	0,625	0,5882353
0,1428571	0,2857143	0,2352941	0,2352941	0,4615385	0,4285714
0,4210526	0,5263158	0,4545455	0,5454545	0,6666667	0,5263158
0,5882353	0,5882353	0,5	0,5	0,625	0,4705882
0,2352941	0,3529412	0,4	0,4	0,5	0,4705882

125 AA				
1	Sori F2			
0,8	1	TeI 52 A		
0,7777778	0,8235294	1	75 BB	
0,7777778	0,8235294	1	1	V. arizonica

0,7777778	0,8235294	0,8	0,8	1	<i>Oberlin 605</i>
0,75	0,8	0,7777778	0,7777778	0,7777778	1
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,7368421	0,9411765
0,8235294	0,875	0,8421053	0,8421053	0,8421053	0,8235294
0,4705882	0,5	0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,5882353
0,625	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,75
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,7368421	0,7058824
0,5555556	0,5882353	0,6	0,6	0,6	0,6666667
0,7	0,7368421	0,7272727	0,7272727	0,7272727	0,7
0,5882353	0,625	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,7058824
0,3333333	0,4705882	0,4	0,4	0,5	0,4444444
0,25	0,4	0,3333333	0,3333333	0,3333333	0,375
0,375	0,5333333	0,4444444	0,4444444	0,4444444	0,5
0,625	0,5333333	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,625
0,3529412	0,5	0,4210526	0,4210526	0,4210526	0,4705882
0,75	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625
0,75	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625
0,4444444	0,5882353	0,6	0,6	0,5	0,4444444
0,75	0,8	0,7777778	0,7777778	0,7777778	0,75
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,8	0,6666667
0,6	0,5263158	0,5454545	0,5454545	0,5454545	0,5
0,3529412	0,5	0,4210526	0,4210526	0,4210526	0,4705882
0,3333333	0,4705882	0,4	0,4	0,4	0,4444444
0,3333333	0,4705882	0,4	0,4	0,4	0,3333333
0,4	0,5263158	0,4545455	0,4545455	0,4545455	0,4
0,6315789	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,8571429	0,6315789
0,5555556	0,5882353	0,6	0,6	0,6	0,7777778
0,625	0,5333333	0,7777778	0,7777778	0,5555556	0,5
0,625	0,5333333	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,5
0,5	0,5333333	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,75
0,5882353	0,5	0,5263158	0,5263158	0,6315789	0,5882353
0,6666667	0,5714286	0,5882353	0,5882353	0,5882353	0,6666667
0,5333333	0,7142857	0,5882353	0,5882353	0,5882353	0,6666667
0,5333333	0,7142857	0,5882353	0,5882353	0,5882353	0,6666667
0,625	0,5333333	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,625

0,4210526	0,5555556	0,4761905	0,4761905	0,4761905	0,5263158
0,75	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,7777778	0,625
0,75	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625
0,75	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625
0,75	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625
0,4705882	0,625	0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,4705882
0,5882353	0,75	0,6315789	0,6315789	0,7368421	0,5882353
0,5555556	0,7058824	0,6	0,6	0,7	0,5555556
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,8421053	0,7058824
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,7368421	0,7058824
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,6666667
0,7368421	0,6666667	0,7619048	0,7619048	0,6666667	0,6315789
0,625	0,5333333	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,75
0,3529412	0,5	0,4210526	0,4210526	0,4210526	0,5882353
0,4444444	0,4705882	0,4	0,4	0,4	0,5555556
0,5882353	0,5	0,5263158	0,5263158	0,6315789	0,7058824
0,5714286	0,5	0,5217391	0,5217391	0,6956522	0,6666667
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,8	0,7777778
0,3529412	0,5	0,4210526	0,4210526	0,4210526	0,4705882
0,5882353	0,625	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,7058824
0,5555556	0,7058824	0,7	0,7	0,6	0,5555556
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,6666667
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,8421053	0,8235294
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,7777778
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,7777778
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,8421053	0,8235294
0,3333333	0,4705882	0,4	0,4	0,4	0,4444444
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,7777778
0,75	0,6666667	0,7777778	0,7777778	0,6666667	0,625
0,7777778	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,6666667
0,5714286	0,6	0,6956522	0,6956522	0,6086957	0,5714286
0,7058824	0,75	0,7368421	0,7368421	0,7368421	0,7058824
0,7777778	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,6666667
0,6315789	0,7777778	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6315789
0,6315789	0,7777778	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6315789

0,7777778	0,8235294	0,8	0,8	0,9	0,7777778
0,7368421	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,7619048	0,7368421
0,7	0,7368421	0,8181818	0,8181818	0,7272727	0,7
0,7368421	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,952381	0,7368421
0,7368421	0,6666667	0,7619048	0,7619048	0,6666667	0,6315789
0,7777778	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,6666667
0,5263158	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,5714286	0,5263158
0,7368421	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,8571429	0,7368421
0,6315789	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,7619048	0,8421053
0,6666667	0,7	0,6956522	0,6956522	0,7826087	0,7619048
0,6666667	0,7	0,7826087	0,7826087	0,7826087	0,7619048
0,6666667	0,7	0,7826087	0,7826087	0,7826087	0,6666667
0,6666667	0,7	0,6956522	0,6956522	0,6956522	0,6666667
0,5	0,6666667	0,5555556	0,5555556	0,5555556	0,5
0,6666667	0,5714286	0,5882353	0,5882353	0,5882353	0,6666667
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,6666667
0,6	0,6315789	0,7272727	0,7272727	0,7272727	0,7
0,3	0,4210526	0,3636364	0,3636364	0,4545455	0,4
0,4705882	0,5	0,5263158	0,5263158	0,6315789	0,5882353
0,5882353	0,625	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,5882353
0,4444444	0,4705882	0,5	0,5	0,5	0,5555556
0,6315789	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,7619048	0,6315789
0,5555556	0,5882353	0,5	0,5	0,5	0,5555556
0,6666667	0,5882353	0,7	0,7	0,6	0,6666667
0,6666667	0,7058824	0,7	0,7	0,7	0,7777778
0,7	0,7368421	0,7272727	0,7272727	0,7272727	0,7
0,5263158	0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,7619048	0,5263158
0,7368421	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,7619048	0,7368421
0,5555556	0,5882353	0,6	0,6	0,6	0,7777778
0,7058824	0,875	0,7368421	0,7368421	0,7368421	0,7058824
0,5555556	0,7058824	0,7	0,7	0,6	0,5555556
0,7058824	0,625	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,7058824
0,4444444	0,4705882	0,5	0,5	0,5	0,5555556
0,6666667	0,7142857	0,7058824	0,7058824	0,7058824	0,8
0,5882353	0,75	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,5882353

0,625	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,875
0,5882353	0,75	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,8235294
0,5555556	0,5882353	0,7	0,7	0,6	0,5555556
0,375	0,4	0,3333333	0,3333333	0,3333333	0,5
0,5	0,6315789	0,5454545	0,5454545	0,5454545	0,6
0,5555556	0,7058824	0,6	0,6	0,6	0,5555556
0,7368421	0,7777778	0,7619048	0,7619048	0,7619048	0,7368421
0,7058824	0,75	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,5882353
0,4285714	0,4615385	0,375	0,375	0,375	0,4285714
0,6315789	0,5555556	0,5714286	0,5714286	0,5714286	0,7368421
0,5882353	0,75	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,5882353
0,4705882	0,375	0,4210526	0,4210526	0,4210526	0,5882353

<i>V. rip. sauvage</i>					
1	<i>V. coignetia</i>				
0,7777778	1	<i>V. rip. Pailleres</i>			
0,6666667	0,5555556	1	2 Ganzin		
0,7058824	0,7058824	0,7058824	1	101-14 Kl. 8	
0,6666667	0,7777778	0,7777778	0,8235294	1	<i>V. rip. rouge pub.</i>
0,7368421	0,6315789	0,9473684	0,7777778	0,8421053	1
0,6666667	0,7619048	0,6666667	0,7	0,8571429	0,7272727
0,6666667	0,6666667	0,5555556	0,7058824	0,6666667	0,6315789
0,4210526	0,4210526	0,3157895	0,4444444	0,4210526	0,4
0,4705882	0,3529412	0,4705882	0,375	0,3529412	0,4444444
0,5882353	0,4705882	0,4705882	0,625	0,4705882	0,5555556
0,5882353	0,5882353	0,5882353	0,625	0,7058824	0,6666667
0,4444444	0,4444444	0,4444444	0,4705882	0,5555556	0,5263158
0,7058824	0,7058824	0,5882353	0,625	0,7058824	0,6666667
0,7058824	0,7058824	0,5882353	0,625	0,7058824	0,6666667
0,4210526	0,5263158	0,3157895	0,4444444	0,5263158	0,4
0,7058824	0,8235294	0,5882353	0,75	0,8235294	0,6666667
0,6315789	0,7368421	0,5263158	0,6666667	0,7368421	0,6
0,5714286	0,5714286	0,4761905	0,5	0,5714286	0,5454545
0,4444444	0,4444444	0,4444444	0,4705882	0,4444444	0,5263158
0,4210526	0,4210526	0,5263158	0,4444444	0,5263158	0,6
0,3157895	0,4210526	0,3157895	0,3333333	0,4210526	0,4
0,4761905	0,4761905	0,4761905	0,4	0,4761905	0,5454545
0,6	0,7	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,7368421	0,6315789	0,5263158	0,5555556	0,5263158	0,5
0,4705882	0,5882353	0,4705882	0,5	0,5882353	0,4444444
0,4705882	0,5882353	0,4705882	0,5	0,5882353	0,4444444
0,7058824	0,5882353	0,5882353	0,625	0,5882353	0,5555556
0,5555556	0,5555556	0,4444444	0,4705882	0,5555556	0,4210526
0,625	0,625	0,5	0,6666667	0,625	0,5882353
0,625	0,625	0,5	0,6666667	0,625	0,5882353
0,625	0,625	0,5	0,6666667	0,625	0,5882353
0,5882353	0,5882353	0,4705882	0,625	0,5882353	0,5555556

0,5	0,5	0,5	0,5263158	0,6	0,5714286
0,5882353	0,7058824	0,4705882	0,625	0,7058824	0,5555556
0,7058824	0,7058824	0,5882353	0,625	0,7058824	0,6666667
0,7058824	0,7058824	0,5882353	0,625	0,7058824	0,6666667
0,5882353	0,7058824	0,4705882	0,625	0,7058824	0,5555556
0,4444444	0,5555556	0,3333333	0,4705882	0,5555556	0,4210526
0,5555556	0,6666667	0,4444444	0,5882353	0,6666667	0,5263158
0,5263158	0,6315789	0,4210526	0,5555556	0,6315789	0,5
0,6666667	0,7777778	0,5555556	0,7058824	0,7777778	0,6315789
0,7777778	0,7777778	0,6666667	0,7058824	0,7777778	0,7368421
0,6315789	0,7368421	0,5263158	0,6666667	0,7368421	0,6
0,6	0,7	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,7058824	0,5882353	0,4705882	0,625	0,5882353	0,5555556
0,5555556	0,4444444	0,3333333	0,4705882	0,4444444	0,4210526
0,6315789	0,4210526	0,4210526	0,4444444	0,4210526	0,5
0,6666667	0,5555556	0,4444444	0,5882353	0,5555556	0,5263158
0,6363636	0,5454545	0,4545455	0,5714286	0,5454545	0,5217391
0,7368421	0,7368421	0,5263158	0,6666667	0,7368421	0,6
0,4444444	0,4444444	0,4444444	0,3529412	0,4444444	0,4210526
0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,5882353	0,6666667	0,6315789
0,5263158	0,6315789	0,4210526	0,4444444	0,5263158	0,4
0,7368421	0,7368421	0,6315789	0,5555556	0,6315789	0,6
0,7777778	0,7777778	0,5555556	0,7058824	0,6666667	0,6315789
0,7368421	0,7368421	0,5263158	0,6666667	0,6315789	0,6
0,7368421	0,7368421	0,5263158	0,6666667	0,6315789	0,6
0,7777778	0,7777778	0,5555556	0,7058824	0,6666667	0,6315789
0,4210526	0,4210526	0,3157895	0,3333333	0,4210526	0,4
0,7368421	0,7368421	0,6315789	0,6666667	0,7368421	0,7
0,5882353	0,7058824	0,3529412	0,5	0,5882353	0,4444444
0,6315789	0,7368421	0,4210526	0,5555556	0,6315789	0,5
0,5454545	0,6363636	0,3636364	0,4761905	0,5454545	0,4347826
0,6666667	0,7777778	0,4444444	0,5882353	0,6666667	0,5263158
0,6315789	0,7368421	0,4210526	0,5555556	0,6315789	0,5
0,6	0,7	0,4	0,5263158	0,6	0,4761905
0,7	0,7	0,5	0,5263158	0,6	0,5714286

0,7368421	0,8421053	0,5263158	0,6666667	0,7368421	0,6
0,8	0,8	0,6	0,6315789	0,7	0,6666667
0,6666667	0,7619048	0,4761905	0,6	0,6666667	0,5454545
0,7	0,8	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,6	0,7	0,4	0,5263158	0,6	0,4761905
0,6315789	0,7368421	0,4210526	0,5555556	0,6315789	0,5
0,5	0,6	0,3	0,4210526	0,5	0,3809524
0,7	0,8	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,8	0,7	0,5	0,6315789	0,6	0,5714286
0,7272727	0,7272727	0,4545455	0,5714286	0,6363636	0,5217391
0,7272727	0,7272727	0,4545455	0,5714286	0,6363636	0,5217391
0,6363636	0,7272727	0,5454545	0,5714286	0,6363636	0,6086957
0,7272727	0,7272727	0,6363636	0,5714286	0,6363636	0,6956522
0,4705882	0,5882353	0,3529412	0,5	0,5882353	0,4444444
0,625	0,625	0,5	0,6666667	0,625	0,5882353
0,7368421	0,7368421	0,6315789	0,6666667	0,7368421	0,7
0,6666667	0,6666667	0,4761905	0,6	0,5714286	0,5454545
0,3809524	0,3809524	0,2857143	0,3	0,3809524	0,3636364
0,5555556	0,5555556	0,5555556	0,5882353	0,5555556	0,5263158
0,5555556	0,6666667	0,5555556	0,5882353	0,6666667	0,5263158
0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,5555556	0,6315789	0,6
0,6	0,7	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,6315789	0,5263158	0,4210526	0,4444444	0,4210526	0,5
0,6315789	0,6315789	0,4210526	0,5555556	0,5263158	0,5
0,7368421	0,7368421	0,6315789	0,6666667	0,7368421	0,7
0,6666667	0,7619048	0,4761905	0,6	0,6666667	0,5454545
0,5	0,6	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,7	0,8	0,6	0,7368421	0,8	0,6666667
0,7368421	0,6315789	0,5263158	0,6666667	0,6315789	0,6
0,6666667	0,7777778	0,4444444	0,5882353	0,6666667	0,5263158
0,5263158	0,6315789	0,4210526	0,5555556	0,6315789	0,5
0,6666667	0,6666667	0,4444444	0,5882353	0,5555556	0,5263158
0,5263158	0,5263158	0,7368421	0,5555556	0,6315789	0,7
0,75	0,75	0,625	0,8	0,75	0,7058824
0,5555556	0,6666667	0,4444444	0,5882353	0,6666667	0,5263158

0,8235294	0,7058824	0,5882353	0,75	0,7058824	0,6666667
0,7777778	0,6666667	0,4444444	0,5882353	0,5555556	0,5263158
0,5263158	0,6315789	0,4210526	0,4444444	0,5263158	0,4
0,5882353	0,3529412	0,4705882	0,375	0,3529412	0,4444444
0,5714286	0,5714286	0,3809524	0,4	0,4761905	0,3636364
0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,4444444	0,5263158	0,6
0,7	0,8	0,5	0,6315789	0,7	0,5714286
0,5555556	0,6666667	0,3333333	0,4705882	0,5555556	0,4210526
0,4	0,4	0,2666667	0,4285714	0,4	0,375
0,7	0,6	0,4	0,5263158	0,5	0,4761905
0,5555556	0,6666667	0,3333333	0,4705882	0,5555556	0,4210526
0,5555556	0,4444444	0,3333333	0,4705882	0,4444444	0,4210526

V. rip. Montr. 1NW 5058-12					
1	209 G				
0,5714286	1	V. rip. Montr. Fr.			
0,3636364	0,5263158	1	V. rip. Quebec 1NW		
0,3	0,3529412	0,3333333	1	V. rip. 64G	
0,4	0,4705882	0,4444444	0,75	1	V. rip. 68G
0,6	0,5882353	0,4444444	0,375	0,5	1
0,4761905	0,4444444	0,4210526	0,4705882	0,5882353	0,5882353
0,6	0,5882353	0,3333333	0,5	0,625	0,75
0,6	0,5882353	0,3333333	0,5	0,625	0,75
0,4545455	0,4210526	0,5	0,3333333	0,4444444	0,4444444
0,7	0,7058824	0,4444444	0,5	0,625	0,75
0,6363636	0,6315789	0,4	0,4444444	0,5555556	0,6666667
0,5833333	0,5714286	0,2727273	0,4	0,5	0,6
0,3809524	0,4444444	0,4210526	0,3529412	0,4705882	0,4705882
0,4545455	0,4210526	0,4	0,4444444	0,5555556	0,5555556
0,3636364	0,3157895	0,4	0,4444444	0,4444444	0,3333333
0,4166667	0,3809524	0,3636364	0,6	0,6	0,4
0,6086957	0,6	0,4761905	0,4210526	0,5263158	0,7368421
0,5454545	0,5263158	0,3	0,4444444	0,4444444	0,5555556
0,5	0,4705882	0,2222222	0,25	0,25	0,5
0,5	0,4705882	0,3333333	0,25	0,25	0,625
0,5	0,5882353	0,4444444	0,375	0,375	0,625
0,4761905	0,4444444	0,3157895	0,2352941	0,2352941	0,5882353
0,5263158	0,625	0,3529412	0,2666667	0,4	0,6666667
0,5263158	0,625	0,4705882	0,4	0,5333333	0,5333333
0,5263158	0,625	0,4705882	0,4	0,5333333	0,5333333
0,5	0,7058824	0,4444444	0,25	0,375	0,75

0,5217391	0,5	0,3809524	0,5263158	0,5263158	0,5263158
0,6	0,5882353	0,4444444	0,25	0,375	0,75
0,6	0,5882353	0,3333333	0,375	0,5	0,625
0,6	0,5882353	0,3333333	0,375	0,5	0,625
0,6	0,5882353	0,3333333	0,25	0,375	0,625
0,4761905	0,4444444	0,5263158	0,4705882	0,4705882	0,3529412
0,5714286	0,5555556	0,6315789	0,3529412	0,4705882	0,5882353
0,5454545	0,5263158	0,5	0,3333333	0,4444444	0,4444444
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,3529412	0,4705882	0,7058824
0,6666667	0,6666667	0,4210526	0,4705882	0,5882353	0,5882353
0,6363636	0,6315789	0,4	0,3333333	0,4444444	0,5555556
0,6086957	0,7	0,3809524	0,3157895	0,4210526	0,5263158
0,5	0,5882353	0,4444444	0,25	0,375	0,75
0,3809524	0,4444444	0,5263158	0,2352941	0,3529412	0,3529412
0,4545455	0,4210526	0,3	0,3333333	0,4444444	0,4444444
0,4761905	0,5555556	0,4210526	0,2352941	0,3529412	0,7058824
0,48	0,5454545	0,5217391	0,2857143	0,3809524	0,5714286
0,6363636	0,6315789	0,5	0,3333333	0,4444444	0,6666667
0,4761905	0,3333333	0,4210526	0,2352941	0,2352941	0,3529412
0,6666667	0,5555556	0,3157895	0,3529412	0,3529412	0,5882353
0,5454545	0,4210526	0,3	0,3333333	0,3333333	0,3333333
0,6363636	0,5263158	0,3	0,4444444	0,4444444	0,4444444
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,3529412	0,4705882	0,7058824
0,6363636	0,6315789	0,4	0,3333333	0,4444444	0,5555556
0,6363636	0,6315789	0,4	0,3333333	0,4444444	0,5555556
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,3529412	0,4705882	0,7058824
0,4545455	0,3157895	0,4	0,1111111	0,2222222	0,3333333
0,7272727	0,6315789	0,4	0,3333333	0,4444444	0,6666667
0,6	0,4705882	0,2222222	0,125	0,25	0,5
0,6363636	0,5263158	0,3	0,2222222	0,3333333	0,4444444
0,64	0,4545455	0,2608696	0,1904762	0,2857143	0,3809524
0,6666667	0,5555556	0,3157895	0,2352941	0,3529412	0,4705882
0,6363636	0,5263158	0,3	0,2222222	0,3333333	0,5555556
0,6086957	0,5	0,3809524	0,4210526	0,4210526	0,4210526
0,6086957	0,5	0,3809524	0,5263158	0,5263158	0,4210526

0,7272727	0,6315789	0,5	0,3333333	0,4444444	0,6666667
0,6956522	0,6	0,3809524	0,4210526	0,5263158	0,5263158
0,6666667	0,5714286	0,3636364	0,3	0,4	0,5
0,6956522	0,6	0,4761905	0,3157895	0,4210526	0,6315789
0,6086957	0,5	0,2857143	0,2105263	0,3157895	0,5263158
0,6363636	0,5263158	0,4	0,2222222	0,3333333	0,5555556
0,5217391	0,4	0,3809524	0,2105263	0,3157895	0,3157895
0,6956522	0,6	0,4761905	0,3157895	0,4210526	0,6315789
0,6086957	0,6	0,4761905	0,3157895	0,4210526	0,6315789
0,64	0,5454545	0,4347826	0,2857143	0,3809524	0,5714286
0,64	0,5454545	0,4347826	0,2857143	0,3809524	0,5714286
0,72	0,5454545	0,4347826	0,2857143	0,3809524	0,5714286
0,72	0,5454545	0,3478261	0,3809524	0,4761905	0,4761905
0,6	0,4705882	0,4444444	0,25	0,375	0,375
0,5263158	0,625	0,3529412	0,2666667	0,4	0,6666667
0,6363636	0,6315789	0,4	0,4444444	0,5555556	0,5555556
0,5833333	0,5714286	0,4545455	0,3	0,4	0,6
0,4166667	0,2857143	0,3636364	0,1	0,2	0,4
0,4761905	0,5555556	0,4210526	0,3529412	0,3529412	0,5882353
0,6666667	0,5555556	0,3157895	0,3529412	0,3529412	0,4705882
0,5454545	0,5263158	0,4	0,2222222	0,3333333	0,5555556
0,6086957	0,6	0,5714286	0,3157895	0,4210526	0,6315789
0,5454545	0,4210526	0,3	0,3333333	0,4444444	0,4444444
0,5454545	0,5263158	0,3	0,2222222	0,3333333	0,5555556
0,7272727	0,6315789	0,4	0,3333333	0,4444444	0,6666667
0,6666667	0,5714286	0,3636364	0,3	0,4	0,5
0,6086957	0,5	0,4761905	0,3157895	0,4210526	0,5263158
0,7826087	0,6	0,3809524	0,3157895	0,4210526	0,5263158
0,6363636	0,5263158	0,4	0,3333333	0,4444444	0,4444444
0,6666667	0,5555556	0,4210526	0,3529412	0,4705882	0,4705882
0,5454545	0,5263158	0,4	0,3333333	0,4444444	0,4444444
0,5714286	0,5555556	0,3157895	0,2352941	0,3529412	0,5882353
0,5454545	0,6315789	0,3	0,3333333	0,3333333	0,5555556
0,6315789	0,75	0,4705882	0,4	0,5333333	0,6666667
0,5714286	0,5555556	0,4210526	0,4705882	0,5882353	0,5882353

0,6	0,7058824	0,4444444	0,375	0,5	0,625
0,5714286	0,5555556	0,4210526	0,3529412	0,4705882	0,4705882
0,5454545	0,4210526	0,3	0,3333333	0,3333333	0,3333333
0,3	0,3529412	0,2222222	0,375	0,375	0,375
0,5	0,3809524	0,2727273	0,5	0,5	0,4
0,5454545	0,4210526	0,3	0,4444444	0,4444444	0,3333333
0,6956522	0,6	0,3809524	0,3157895	0,4210526	0,5263158
0,5714286	0,4444444	0,3157895	0,3529412	0,3529412	0,4705882
0,3333333	0,4	0,375	0,2857143	0,4285714	0,4285714
0,5217391	0,5	0,2857143	0,3157895	0,4210526	0,6315789
0,5714286	0,4444444	0,5263158	0,2352941	0,3529412	0,3529412
0,4761905	0,5555556	0,3157895	0,2352941	0,3529412	0,4705882

<i>V. rip Urbana 2NW 4858-11</i>					
1	<i>V. rip. 183G</i>				
0,4705882	1	<i>V. rip. 75G</i>			
0,4705882	1	1	<i>V. rip. Montr. 2NW 5158-11</i>		
0,5263158	0,5555556	0,5555556	1	<i>V. rip. Quebec 2</i>	
0,5882353	0,875	0,875	0,6666667	1	88G
0,5263158	0,7777778	0,7777778	0,6	0,8888889	1
0,3809524	0,8	0,8	0,4545455	0,7	0,6363636
0,4444444	0,4705882	0,4705882	0,6315789	0,5882353	0,6315789
0,6315789	0,4444444	0,4444444	0,4	0,5555556	0,5
0,4210526	0,4444444	0,4444444	0,6	0,5555556	0,6
0,5714286	0,6	0,6	0,4545455	0,6	0,5454545
0,5	0,7368421	0,7368421	0,5714286	0,8421053	0,8571429
0,4210526	0,5555556	0,5555556	0,4	0,6666667	0,6
0,2352941	0,625	0,625	0,4444444	0,625	0,5555556
0,2352941	0,625	0,625	0,3333333	0,625	0,5555556
0,3529412	0,5	0,5	0,3333333	0,625	0,5555556
0,2222222	0,5882353	0,5882353	0,3157895	0,5882353	0,5263158
0,375	0,6666667	0,6666667	0,3529412	0,6666667	0,7058824
0,5	0,5333333	0,5333333	0,4705882	0,6666667	0,7058824
0,5	0,5333333	0,5333333	0,4705882	0,6666667	0,7058824
0,3529412	0,625	0,625	0,3333333	0,625	0,5555556

0,5	0,4210526	0,4210526	0,3809524	0,5263158	0,4761905
0,3529412	0,75	0,75	0,4444444	0,75	0,6666667
0,3529412	0,875	0,875	0,4444444	0,75	0,6666667
0,3529412	0,875	0,875	0,4444444	0,75	0,6666667
0,3529412	0,75	0,75	0,4444444	0,75	0,6666667
0,4444444	0,4705882	0,4705882	0,5263158	0,5882353	0,5263158
0,4444444	0,5882353	0,5882353	0,6315789	0,7058824	0,6315789
0,4210526	0,5555556	0,5555556	0,6	0,6666667	0,8
0,4444444	0,7058824	0,7058824	0,5263158	0,8235294	0,7368421
0,4444444	0,8235294	0,8235294	0,5263158	0,8235294	0,7368421
0,4210526	0,6666667	0,6666667	0,5	0,7777778	0,7
0,4	0,6315789	0,6315789	0,5714286	0,7368421	0,6666667
0,3529412	0,625	0,625	0,3333333	0,625	0,5555556
0,3333333	0,3529412	0,3529412	0,6315789	0,4705882	0,4210526
0,3157895	0,5555556	0,5555556	0,3	0,4444444	0,4
0,3333333	0,5882353	0,5882353	0,3157895	0,5882353	0,5263158
0,3636364	0,4761905	0,4761905	0,3478261	0,5714286	0,6086957
0,4210526	0,6666667	0,6666667	0,5	0,7777778	0,7
0,3333333	0,2352941	0,2352941	0,5263158	0,3529412	0,3157895
0,4444444	0,4705882	0,4705882	0,3157895	0,5882353	0,5263158
0,4210526	0,4444444	0,4444444	0,6	0,5555556	0,5
0,3157895	0,6666667	0,6666667	0,4	0,6666667	0,6
0,4444444	0,5882353	0,5882353	0,4210526	0,7058824	0,6315789
0,4210526	0,5555556	0,5555556	0,4	0,6666667	0,7
0,4210526	0,5555556	0,5555556	0,4	0,6666667	0,7
0,4444444	0,5882353	0,5882353	0,4210526	0,7058824	0,6315789
0,4210526	0,2222222	0,2222222	0,6	0,3333333	0,3
0,5263158	0,5555556	0,5555556	0,4	0,6666667	0,6
0,2352941	0,625	0,625	0,3333333	0,625	0,5555556
0,3157895	0,5555556	0,5555556	0,4	0,6666667	0,6
0,2727273	0,4761905	0,4761905	0,4347826	0,5714286	0,6086957
0,3333333	0,5882353	0,5882353	0,4210526	0,7058824	0,6315789
0,3157895	0,6666667	0,6666667	0,4	0,6666667	0,7
0,4	0,5263158	0,5263158	0,4761905	0,6315789	0,5714286
0,4	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,6315789	0,5714286

0,4210526	0,6666667	0,6666667	0,5	0,7777778	0,7
0,4	0,7368421	0,7368421	0,4761905	0,7368421	0,6666667
0,3809524	0,6	0,6	0,4545455	0,7	0,7272727
0,4	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,7368421	0,7619048
0,3	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,6315789	0,5714286
0,3157895	0,6666667	0,6666667	0,4	0,6666667	0,6
0,3	0,4210526	0,4210526	0,6666667	0,5263158	0,5714286
0,4	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,7368421	0,6666667
0,4	0,5263158	0,5263158	0,3809524	0,6315789	0,5714286
0,3636364	0,5714286	0,5714286	0,4347826	0,6666667	0,6086957
0,3636364	0,5714286	0,5714286	0,4347826	0,6666667	0,6086957
0,3636364	0,5714286	0,5714286	0,4347826	0,6666667	0,6086957
0,3636364	0,6666667	0,6666667	0,4347826	0,6666667	0,6086957
0,3529412	0,5	0,5	0,6666667	0,625	0,5555556
0,375	0,6666667	0,6666667	0,3529412	0,6666667	0,5882353
0,4210526	0,7777778	0,7777778	0,5	0,7777778	0,7
0,3809524	0,5	0,5	0,4545455	0,6	0,5454545
0,4761905	0,2	0,2	0,4545455	0,3	0,2727273
0,3333333	0,4705882	0,4705882	0,3157895	0,5882353	0,5263158
0,3333333	0,5882353	0,5882353	0,4210526	0,7058824	0,6315789
0,4210526	0,4444444	0,4444444	0,5	0,5555556	0,5
0,4	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,7368421	0,6666667
0,3157895	0,5555556	0,5555556	0,3	0,4444444	0,4
0,3157895	0,5555556	0,5555556	0,4	0,5555556	0,6
0,5263158	0,5555556	0,5555556	0,4	0,6666667	0,6
0,3809524	0,6	0,6	0,4545455	0,7	0,7272727
0,5	0,5263158	0,5263158	0,4761905	0,6315789	0,6666667
0,4	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,7368421	0,7619048
0,5263158	0,4444444	0,4444444	0,4	0,5555556	0,5
0,4444444	0,5882353	0,5882353	0,5263158	0,7058824	0,6315789
0,4210526	0,5555556	0,5555556	0,6	0,6666667	0,6
0,4444444	0,5882353	0,5882353	0,4210526	0,5882353	0,5263158
0,4210526	0,4444444	0,4444444	0,3	0,5555556	0,6
0,5	0,6666667	0,6666667	0,4705882	0,8	0,7058824
0,5555556	0,7058824	0,7058824	0,6315789	0,8235294	0,8421053

0,4705882	0,625	0,625	0,4444444	0,75	0,6666667
0,4444444	0,4705882	0,4705882	0,4210526	0,5882353	0,5263158
0,3157895	0,4444444	0,4444444	0,3	0,5555556	0,5
0,2352941	0,5	0,5	0,2222222	0,375	0,3333333
0,3809524	0,5	0,5	0,4545455	0,6	0,5454545
0,3157895	0,5555556	0,5555556	0,4	0,5555556	0,5
0,4	0,6315789	0,6315789	0,4761905	0,7368421	0,6666667
0,3333333	0,5882353	0,5882353	0,4210526	0,5882353	0,5263158
0,4	0,4285714	0,4285714	0,25	0,4285714	0,375
0,4	0,6315789	0,6315789	0,3809524	0,6315789	0,5714286
0,3333333	0,4705882	0,4705882	0,7368421	0,5882353	0,5263158
0,3333333	0,4705882	0,4705882	0,2105263	0,4705882	0,4210526

<i>V. cin.</i> New York					
1	<i>V. novae</i> <i>anglicae</i> Rochester				
0,3809524	1	<i>V. rip.</i> Geneva 04			
0,3636364	0,5263158	1	<i>V. cin.</i> 5015		
0,3636364	0,7368421	0,5	1	<i>V. rip. Montr.</i> 2NW 5158-30	
0,5	0,4761905	0,7272727	0,6363636	1	109-4 C
0,6086957	0,5	0,4761905	0,4761905	0,5217391	1
0,4545455	0,4210526	0,5	0,3	0,3636364	0,6666667
0,5	0,2352941	0,2222222	0,2222222	0,3	0,5263158
0,5	0,2352941	0,2222222	0,2222222	0,3	0,6315789
0,4	0,3529412	0,3333333	0,2222222	0,3	0,6315789
0,4761905	0,2222222	0,3157895	0,2105263	0,3809524	0,6
0,5263158	0,5	0,3529412	0,3529412	0,3157895	0,5555556
0,4210526	0,625	0,4705882	0,4705882	0,4210526	0,5555556
0,4210526	0,625	0,4705882	0,4705882	0,4210526	0,5555556
0,6	0,3529412	0,3333333	0,2222222	0,3	0,6315789

0,3478261	0,4	0,4761905	0,3809524	0,4347826	0,4545455
0,6	0,3529412	0,3333333	0,3333333	0,4	0,7368421
0,7	0,3529412	0,3333333	0,3333333	0,5	0,6315789
0,7	0,3529412	0,3333333	0,3333333	0,5	0,6315789
0,6	0,3529412	0,3333333	0,3333333	0,4	0,6315789
0,3809524	0,4444444	0,4210526	0,6315789	0,5714286	0,5
0,4761905	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,4761905	0,7
0,4545455	0,5263158	0,4	0,5	0,4545455	0,6666667
0,5714286	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,4761905	0,8
0,6666667	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,5714286	0,7
0,5454545	0,4210526	0,4	0,4	0,4545455	0,6666667
0,6086957	0,4	0,3809524	0,3809524	0,4347826	0,6363636
0,5	0,3529412	0,3333333	0,2222222	0,3	0,6315789
0,2857143	0,5555556	0,3157895	0,4210526	0,2857143	0,4
0,5454545	0,3157895	0,4	0,2	0,4545455	0,3809524
0,4761905	0,3333333	0,4210526	0,2105263	0,3809524	0,6
0,4	0,3636364	0,3478261	0,2608696	0,32	0,6666667
0,5454545	0,4210526	0,4	0,4	0,4545455	0,7619048
0,1904762	0,4444444	0,3157895	0,3157895	0,1904762	0,3
0,3809524	0,3333333	0,4210526	0,2105263	0,2857143	0,5
0,3636364	0,3157895	0,3	0,3	0,3636364	0,4761905
0,5454545	0,3157895	0,3	0,3	0,4545455	0,5714286
0,4761905	0,4444444	0,4210526	0,3157895	0,3809524	0,7
0,4545455	0,5263158	0,4	0,4	0,3636364	0,5714286
0,4545455	0,5263158	0,4	0,4	0,3636364	0,5714286
0,4761905	0,4444444	0,4210526	0,3157895	0,3809524	0,7
0,1818182	0,4210526	0,3	0,3	0,1818182	0,2857143
0,4545455	0,4210526	0,5	0,3	0,3636364	0,5714286
0,5	0,2352941	0,2222222	0,2222222	0,3	0,5263158
0,5454545	0,3157895	0,3	0,3	0,3636364	0,5714286
0,48	0,3636364	0,2608696	0,4347826	0,32	0,5
0,4761905	0,3333333	0,3157895	0,3157895	0,3809524	0,6
0,5454545	0,4210526	0,3	0,4	0,3636364	0,5714286
0,4347826	0,4	0,3809524	0,4761905	0,5217391	0,5454545
0,5217391	0,4	0,3809524	0,4761905	0,6086957	0,5454545

0,5454545	0,4210526	0,4	0,4	0,4545455	0,7619048
0,6086957	0,4	0,4761905	0,3809524	0,6086957	0,6363636
0,5	0,4761905	0,3636364	0,4545455	0,4166667	0,6086957
0,5217391	0,4	0,3809524	0,3809524	0,4347826	0,8181818
0,5217391	0,3	0,2857143	0,2857143	0,3478261	0,5454545
0,5454545	0,3157895	0,3	0,3	0,3636364	0,5714286
0,3478261	0,6	0,2857143	0,5714286	0,3478261	0,4545455
0,5217391	0,4	0,3809524	0,3809524	0,4347826	0,7272727
0,4347826	0,4	0,3809524	0,2857143	0,3478261	0,6363636
0,48	0,3636364	0,4347826	0,4347826	0,48	0,6666667
0,48	0,3636364	0,4347826	0,3478261	0,48	0,6666667
0,56	0,4545455	0,4347826	0,4347826	0,48	0,6666667
0,64	0,4545455	0,4347826	0,4347826	0,56	0,5833333
0,4	0,5882353	0,3333333	0,5555556	0,4	0,5263158
0,5263158	0,375	0,3529412	0,2352941	0,3157895	0,5555556
0,6363636	0,4210526	0,4	0,4	0,5454545	0,6666667
0,4166667	0,3809524	0,4545455	0,2727273	0,4166667	0,6086957
0,1666667	0,3809524	0,2727273	0,2727273	0,1666667	0,3478261
0,3809524	0,3333333	0,4210526	0,2105263	0,3809524	0,7
0,5714286	0,3333333	0,3157895	0,3157895	0,3809524	0,7
0,3636364	0,5263158	0,4	0,4	0,2727273	0,5714286
0,5217391	0,4	0,3809524	0,3809524	0,4347826	0,8181818
0,5454545	0,3157895	0,3	0,2	0,3636364	0,4761905
0,4545455	0,4210526	0,3	0,3	0,2727273	0,5714286
0,4545455	0,4210526	0,5	0,3	0,3636364	0,6666667
0,5	0,4761905	0,3636364	0,4545455	0,4166667	0,6956522
0,4347826	0,4	0,3809524	0,3809524	0,4347826	0,7272727
0,5217391	0,5	0,3809524	0,4761905	0,4347826	0,6363636
0,3636364	0,3157895	0,4	0,3	0,3636364	0,4761905
0,4761905	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,4761905	0,7
0,4545455	0,4210526	0,4	0,4	0,4545455	0,5714286
0,4761905	0,3333333	0,3157895	0,3157895	0,2857143	0,5
0,4545455	0,5263158	0,5	0,4	0,3636364	0,4761905
0,5263158	0,5	0,4705882	0,3529412	0,4210526	0,6666667
0,5714286	0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,5714286	0,7

0,5	0,4705882	0,4444444	0,3333333	0,4	0,6315789
0,3809524	0,4444444	0,4210526	0,3157895	0,3809524	0,5
0,3636364	0,2105263	0,4	0,3	0,4545455	0,4761905
0,4	0,2352941	0,2222222	0,1111111	0,3	0,3157895
0,4166667	0,3809524	0,3636364	0,3636364	0,4166667	0,5217391
0,4545455	0,4210526	0,4	0,4	0,5454545	0,4761905
0,5217391	0,4	0,3809524	0,3809524	0,4347826	0,6363636
0,4761905	0,3333333	0,3157895	0,4210526	0,4761905	0,5
0,3333333	0,2666667	0,375	0,25	0,3333333	0,3529412
0,5217391	0,4	0,3809524	0,2857143	0,3478261	0,5454545
0,3809524	0,5555556	0,3157895	0,5263158	0,3809524	0,5
0,5714286	0,2222222	0,3157895	0,2105263	0,2857143	0,4

<i>V.rip.Montr.</i> <i>1NW 5058-8</i>					
1	<i>68B</i>				
0,4444444	1	<i>Barret 503</i>			
0,4444444	0,75	1	<i>1616C</i>		
0,6666667	0,625	0,75	1	<i>4 A Teleki</i>	
0,5263158	0,7058824	0,8235294	0,8235294	1	<i>V. rip. 80G</i>
0,4705882	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625	1
0,4705882	0,5333333	0,5333333	0,6666667	0,5	0,8571429
0,4705882	0,5333333	0,5333333	0,6666667	0,5	0,8571429
0,4444444	0,625	0,75	0,75	0,7058824	0,8

0,3809524	0,4210526	0,5263158	0,5263158	0,4	0,5555556
0,4444444	0,75	0,875	0,75	0,8235294	0,8
0,4444444	0,75	0,75	0,625	0,7058824	0,8
0,4444444	0,75	0,75	0,625	0,7058824	0,8
0,4444444	0,75	0,75	0,625	0,7058824	0,8
0,3157895	0,4705882	0,4705882	0,4705882	0,4444444	0,5
0,4210526	0,5882353	0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,625
0,4	0,5555556	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,7058824
0,5263158	0,7058824	0,8235294	0,8235294	0,7777778	0,75
0,5263158	0,7058824	0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,75
0,5	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,7058824
0,4761905	0,7368421	0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667
0,5555556	0,625	0,75	0,875	0,8235294	0,8
0,4210526	0,3529412	0,3529412	0,5882353	0,4444444	0,5
0,4	0,4444444	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5882353
0,5263158	0,5882353	0,7058824	0,8235294	0,8888889	0,75
0,5217391	0,4761905	0,5714286	0,7619048	0,6363636	0,6
0,6	0,6666667	0,7777778	0,8888889	0,8421053	0,7058824
0,4210526	0,3529412	0,3529412	0,4705882	0,3333333	0,375
0,6315789	0,5882353	0,5882353	0,7058824	0,5555556	0,625
0,5	0,6666667	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,4705882
0,6	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,5882353
0,6315789	0,5882353	0,7058824	0,8235294	0,6666667	0,75
0,6	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,5263158	0,8235294
0,6	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,5263158	0,8235294
0,6315789	0,5882353	0,7058824	0,8235294	0,6666667	0,75
0,3	0,2222222	0,2222222	0,3333333	0,2105263	0,3529412
0,6	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,5263158	0,7058824
0,4444444	0,75	0,625	0,5	0,5882353	0,6666667
0,5	0,5555556	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5882353
0,4347826	0,5714286	0,4761905	0,4761905	0,4545455	0,6
0,5263158	0,5882353	0,7058824	0,5882353	0,5555556	0,625
0,5	0,6666667	0,6666667	0,5555556	0,6315789	0,8235294
0,4761905	0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,5	0,5555556
0,4761905	0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,5	0,5555556

0,6	0,6666667	0,7777778	0,7777778	0,7368421	0,7058824
0,5714286	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667
0,5454545	0,7	0,6	0,6	0,5714286	0,7368421
0,5714286	0,6315789	0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667
0,4761905	0,7368421	0,7368421	0,5263158	0,6	0,6666667
0,5	0,6666667	0,7777778	0,5555556	0,6315789	0,7058824
0,3809524	0,5263158	0,5263158	0,4210526	0,4	0,5555556
0,5714286	0,6315789	0,8421053	0,7368421	0,7	0,6666667
0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,8421053	0,7	0,6666667
0,6086957	0,5714286	0,6666667	0,7619048	0,8181818	0,6
0,6086957	0,6666667	0,6666667	0,7619048	0,8181818	0,6
0,5217391	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6363636	0,6
0,5217391	0,5714286	0,5714286	0,5714286	0,5454545	0,6
0,3333333	0,5	0,5	0,5	0,4705882	0,5333333
0,4705882	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,625	0,8571429
0,5	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,7058824
0,5454545	0,6	0,6	0,7	0,6666667	0,6315789
0,2727273	0,2	0,3	0,4	0,2857143	0,3157895
0,6315789	0,5882353	0,7058824	0,8235294	0,7777778	0,625
0,6315789	0,7058824	0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,625
0,5	0,4444444	0,4444444	0,5555556	0,4210526	0,5882353
0,5714286	0,6315789	0,7368421	0,7368421	0,7	0,6666667
0,5	0,4444444	0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,5882353
0,6	0,6666667	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,8235294
0,7	0,5555556	0,5555556	0,6666667	0,5263158	0,7058824
0,6363636	0,6	0,6	0,6	0,5714286	0,7368421
0,3809524	0,5263158	0,6315789	0,6315789	0,6	0,5555556
0,5714286	0,6315789	0,6315789	0,6315789	0,6	0,7777778
0,6	0,4444444	0,4444444	0,6666667	0,5263158	0,5882353
0,6315789	0,4705882	0,4705882	0,4705882	0,4444444	0,5
0,4	0,5555556	0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,4705882
0,5263158	0,4705882	0,4705882	0,4705882	0,4444444	0,625
0,5	0,4444444	0,4444444	0,5555556	0,4210526	0,5882353
0,5882353	0,5333333	0,5333333	0,6666667	0,5	0,7142857
0,5263158	0,4705882	0,4705882	0,4705882	0,4444444	0,625

0,6666667	0,5	0,5	0,75	0,5882353	0,6666667
0,6315789	0,3529412	0,3529412	0,5882353	0,4444444	0,5
0,5	0,5555556	0,4444444	0,4444444	0,5263158	0,3529412
0,4444444	0,375	0,5	0,5	0,4705882	0,4
0,6363636	0,4	0,4	0,5	0,4761905	0,3157895
0,5	0,4444444	0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,3529412
0,5714286	0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,5	0,5555556
0,4210526	0,4705882	0,4705882	0,3529412	0,4444444	0,5
0,25	0,2857143	0,2857143	0,2857143	0,2666667	0,4615385
0,6666667	0,4210526	0,5263158	0,5263158	0,5	0,5555556
0,4210526	0,3529412	0,3529412	0,3529412	0,3333333	0,375
0,4210526	0,3529412	0,3529412	0,4705882	0,4444444	0,5

<i>V. amurensis</i>			
1	174G		
1	1	66G	
0,6666667	0,6666667	1	<i>V. cordifolia</i>

0,6666667	0,6666667	0,5263158	1	141G	
0,6666667	0,6666667	0,875	0,5263158	1	V. rip. Alberta Fr
0,6666667	0,6666667	0,75	0,5263158	0,875	1
0,6666667	0,6666667	0,75	0,5263158	0,875	1
0,6666667	0,6666667	0,75	0,5263158	0,875	0,875
0,625	0,625	0,4705882	0,6	0,5882353	0,5882353
0,75	0,75	0,7058824	0,6	0,8235294	0,7058824
0,8235294	0,8235294	0,5555556	0,5714286	0,6666667	0,6666667
0,75	0,75	0,8235294	0,6	0,9411765	0,8235294
0,75	0,75	0,7058824	0,6	0,8235294	0,9411765
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6666667	0,7777778	0,7777778
0,6666667	0,6666667	0,7368421	0,5454545	0,7368421	0,7368421
0,6666667	0,6666667	0,875	0,5263158	0,875	0,75
0,625	0,625	0,4705882	0,5	0,4705882	0,4705882
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5714286	0,5555556	0,6666667
0,625	0,625	0,8235294	0,5	0,8235294	0,7058824
0,6	0,6	0,6666667	0,5	0,6666667	0,5714286
0,7058824	0,7058824	0,7777778	0,5714286	0,8888889	0,7777778
0,5	0,5	0,3529412	0,5	0,3529412	0,3529412
0,625	0,625	0,5882353	0,6	0,5882353	0,5882353
0,5882353	0,5882353	0,4444444	0,4761905	0,5555556	0,5555556
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,4761905	0,6666667	0,7777778
0,75	0,75	0,8235294	0,6	0,8235294	0,7058824
0,8235294	0,8235294	0,6666667	0,5714286	0,6666667	0,6666667
0,8235294	0,8235294	0,6666667	0,5714286	0,6666667	0,6666667
0,75	0,75	0,8235294	0,6	0,8235294	0,7058824
0,4705882	0,4705882	0,3333333	0,4761905	0,3333333	0,3333333
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667
0,5333333	0,5333333	0,625	0,4210526	0,75	0,75
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,4761905	0,6666667	0,6666667
0,6	0,6	0,4761905	0,4166667	0,5714286	0,5714286
0,625	0,625	0,5882353	0,6	0,7058824	0,7058824
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,4761905	0,7777778	0,7777778
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,6363636	0,6315789	0,6315789
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,6363636	0,6315789	0,7368421

0,7058824	0,7058824	0,7777778	0,5714286	0,8888889	0,7777778
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,5454545	0,7368421	0,8421053
0,7368421	0,7368421	0,6	0,5217391	0,7	0,7
0,6666667	0,6666667	0,7368421	0,5454545	0,8421053	0,7368421
0,5555556	0,5555556	0,6315789	0,5454545	0,7368421	0,7368421
0,5882353	0,5882353	0,6666667	0,5714286	0,7777778	0,7777778
0,6666667	0,6666667	0,4210526	0,5454545	0,5263158	0,5263158
0,6666667	0,6666667	0,7368421	0,6363636	0,8421053	0,7368421
0,6666667	0,6666667	0,7368421	0,5454545	0,7368421	0,6315789
0,6	0,6	0,6666667	0,5	0,7619048	0,6666667
0,6	0,6	0,6666667	0,5	0,7619048	0,6666667
0,6	0,6	0,6666667	0,5	0,7619048	0,6666667
0,6	0,6	0,5714286	0,5	0,6666667	0,7619048
0,6666667	0,6666667	0,5	0,5263158	0,625	0,625
0,7142857	0,7142857	0,8	0,5555556	0,8	0,8
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,5714286	0,7777778	0,8888889
0,6315789	0,6315789	0,7	0,5217391	0,7	0,6
0,4210526	0,4210526	0,4	0,4347826	0,4	0,3
0,625	0,625	0,7058824	0,5	0,7058824	0,5882353
0,625	0,625	0,5882353	0,5	0,7058824	0,7058824
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5714286	0,5555556	0,5555556
0,6666667	0,6666667	0,7368421	0,5454545	0,8421053	0,7368421
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,4761905	0,5555556	0,6666667
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,4761905	0,6666667	0,6666667
0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6666667
0,7368421	0,7368421	0,6	0,5217391	0,7	0,7
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,5454545	0,7368421	0,6315789
0,7777778	0,7777778	0,6315789	0,5454545	0,7368421	0,7368421
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,4761905	0,5555556	0,5555556
0,625	0,625	0,4705882	0,5	0,5882353	0,5882353
0,5882353	0,5882353	0,4444444	0,4761905	0,5555556	0,5555556
0,5	0,5	0,5882353	0,4	0,5882353	0,5882353
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,4761905	0,4444444	0,4444444
0,7142857	0,7142857	0,6666667	0,5555556	0,6666667	0,6666667
0,75	0,75	0,4705882	0,5	0,5882353	0,5882353

0,6666667	0,6666667	0,625	0,5263158	0,625	0,625
0,625	0,625	0,4705882	0,5	0,4705882	0,4705882
0,3529412	0,3529412	0,3333333	0,2857143	0,4444444	0,4444444
0,4	0,4	0,375	0,4210526	0,375	0,5
0,4210526	0,4210526	0,3	0,4347826	0,4	0,4
0,4705882	0,4705882	0,3333333	0,3809524	0,4444444	0,5555556
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,4545455	0,6315789	0,6315789
0,5	0,5	0,4705882	0,5	0,5882353	0,5882353
0,4615385	0,4615385	0,4285714	0,3529412	0,4285714	0,4285714
0,4444444	0,4444444	0,5263158	0,4545455	0,5263158	0,5263158
0,5	0,5	0,3529412	0,4	0,4705882	0,4705882
0,375	0,375	0,5882353	0,3	0,4705882	0,4705882

V. rip. pub. Typ Börner					
1	V. rip. Gloire de Montpellier				
0,875	1	V. rip. 78G			
0,5882353	0,5882353	1	316 Gm		
0,7058824	0,7058824	0,6666667	1	V. novo mexicana	
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,8421053	1	1616Tr
0,8235294	0,8235294	0,6666667	0,8888889	0,7368421	1
0,9411765	0,8235294	0,6666667	0,7777778	0,7368421	0,8888889
0,7777778	0,7777778	0,7368421	0,7368421	0,7	0,8421053
0,7368421	0,7368421	0,6	0,7	0,6666667	0,8
0,75	0,75	0,4705882	0,7058824	0,5555556	0,8235294
0,4705882	0,4705882	0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,5555556
0,6666667	0,5555556	0,4210526	0,5263158	0,5	0,5263158
0,7058824	0,7058824	0,4444444	0,6666667	0,5263158	0,7777778
0,5714286	0,5714286	0,4545455	0,6363636	0,6086957	0,7272727
0,7777778	0,7777778	0,6315789	0,8421053	0,7	0,9473684
0,3529412	0,3529412	0,4444444	0,5555556	0,5263158	0,4444444
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,6666667
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,6315789	0,6	0,6315789
0,7777778	0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,6	0,7368421
0,7058824	0,7058824	0,5555556	0,7777778	0,6315789	0,8888889
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,7	0,7368421
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,7	0,7368421
0,7058824	0,7058824	0,5555556	0,7777778	0,6315789	0,8888889
0,3333333	0,3333333	0,4210526	0,5263158	0,5	0,4210526
0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,6315789	0,6	0,7368421
0,75	0,75	0,4705882	0,5882353	0,5555556	0,7058824
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,6	0,7368421
0,5714286	0,5714286	0,4545455	0,5454545	0,6086957	0,6363636
0,7058824	0,7058824	0,5555556	0,6666667	0,6315789	0,7777778
0,7777778	0,7777778	0,5263158	0,6315789	0,7	0,7368421
0,6315789	0,6315789	0,7	0,7	0,6666667	0,7
0,7368421	0,6315789	0,7	0,7	0,6666667	0,7

0,7777778	0,7777778	0,6315789	0,8421053	0,7	0,9473684
0,8421053	0,7368421	0,6	0,7	0,6666667	0,8
0,7	0,8	0,5714286	0,6666667	0,7272727	0,7619048
0,7368421	0,7368421	0,6	0,8	0,7619048	0,9
0,7368421	0,7368421	0,5	0,6	0,5714286	0,7
0,7777778	0,7777778	0,5263158	0,6315789	0,6	0,7368421
0,5263158	0,5263158	0,6	0,6	0,6666667	0,6
0,7368421	0,7368421	0,6	0,8	0,6666667	0,9
0,6315789	0,6315789	0,5	0,7	0,5714286	0,8
0,6666667	0,6666667	0,5454545	0,7272727	0,6086957	0,8181818
0,6666667	0,6666667	0,5454545	0,7272727	0,6086957	0,8181818
0,6666667	0,6666667	0,5454545	0,7272727	0,6086957	0,8181818
0,7619048	0,6666667	0,5454545	0,6363636	0,6086957	0,7272727
0,625	0,625	0,7058824	0,7058824	0,6666667	0,7058824
0,8	0,8	0,5	0,625	0,5882353	0,75
0,8888889	0,7777778	0,6315789	0,7368421	0,7	0,8421053
0,6	0,6	0,4761905	0,6666667	0,5454545	0,7619048
0,3	0,3	0,3809524	0,4761905	0,3636364	0,4761905
0,5882353	0,5882353	0,4444444	0,6666667	0,5263158	0,7777778
0,7058824	0,7058824	0,5555556	0,6666667	0,6315789	0,7777778
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5263158	0,5	0,6315789
0,7368421	0,7368421	0,6	0,8	0,6666667	0,9
0,6666667	0,5555556	0,4210526	0,5263158	0,5	0,5263158
0,6666667	0,6666667	0,4210526	0,5263158	0,6	0,6315789
0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,6315789	0,6	0,7368421
0,7	0,7	0,5714286	0,6666667	0,7272727	0,7619048
0,6315789	0,6315789	0,6	0,8	0,7619048	0,8
0,7368421	0,7368421	0,6	0,7	0,7619048	0,8
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5263158	0,5	0,6315789
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,6666667	0,6315789	0,6666667
0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,6315789	0,6	0,6315789
0,5882353	0,5882353	0,3333333	0,4444444	0,4210526	0,5555556
0,4444444	0,4444444	0,3157895	0,4210526	0,5	0,5263158
0,6666667	0,6666667	0,5	0,625	0,5882353	0,75
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,6666667	0,7368421	0,6666667

0,625	0,625	0,4705882	0,5882353	0,5555556	0,7058824
0,4705882	0,4705882	0,4444444	0,5555556	0,5263158	0,5555556
0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,4	0,5263158
0,5	0,375	0,2352941	0,3529412	0,3333333	0,3529412
0,4	0,5	0,3809524	0,4761905	0,4545455	0,4761905
0,5555556	0,4444444	0,4210526	0,5263158	0,5	0,5263158
0,6315789	0,6315789	0,5	0,6	0,5714286	0,7
0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,5555556	0,5263158	0,5555556
0,4285714	0,4285714	0,4	0,4	0,375	0,4
0,5263158	0,5263158	0,3	0,4	0,3809524	0,5
0,4705882	0,4705882	0,5555556	0,6666667	0,6315789	0,5555556
0,4705882	0,4705882	0,3333333	0,3333333	0,3157895	0,4444444

<i>V. berlandieri</i>					
1	8B				
0,8421053	1	Tel 19C			
0,8	0,7619048	1	<i>V. rip. Mandan</i>		
0,7058824	0,6666667	0,6315789	1	Na 61-99	
0,5555556	0,6315789	0,5	0,5882353	1	<i>V. rip. Baron Perrier</i>
0,6315789	0,5	0,4761905	0,6666667	0,5263158	1
0,6666667	0,6315789	0,6	0,9411765	0,5555556	0,6315789
0,6363636	0,6086957	0,6666667	0,7619048	0,5454545	0,5217391
0,8421053	0,8	0,7619048	0,8888889	0,6315789	0,6
0,4444444	0,4210526	0,4	0,3529412	0,6666667	0,3157895
0,6666667	0,7368421	0,6	0,5882353	0,5555556	0,4210526
0,6315789	0,6	0,6666667	0,4444444	0,4210526	0,4
0,8421053	0,7	0,6666667	0,5555556	0,4210526	0,5
0,7777778	0,7368421	0,7	0,8235294	0,5555556	0,5263158
0,7368421	0,7	0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,5
0,7368421	0,7	0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,5
0,7777778	0,7368421	0,7	0,8235294	0,5555556	0,5263158
0,4210526	0,4	0,3809524	0,3333333	0,6315789	0,3
0,7368421	0,8	0,6666667	0,6666667	0,6315789	0,5
0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,625	0,3529412	0,4444444
0,7368421	0,7	0,7619048	0,5555556	0,4210526	0,4
0,6363636	0,6086957	0,6666667	0,4761905	0,3636364	0,4347826
0,7777778	0,7368421	0,7	0,5882353	0,4444444	0,5263158
0,7368421	0,7	0,6666667	0,6666667	0,4210526	0,5
0,7	0,6666667	0,6363636	0,5263158	0,5	0,4761905
0,8	0,6666667	0,6363636	0,5263158	0,5	0,5714286

0,8421053	0,8	0,7619048	0,7777778	0,5263158	0,5
0,9	0,7619048	0,7272727	0,6315789	0,5	0,6666667
0,7619048	0,7272727	0,6956522	0,6	0,4761905	0,4545455
0,8	0,7619048	0,7272727	0,7368421	0,5	0,4761905
0,7	0,6666667	0,7272727	0,6315789	0,4	0,5714286
0,7368421	0,7	0,6666667	0,6666667	0,4210526	0,6
0,6	0,5714286	0,6363636	0,4210526	0,6	0,4761905
0,8	0,7619048	0,7272727	0,7368421	0,5	0,5714286
0,7	0,6666667	0,6363636	0,8421053	0,6	0,5714286
0,7272727	0,6956522	0,6666667	0,7619048	0,5454545	0,5217391
0,7272727	0,6956522	0,6666667	0,7619048	0,5454545	0,5217391
0,7272727	0,6956522	0,6666667	0,6666667	0,4545455	0,5217391
0,8181818	0,6956522	0,6666667	0,5714286	0,4545455	0,6086957
0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,5	0,7058824	0,4444444
0,75	0,7058824	0,6666667	0,8	0,5	0,5882353
0,9473684	0,8	0,7619048	0,6666667	0,5263158	0,6
0,6666667	0,6363636	0,6956522	0,7	0,4761905	0,4545455
0,3809524	0,3636364	0,3478261	0,4	0,4761905	0,2727273
0,6666667	0,6315789	0,6	0,7058824	0,4444444	0,4210526
0,7777778	0,7368421	0,7	0,5882353	0,4444444	0,5263158
0,6315789	0,6	0,5714286	0,5555556	0,6315789	0,4
0,8	0,7619048	0,7272727	0,7368421	0,5	0,4761905
0,6315789	0,5	0,4761905	0,5555556	0,4210526	0,7
0,6315789	0,6	0,6666667	0,6666667	0,4210526	0,5
0,7368421	0,7	0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,5
0,7619048	0,7272727	0,6956522	0,6	0,4761905	0,4545455
0,7	0,6666667	0,6363636	0,6315789	0,5	0,4761905
0,8	0,7619048	0,7272727	0,6315789	0,5	0,4761905
0,6315789	0,6	0,5714286	0,6666667	0,5263158	0,5
0,6666667	0,6315789	0,6	0,4705882	0,4444444	0,4210526
0,6315789	0,6	0,6666667	0,4444444	0,4210526	0,4
0,5555556	0,5263158	0,5	0,5882353	0,3333333	0,4210526
0,5263158	0,5	0,5714286	0,4444444	0,3157895	0,3
0,75	0,7058824	0,6666667	0,6666667	0,5	0,4705882
0,6666667	0,6315789	0,6	0,4705882	0,4444444	0,4210526

0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,75	0,5882353	0,5555556
0,5555556	0,5263158	0,5	0,5882353	0,5555556	0,5263158
0,5263158	0,5	0,4761905	0,3333333	0,2105263	0,2
0,4705882	0,3333333	0,3157895	0,5	0,3529412	0,6666667
0,4761905	0,4545455	0,4347826	0,4	0,3809524	0,3636364
0,6315789	0,5	0,4761905	0,3333333	0,3157895	0,4
0,7	0,6666667	0,6363636	0,5263158	0,4	0,3809524
0,5555556	0,5263158	0,5	0,4705882	0,3333333	0,4210526
0,4	0,375	0,3529412	0,4285714	0,2666667	0,375
0,5	0,4761905	0,4545455	0,6315789	0,4	0,5714286
0,5555556	0,5263158	0,5	0,3529412	0,6666667	0,3157895
0,4444444	0,4210526	0,5	0,5882353	0,3333333	0,5263158

Masannes					
1	V. rup. du Lot				
0,7272727	1	23G			
0,8421053	0,7826087	1	V. cin. Barret 1		
0,3333333	0,3636364	0,4210526	1	Na 5024-9	
0,5555556	0,5454545	0,6315789	0,6666667	1	99 Richter
0,4210526	0,5217391	0,6	0,5263158	0,6315789	1
0,5263158	0,5217391	0,7	0,6315789	0,7368421	0,7
0,7777778	0,7272727	0,8421053	0,5555556	0,7777778	0,6315789
0,6315789	0,6086957	0,7	0,5263158	0,7368421	0,6
0,6315789	0,6086957	0,7	0,5263158	0,7368421	0,6
0,7777778	0,7272727	0,8421053	0,5555556	0,7777778	0,6315789
0,3157895	0,3478261	0,4	0,7368421	0,5263158	0,5
0,6315789	0,6086957	0,7	0,6315789	0,9473684	0,6
0,5882353	0,4761905	0,6666667	0,3529412	0,5882353	0,5555556
0,5263158	0,6086957	0,7	0,4210526	0,6315789	0,6
0,4545455	0,4615385	0,6086957	0,3636364	0,5454545	0,6086957
0,5555556	0,5454545	0,7368421	0,4444444	0,6666667	0,6315789
0,6315789	0,5217391	0,7	0,4210526	0,6315789	0,6
0,5	0,5	0,6666667	0,6	0,6	0,6666667
0,5	0,5	0,6666667	0,6	0,6	0,6666667

0,7368421	0,6956522	0,9	0,5263158	0,7368421	0,7
0,6	0,5833333	0,7619048	0,5	0,7	0,6666667
0,5714286	0,56	0,7272727	0,4761905	0,6666667	0,6363636
0,7	0,75	0,8571429	0,5	0,7	0,6666667
0,6	0,5	0,6666667	0,4	0,6	0,6666667
0,6315789	0,5217391	0,7	0,4210526	0,6315789	0,6
0,4	0,4166667	0,5714286	0,6	0,5	0,6666667
0,7	0,6666667	0,8571429	0,5	0,7	0,6666667
0,8	0,75	0,8571429	0,5	0,7	0,5714286
0,8181818	0,6923077	0,8695652	0,4545455	0,6363636	0,6086957
0,8181818	0,6923077	0,8695652	0,4545455	0,6363636	0,6086957
0,6363636	0,6153846	0,7826087	0,4545455	0,6363636	0,6086957
0,5454545	0,5384615	0,6956522	0,4545455	0,6363636	0,6086957
0,4705882	0,4761905	0,6666667	0,5882353	0,4705882	0,5555556
0,75	0,6	0,7058824	0,375	0,625	0,4705882
0,6315789	0,6086957	0,8	0,4210526	0,6315789	0,6
0,7619048	0,64	0,7272727	0,4761905	0,6666667	0,6363636
0,3809524	0,4	0,4545455	0,5714286	0,4761905	0,4545455
0,7777778	0,6363636	0,7368421	0,4444444	0,6666667	0,5263158
0,5555556	0,5454545	0,7368421	0,4444444	0,6666667	0,6315789
0,5263158	0,5217391	0,6	0,6315789	0,6315789	0,4
0,7	0,6666667	0,8571429	0,4	0,6	0,5714286
0,5263158	0,4347826	0,5	0,4210526	0,5263158	0,5
0,6315789	0,5217391	0,6	0,4210526	0,6315789	0,6
0,6315789	0,6086957	0,7	0,6315789	0,8421053	0,6
0,5714286	0,56	0,7272727	0,4761905	0,6666667	0,6363636
0,6	0,6666667	0,7619048	0,4	0,5	0,5714286
0,6	0,5833333	0,7619048	0,5	0,7	0,6666667
0,6315789	0,6086957	0,7	0,4210526	0,6315789	0,6
0,4444444	0,4545455	0,6315789	0,4444444	0,5555556	0,6315789
0,4210526	0,4347826	0,6	0,3157895	0,4210526	0,6
0,5555556	0,4545455	0,5263158	0,3333333	0,5555556	0,5263158
0,4210526	0,4347826	0,5	0,4210526	0,6315789	0,4
0,625	0,6	0,7058824	0,375	0,625	0,4705882
0,4444444	0,4545455	0,6315789	0,3333333	0,4444444	0,5263158

0,7058824	0,6666667	0,7777778	0,3529412	0,5882353	0,4444444
0,5555556	0,5454545	0,6315789	0,4444444	0,5555556	0,5263158
0,4210526	0,4347826	0,5	0,3157895	0,5263158	0,6
0,4705882	0,3809524	0,4444444	0,2352941	0,3529412	0,3333333
0,3809524	0,4	0,5454545	0,4761905	0,4761905	0,5454545
0,3157895	0,3478261	0,5	0,4210526	0,5263158	0,6
0,5	0,5	0,6666667	0,4	0,6	0,5714286
0,4444444	0,3636364	0,5263158	0,3333333	0,4444444	0,5263158
0,4	0,3157895	0,375	0,1333333	0,2666667	0,25
0,6	0,5	0,5714286	0,3	0,5	0,3809524
0,3333333	0,3636364	0,5263158	0,6666667	0,4444444	0,5263158
0,5555556	0,4545455	0,5263158	0,1111111	0,3333333	0,2105263

67B					
1	Na 5024-15				
0,7368421	1	Cina			
0,7	0,8421053	1	Rici		
0,7	0,8421053	1	1	Na 5153-48	
0,7368421	1	0,8421053	0,8421053	1	Na 5004-846
0,4	0,5263158	0,5	0,5	0,5263158	1
0,7	0,8421053	0,8	0,8	0,8421053	0,6
0,6666667	0,7058824	0,6666667	0,6666667	0,7058824	0,4444444
0,7	0,7368421	0,7	0,7	0,7368421	0,5
0,6086957	0,6363636	0,6956522	0,6956522	0,6363636	0,4347826
0,7368421	0,7777778	0,7368421	0,7368421	0,7777778	0,5263158
0,7	0,7368421	0,8	0,8	0,7368421	0,4
0,7619048	0,7	0,6666667	0,6666667	0,7	0,4761905
0,8571429	0,7	0,6666667	0,6666667	0,7	0,4761905

0,8	0,9473684	0,8	0,8	0,9473684	0,5
0,8571429	0,8	0,7619048	0,7619048	0,8	0,4761905
0,7272727	0,7619048	0,8181818	0,8181818	0,7619048	0,4545455
0,7619048	0,9	0,7619048	0,7619048	0,9	0,4761905
0,6666667	0,7	0,6666667	0,6666667	0,7	0,3809524
0,7	0,7368421	0,7	0,7	0,7368421	0,4
0,5714286	0,6	0,6666667	0,6666667	0,6	0,5714286
0,7619048	0,9	0,7619048	0,7619048	0,9	0,4761905
0,6666667	0,9	0,7619048	0,7619048	0,9	0,4761905
0,6956522	0,8181818	0,6956522	0,6956522	0,8181818	0,4347826
0,6956522	0,8181818	0,6956522	0,6956522	0,8181818	0,4347826
0,6956522	0,8181818	0,6956522	0,6956522	0,8181818	0,4347826
0,7826087	0,7272727	0,6956522	0,6956522	0,7272727	0,4347826
0,5555556	0,5882353	0,5555556	0,5555556	0,5882353	0,5555556
0,5882353	0,75	0,7058824	0,7058824	0,75	0,3529412
0,8	0,7368421	0,7	0,7	0,7368421	0,4
0,6363636	0,8571429	0,7272727	0,7272727	0,8571429	0,4545455
0,3636364	0,5714286	0,4545455	0,4545455	0,5714286	0,7272727
0,6315789	0,7777778	0,6315789	0,6315789	0,7777778	0,3157895
0,7368421	0,6666667	0,6315789	0,6315789	0,6666667	0,3157895
0,5	0,6315789	0,6	0,6	0,6315789	0,6
0,6666667	0,8	0,6666667	0,6666667	0,8	0,3809524
0,6	0,6315789	0,6	0,6	0,6315789	0,4
0,6	0,7368421	0,8	0,8	0,7368421	0,4
0,7	0,8421053	0,8	0,8	0,8421053	0,6
0,7272727	0,7619048	0,9090909	0,9090909	0,7619048	0,4545455
0,5714286	0,7	0,5714286	0,5714286	0,7	0,3809524
0,7619048	0,8	0,8571429	0,8571429	0,8	0,4761905
0,6	0,7368421	0,7	0,7	0,7368421	0,5
0,6315789	0,6666667	0,6315789	0,6315789	0,6666667	0,4210526
0,5	0,5263158	0,5	0,5	0,5263158	0,3
0,5263158	0,6666667	0,6315789	0,6315789	0,6666667	0,4210526
0,5	0,5263158	0,6	0,6	0,5263158	0,3
0,5882353	0,75	0,7058824	0,7058824	0,75	0,3529412
0,5263158	0,5555556	0,6315789	0,6315789	0,5555556	0,3157895

0,5555556	0,7058824	0,6666667	0,6666667	0,7058824	0,3333333
0,5263158	0,6666667	0,6315789	0,6315789	0,6666667	0,4210526
0,6	0,5263158	0,5	0,5	0,5263158	0,2
0,4444444	0,3529412	0,3333333	0,3333333	0,3529412	0,1111111
0,6363636	0,4761905	0,4545455	0,4545455	0,4761905	0,2727273
0,7	0,5263158	0,5	0,5	0,5263158	0,3
0,6666667	0,7	0,6666667	0,6666667	0,7	0,3809524
0,5263158	0,5555556	0,5263158	0,5263158	0,5555556	0,3157895
0,25	0,4	0,375	0,375	0,4	0,125
0,4761905	0,6	0,5714286	0,5714286	0,6	0,2857143
0,5263158	0,5555556	0,5263158	0,5263158	0,5555556	0,6315789
0,3157895	0,4444444	0,4210526	0,4210526	0,4444444	0,1052632

<i>V. rip.</i> 1G					
1	<i>Na 5153-76</i>				
0,6666667	1	<i>V. cin. Missouri</i>			
0,7	0,7777778	1	<i>V. cin. Arnold</i>		
0,6086957	0,6666667	0,6956522	1	<i>Börner</i>	
0,7368421	0,8235294	0,8421053	0,7272727	1	<i>Sori</i>
0,7	0,7777778	0,7	0,6956522	0,7368421	1
0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5833333	0,7	0,6666667
0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5833333	0,7	0,6666667

0,8	0,7777778	0,8	0,6956522	0,8421053	0,8
0,7619048	0,7368421	0,7619048	0,6666667	0,8	0,7619048
0,7272727	0,8	0,7272727	0,72	0,7619048	0,8181818
0,7619048	0,7368421	0,7619048	0,6666667	0,8	0,7619048
0,6666667	0,7368421	0,6666667	0,6666667	0,8	0,7619048
0,7	0,7777778	0,7	0,6086957	0,8421053	0,8
0,5714286	0,5263158	0,5714286	0,6666667	0,7	0,6666667
0,7619048	0,7368421	0,7619048	0,6666667	0,9	0,7619048
0,7619048	0,6315789	0,6666667	0,5833333	0,7	0,6666667
0,6956522	0,6666667	0,6956522	0,6923077	0,7272727	0,6956522
0,6956522	0,7619048	0,6956522	0,6153846	0,7272727	0,6956522
0,6956522	0,7619048	0,6956522	0,6923077	0,7272727	0,6956522
0,6956522	0,6666667	0,6956522	0,6923077	0,7272727	0,6956522
0,5555556	0,5	0,5555556	0,4761905	0,5882353	0,5555556
0,7058824	0,6666667	0,5882353	0,5	0,625	0,7058824
0,7	0,6666667	0,7	0,6086957	0,7368421	0,7
0,7272727	0,6	0,6363636	0,64	0,6666667	0,6363636
0,5454545	0,4	0,4545455	0,4	0,4761905	0,3636364
0,6315789	0,4705882	0,5263158	0,4545455	0,5555556	0,5263158
0,6315789	0,5882353	0,6315789	0,6363636	0,6666667	0,6315789
0,7	0,4444444	0,5	0,4347826	0,5263158	0,5
0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5833333	0,7	0,6666667
0,6	0,5555556	0,5	0,5217391	0,5263158	0,6
0,7	0,6666667	0,6	0,6956522	0,6315789	0,8
0,9	0,6666667	0,7	0,6086957	0,7368421	0,7
0,7272727	0,7	0,7272727	0,72	0,7619048	0,8181818
0,5714286	0,5263158	0,5714286	0,5	0,6	0,5714286
0,7619048	0,7368421	0,7619048	0,75	0,8	0,8571429
0,7	0,5555556	0,6	0,5217391	0,6315789	0,6
0,6315789	0,5882353	0,6315789	0,5454545	0,6666667	0,6315789
0,5	0,4444444	0,5	0,5217391	0,5263158	0,5
0,6315789	0,5882353	0,5263158	0,5454545	0,5555556	0,6315789
0,6	0,3333333	0,4	0,4347826	0,4210526	0,5
0,7058824	0,5333333	0,5882353	0,5	0,625	0,5882353
0,5263158	0,4705882	0,5263158	0,5454545	0,5555556	0,6315789

0,6666667	0,5	0,5555556	0,4761905	0,5882353	0,5555556
0,6315789	0,4705882	0,5263158	0,4545455	0,5555556	0,5263158
0,5	0,5555556	0,5	0,4347826	0,5263158	0,5
0,3333333	0,25	0,2222222	0,1904762	0,3529412	0,3333333
0,4545455	0,4	0,4545455	0,4	0,4761905	0,4545455
0,5	0,4444444	0,5	0,4347826	0,5263158	0,5
0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,5833333	0,7	0,6666667
0,5263158	0,5882353	0,5263158	0,4545455	0,5555556	0,6315789
0,375	0,2857143	0,25	0,2105263	0,2666667	0,375
0,5714286	0,5263158	0,4761905	0,4166667	0,6	0,5714286
0,5263158	0,4705882	0,5263158	0,4545455	0,5555556	0,5263158
0,4210526	0,3529412	0,3157895	0,3636364	0,3333333	0,4210526

<i>V. cin.</i> Barret 9		
1	420A	
0,9090909	1	<i>V. andersonii</i> Rochester

0,7619048	0,7619048	1	<i>V. berlandieri</i> <i>Resseguier</i>		
0,7272727	0,8181818	0,8571429	1	<i>Tel 112D</i>	
0,6956522	0,6956522	0,8181818	0,7826087	1	<i>Tel 9BB</i>
0,7272727	0,7272727	0,952381	0,8181818	0,7826087	1
0,6363636	0,6363636	0,7619048	0,7272727	0,6956522	0,7272727
0,6666667	0,6666667	0,8	0,7619048	0,7272727	0,7619048
0,6363636	0,6363636	0,6666667	0,6363636	0,6956522	0,6363636
0,7272727	0,7272727	0,952381	0,8181818	0,7826087	0,9090909
0,6363636	0,6363636	0,8571429	0,7272727	0,6956522	0,8181818
0,6666667	0,6666667	0,8695652	0,75	0,72	0,8333333
0,6666667	0,6666667	0,8695652	0,75	0,8	0,8333333
0,6666667	0,6666667	0,8695652	0,75	0,8	0,8333333
0,6666667	0,75	0,7826087	0,8333333	0,72	0,75
0,6315789	0,6315789	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789
0,5555556	0,5555556	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667
0,6666667	0,7619048	0,8	0,8571429	0,7272727	0,7619048
0,6086957	0,6086957	0,8181818	0,6956522	0,6666667	0,7826087
0,4347826	0,4347826	0,5454545	0,4347826	0,4166667	0,5217391
0,5	0,5	0,7368421	0,6	0,5714286	0,7
0,6	0,6	0,7368421	0,7	0,6666667	0,7
0,4761905	0,4761905	0,6	0,5714286	0,5454545	0,5714286
0,6363636	0,6363636	0,8571429	0,7272727	0,6956522	0,8181818
0,5714286	0,6666667	0,6	0,6666667	0,5454545	0,5714286
0,5714286	0,5714286	0,7	0,6666667	0,7272727	0,6666667
0,6666667	0,6666667	0,8	0,7619048	0,7272727	0,7619048
0,6956522	0,6956522	0,8181818	0,7826087	0,8333333	0,7826087
0,6363636	0,6363636	0,7619048	0,6363636	0,6086957	0,8181818
0,7272727	0,7272727	0,8571429	0,8181818	0,8695652	0,8181818
0,5714286	0,5714286	0,7	0,6666667	0,6363636	0,6666667
0,7	0,7	0,7368421	0,7	0,6666667	0,7
0,5714286	0,5714286	0,6	0,5714286	0,5454545	0,5714286
0,5	0,5	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6
0,3809524	0,3809524	0,5	0,4761905	0,5454545	0,4761905
0,5555556	0,5555556	0,7058824	0,6666667	0,6315789	0,6666667
0,6	0,6	0,6315789	0,6	0,6666667	0,6

0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,6315789	0,6	0,6315789
0,6	0,6	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6
0,4761905	0,4761905	0,6	0,5714286	0,6363636	0,5714286
0,3157895	0,4210526	0,3333333	0,4210526	0,3	0,3157895
0,6086957	0,6086957	0,5454545	0,5217391	0,5833333	0,5217391
0,5714286	0,6666667	0,6	0,6666667	0,5454545	0,5714286
0,6363636	0,6363636	0,7619048	0,7272727	0,6956522	0,7272727
0,7	0,7	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6
0,3529412	0,3529412	0,375	0,3529412	0,3333333	0,3529412
0,4545455	0,4545455	0,5714286	0,5454545	0,5217391	0,5454545
0,6	0,6	0,6315789	0,6	0,5714286	0,6
0,3	0,3	0,4210526	0,4	0,3809524	0,4

5C					
1	5BB				
0,8571429	1	V.ri. 1G Engers			
0,7272727	0,6666667	1	161-49C		
0,8181818	0,8571429	0,7272727	1	V. rip. 179G	
0,6363636	0,6666667	0,5454545	0,8181818	1	V. vulpina Linne
0,6666667	0,6956522	0,5833333	0,8333333	0,8333333	1
0,6666667	0,6956522	0,5833333	0,8333333	0,8333333	0,9230769
0,6666667	0,6956522	0,5833333	0,8333333	0,75	0,7692308
0,6666667	0,6956522	0,5833333	0,75	0,6666667	0,6923077
0,5263158	0,5555556	0,7368421	0,6315789	0,5263158	0,5714286
0,6666667	0,7058824	0,4444444	0,6666667	0,6666667	0,6
0,6666667	0,7	0,5714286	0,7619048	0,6666667	0,6956522
0,6956522	0,6363636	0,6086957	0,7826087	0,7826087	0,8
0,3478261	0,3636364	0,5217391	0,5217391	0,5217391	0,48
0,5	0,5263158	0,4	0,7	0,7	0,7272727
0,6	0,6315789	0,5	0,7	0,6	0,6363636
0,5714286	0,5	0,5714286	0,5714286	0,5714286	0,5217391
0,6363636	0,7619048	0,5454545	0,8181818	0,7272727	0,75
0,6666667	0,6	0,4761905	0,5714286	0,5714286	0,5217391
0,7619048	0,7	0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,6086957
0,6666667	0,7	0,5714286	0,7619048	0,7619048	0,6956522
0,6956522	0,7272727	0,6956522	0,7826087	0,6956522	0,72
0,5454545	0,5714286	0,5454545	0,7272727	0,6363636	0,6666667
0,7272727	0,7619048	0,7272727	0,8181818	0,7272727	0,75
0,5714286	0,6	0,4761905	0,6666667	0,7619048	0,6956522
0,6	0,6315789	0,6	0,7	0,6	0,6363636
0,5714286	0,5	0,5714286	0,5714286	0,4761905	0,5217391
0,6	0,6315789	0,4	0,6	0,6	0,6363636
0,3809524	0,4	0,3809524	0,4761905	0,4761905	0,4347826
0,5555556	0,5882353	0,4444444	0,6666667	0,6666667	0,6
0,5	0,5263158	0,6	0,6	0,5	0,5454545

0,5263158	0,5555556	0,4210526	0,6315789	0,7368421	0,6666667
0,5	0,5263158	0,5	0,6	0,7	0,6363636
0,4761905	0,5	0,3809524	0,5714286	0,4761905	0,6086957
0,4210526	0,4444444	0,3157895	0,4210526	0,4210526	0,3809524
0,4347826	0,4545455	0,4347826	0,5217391	0,5217391	0,56
0,4761905	0,5	0,4761905	0,5714286	0,4761905	0,5217391
0,7272727	0,6666667	0,5454545	0,7272727	0,6363636	0,6666667
0,6	0,6315789	0,5	0,6	0,5	0,5454545
0,3529412	0,375	0,2352941	0,3529412	0,3529412	0,3157895
0,6363636	0,6666667	0,4545455	0,6363636	0,6363636	0,5833333
0,5	0,5263158	0,7	0,6	0,5	0,5454545
0,4	0,4210526	0,2	0,4	0,5	0,4545455

Na 162-35					
1	110 Richter				
0,8461538	1	V. cin. Illionois			
0,6923077	0,8461538	1	Oh Budo		
0,5714286	0,5714286	0,5714286	1	1202C	
0,6	0,6	0,6	0,5333333	1	143A
0,6956522	0,6956522	0,7826087	0,6666667	0,8235294	1
0,8	0,72	0,64	0,5	0,7368421	0,7272727
0,48	0,48	0,4	0,5	0,4210526	0,4545455
0,7272727	0,6363636	0,5454545	0,4705882	0,625	0,6315789
0,6363636	0,7272727	0,7272727	0,5882353	0,625	0,7368421
0,5217391	0,5217391	0,5217391	0,6666667	0,5882353	0,6
0,75	0,75	0,6666667	0,6315789	0,6666667	0,7619048
0,5217391	0,6086957	0,6956522	0,4444444	0,5882353	0,6
0,6086957	0,6086957	0,6086957	0,4444444	0,7058824	0,6
0,6956522	0,6956522	0,6956522	0,5555556	0,7058824	0,7
0,72	0,72	0,72	0,6	0,6315789	0,7272727
0,6666667	0,6666667	0,5833333	0,6315789	0,5555556	0,6666667
0,75	0,75	0,75	0,6315789	0,6666667	0,7619048
0,6956522	0,6086957	0,6086957	0,4444444	0,5882353	0,6
0,6363636	0,6363636	0,6363636	0,5882353	0,5	0,6315789
0,5217391	0,5217391	0,6086957	0,5555556	0,4705882	0,6
0,5454545	0,5454545	0,5454545	0,3529412	0,625	0,5263158
0,4347826	0,5217391	0,5217391	0,3333333	0,4705882	0,5
0,6	0,6	0,6	0,5333333	0,7142857	0,7058824
0,5454545	0,5454545	0,5454545	0,5882353	0,5	0,6315789

0,6666667	0,5714286	0,5714286	0,5	0,6666667	0,6666667
0,6363636	0,5454545	0,5454545	0,4705882	0,5	0,5263158
0,6956522	0,6086957	0,5217391	0,3333333	0,3529412	0,5
0,3809524	0,2857143	0,3809524	0,25	0,4	0,4444444
0,56	0,48	0,48	0,4	0,3157895	0,4545455
0,5217391	0,6086957	0,6956522	0,4444444	0,3529412	0,6
0,6666667	0,6666667	0,6666667	0,5263158	0,5555556	0,6666667
0,5454545	0,5454545	0,5454545	0,4705882	0,5	0,5263158
0,3157895	0,3157895	0,3157895	0,2857143	0,4615385	0,375
0,5833333	0,5	0,5	0,3157895	0,5555556	0,4761905
0,5454545	0,5454545	0,5454545	0,7058824	0,375	0,5263158
0,4545455	0,4545455	0,4545455	0,2352941	0,5	0,4210526

157G					
1	Na 5162-98				
0,5833333	1	62G			
0,7619048	0,3809524	1	43G		
0,5714286	0,2857143	0,7777778	1	V. treleasii N29-30	
0,5454545	0,5454545	0,6315789	0,6315789	1	236-39 Gm
0,6956522	0,4347826	0,8	0,8	0,6666667	1
0,5454545	0,3636364	0,5263158	0,6315789	0,6	0,5714286
0,7272727	0,3636364	0,6315789	0,6315789	0,6	0,6666667
0,7272727	0,5454545	0,7368421	0,7368421	0,8	0,7619048
0,6666667	0,4166667	0,6666667	0,7619048	0,6363636	0,7826087
0,6086957	0,5217391	0,6	0,6	0,4761905	0,7272727
0,6956522	0,4347826	0,6	0,7	0,5714286	0,7272727
0,6363636	0,4545455	0,5263158	0,5263158	0,5	0,5714286
0,5714286	0,3809524	0,5555556	0,6666667	0,5263158	0,7
0,5454545	0,2727273	0,4210526	0,5263158	0,4	0,5714286
0,5714286	0,3809524	0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,5
0,4545455	0,2727273	0,5263158	0,5263158	0,5	0,4761905
0,6315789	0,3157895	0,625	0,625	0,5882353	0,6666667
0,4761905	0,2857143	0,4444444	0,5555556	0,4210526	0,6

0,6	0,3	0,5882353	0,5882353	0,5555556	0,6315789
0,5714286	0,3809524	0,4444444	0,4444444	0,4210526	0,5
0,5454545	0,1818182	0,5263158	0,5263158	0,3	0,4761905
0,3	0,1	0,3529412	0,3529412	0,2222222	0,3157895
0,4166667	0,25	0,3809524	0,4761905	0,2727273	0,4347826
0,4545455	0,2727273	0,4210526	0,5263158	0,3	0,4761905
0,6086957	0,3478261	0,5	0,6	0,5714286	0,6363636
0,4761905	0,2857143	0,3333333	0,4444444	0,3157895	0,5
0,3333333	0,1111111	0,2666667	0,2666667	0,25	0,3529412
0,5217391	0,2608696	0,4	0,4	0,3809524	0,4545455
0,4761905	0,4761905	0,3333333	0,4444444	0,5263158	0,5
0,3809524	0,0952381	0,3333333	0,4444444	0,3157895	0,4

112G					
1	26G				
0,7	1	110G			
0,7	0,8	1	Na 5095-4Z		
0,6363636	0,8181818	0,8181818	1	106-8MG	
0,4761905	0,4761905	0,5714286	0,6086957	1	Isabella Labrusca Var.
0,5714286	0,7619048	0,7619048	0,8695652	0,7272727	1
0,5	0,6	0,7	0,6363636	0,5714286	0,7619048
0,6315789	0,6315789	0,7368421	0,7619048	0,6	0,7
0,4	0,5	0,5	0,5454545	0,5714286	0,5714286
0,5263158	0,6315789	0,6315789	0,5714286	0,4	0,6
0,3	0,5	0,6	0,5454545	0,3809524	0,5714286
0,4705882	0,5882353	0,7058824	0,6315789	0,5555556	0,6666667
0,4210526	0,5263158	0,5263158	0,6666667	0,6	0,7

0,4444444	0,5555556	0,6666667	0,6	0,5263158	0,6315789
0,5263158	0,5263158	0,6315789	0,5714286	0,5	0,6
0,3	0,4	0,5	0,5454545	0,3809524	0,5714286
0,4444444	0,3333333	0,3333333	0,3	0,3157895	0,3157895
0,3636364	0,3636364	0,4545455	0,5	0,4347826	0,5217391
0,5	0,4	0,5	0,5454545	0,4761905	0,5714286
0,5714286	0,5714286	0,6666667	0,6956522	0,5454545	0,7272727
0,5263158	0,5263158	0,5263158	0,5714286	0,5	0,6
0,375	0,375	0,375	0,3333333	0,3529412	0,3529412
0,4761905	0,5714286	0,5714286	0,5217391	0,3636364	0,5454545
0,4210526	0,4210526	0,5263158	0,5714286	0,5	0,6
0,4210526	0,4210526	0,4210526	0,3809524	0,3	0,4

<i>V. labrusca</i> <i>Carolina</i>					
1	41B				
0,5263158	1	1103 Paulsen KI 1 G			
0,4	0,6315789	1	Tel D		
0,6315789	0,5555556	0,5263158	1	<i>V. rip.</i> <i>Klosterneuburg</i>	
0,4	0,4210526	0,4	0,4210526	1	<i>V. rip.</i> <i>Quebec 4</i>
0,5882353	0,625	0,5882353	0,625	0,5882353	1
0,4210526	0,6666667	0,6315789	0,4444444	0,5263158	0,625

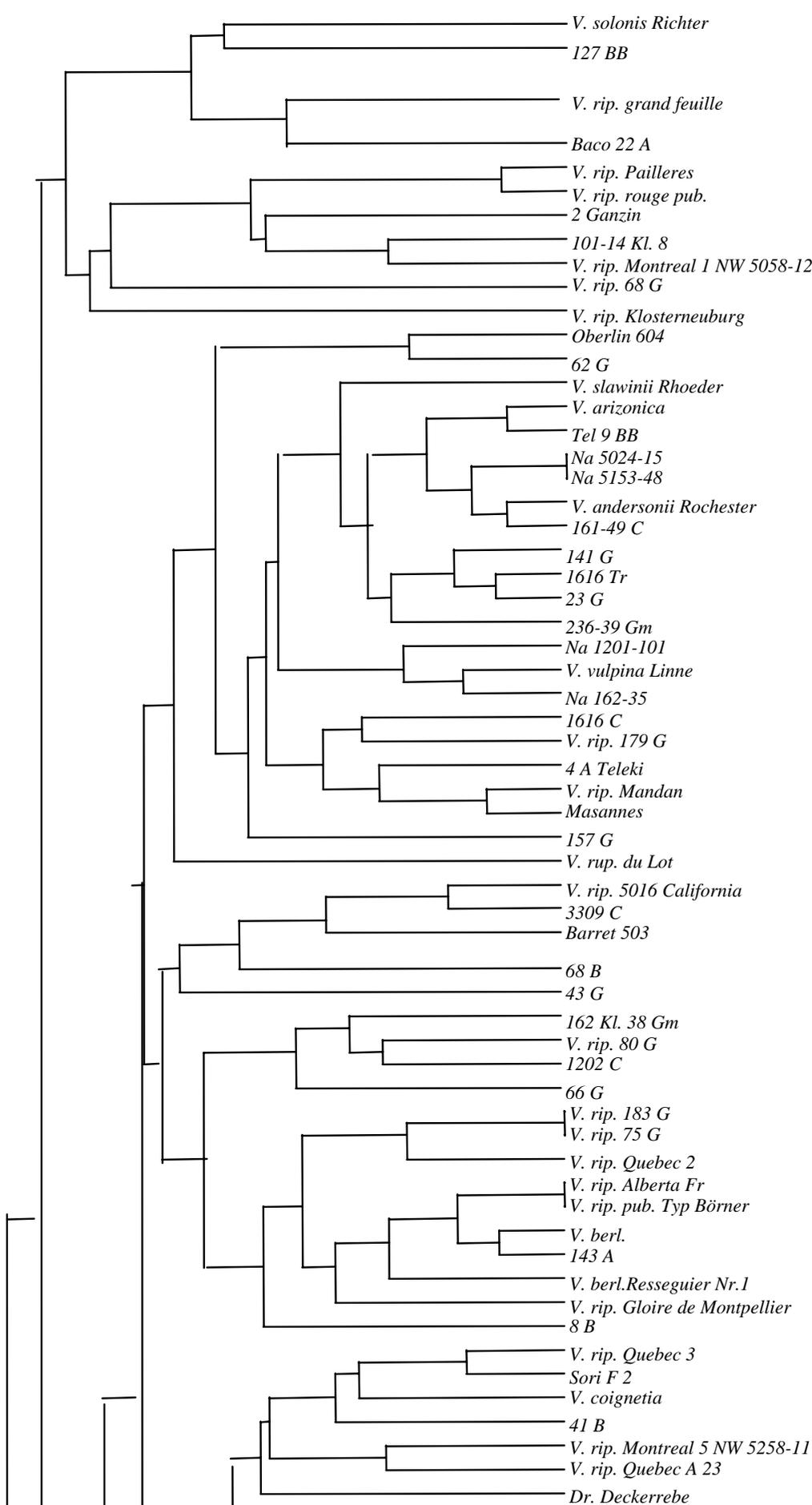
0,6666667	0,5882353	0,5555556	0,5882353	0,5555556	0,8
0,6315789	0,6666667	0,5263158	0,5555556	0,4210526	0,625
0,5	0,5263158	0,4	0,4210526	0,4	0,4705882
0,3333333	0,3529412	0,4444444	0,3529412	0,3333333	0,4
0,4545455	0,5714286	0,4545455	0,3809524	0,3636364	0,4210526
0,4	0,6315789	0,5	0,4210526	0,5	0,4705882
0,5714286	0,7	0,5714286	0,6	0,4761905	0,6666667
0,4210526	0,6666667	0,5263158	0,5555556	0,3157895	0,5
0,375	0,4	0,375	0,4	0,25	0,4615385
0,5714286	0,5	0,3809524	0,6	0,3809524	0,5555556
0,4210526	0,6666667	0,5263158	0,4444444	0,3157895	0,5
0,5263158	0,3333333	0,3157895	0,4444444	0,4210526	0,5

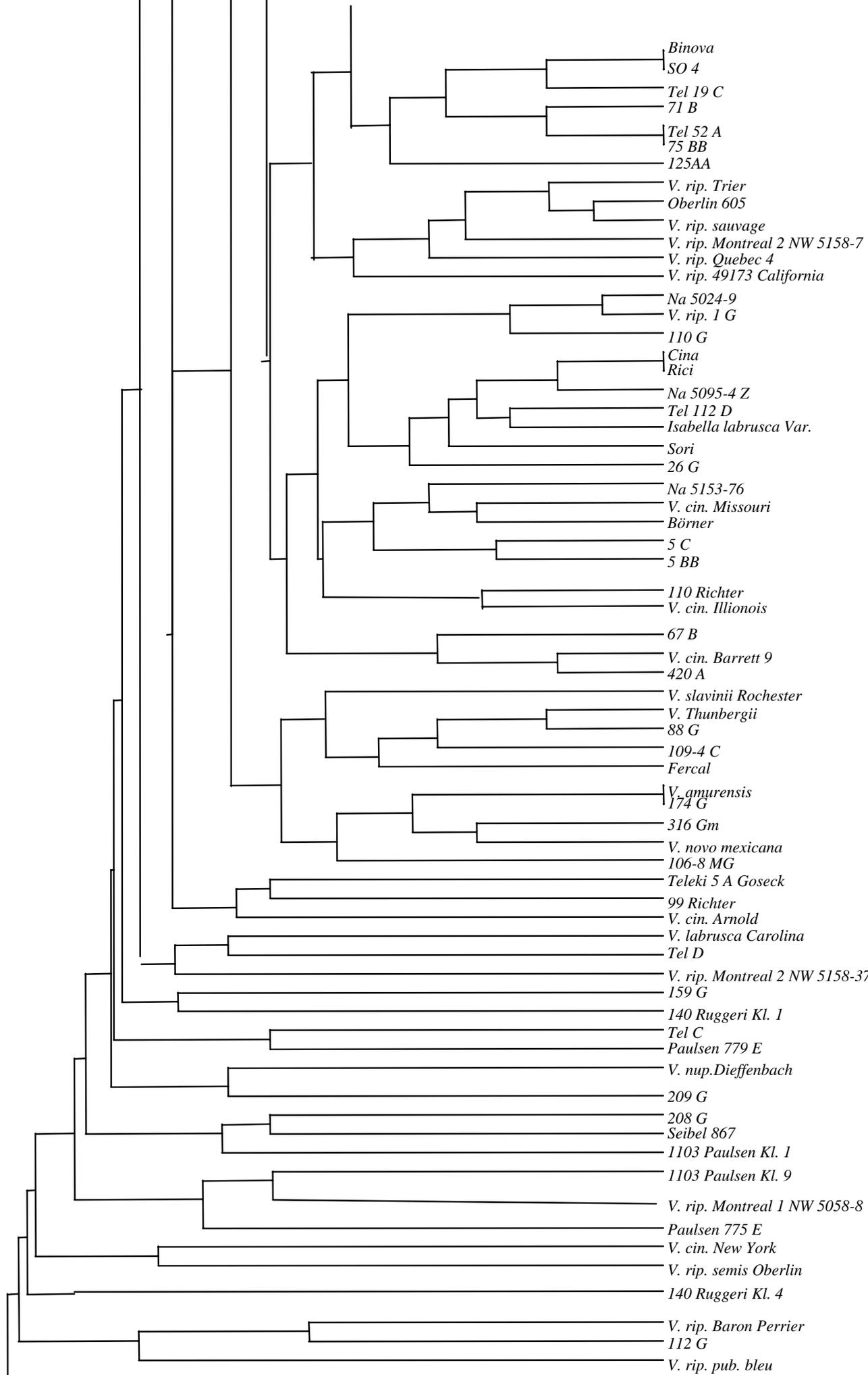
<i>Fercal</i>	
1	<i>V. rip. Montr.</i> 2NW 5158-7

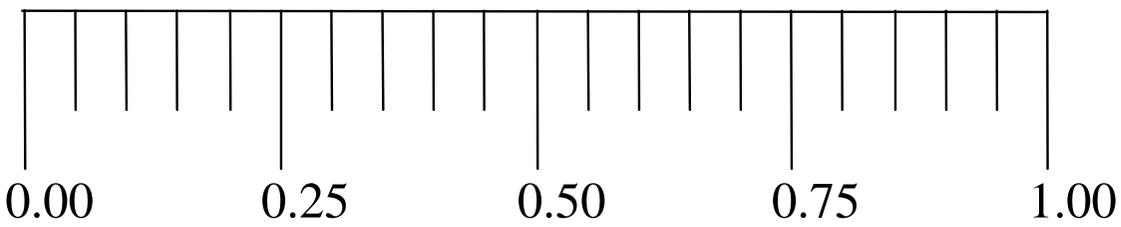
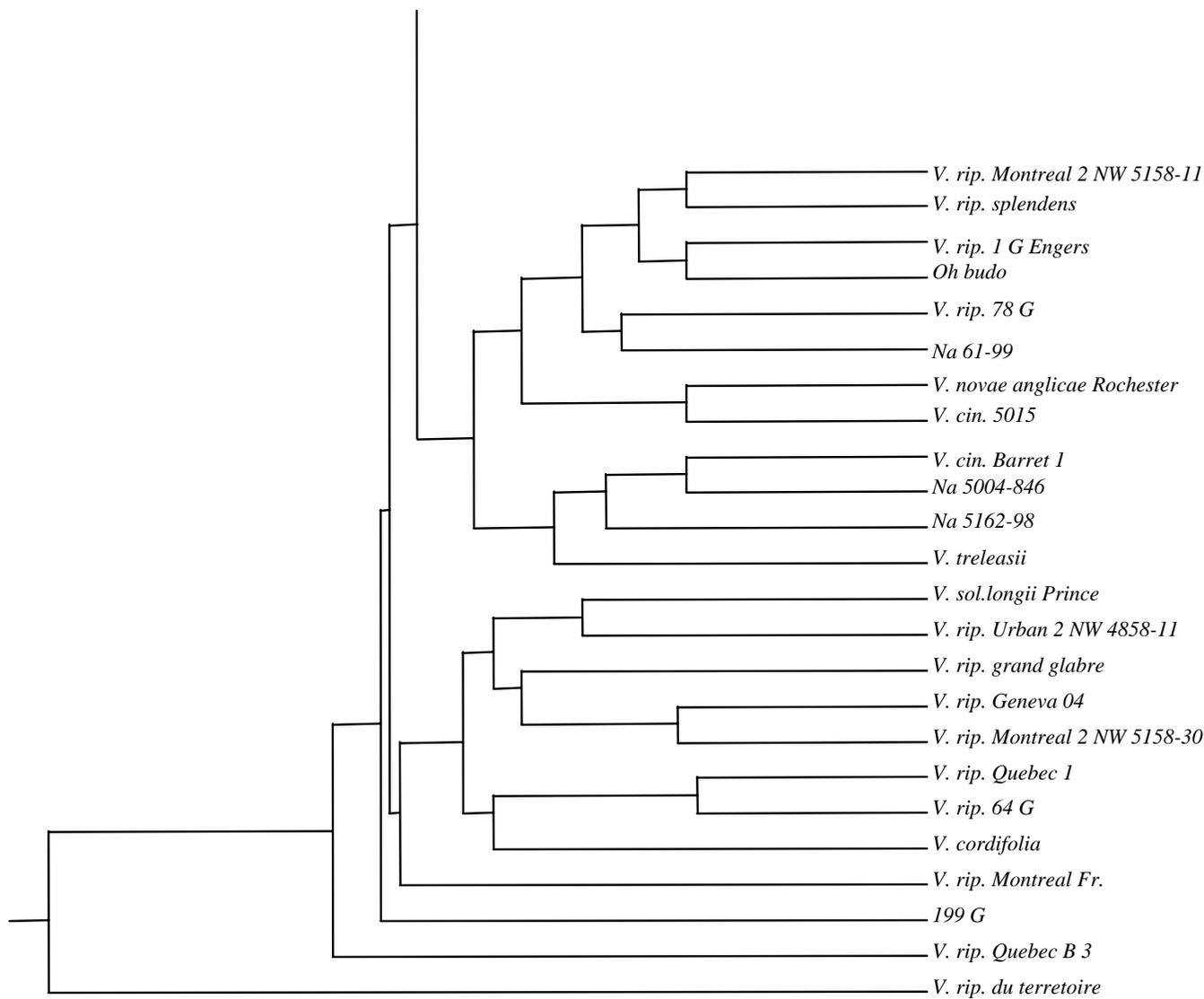
0,5882353	1	V. rip. 49173 California			
0,5555556	0,7058824	1	140 Ruggeri KI 1		
0,4210526	0,4444444	0,4210526	1	V. rip. pub. bleu	
0,3529412	0,5	0,4705882	0,2222222	1	Paulsen 775E
0,5714286	0,5	0,5714286	0,4545455	0,5	1
0,5263158	0,4444444	0,5263158	0,5	0,5555556	0,6363636
0,6	0,7368421	0,6	0,5714286	0,3157895	0,5217391
0,5555556	0,4705882	0,5555556	0,4210526	0,3529412	0,4761905
0,4	0,4285714	0,4	0,375	0,2857143	0,2222222
0,5	0,6315789	0,7	0,3809524	0,5263158	0,5217391
0,5555556	0,4705882	0,5555556	0,4210526	0,2352941	0,4761905
0,3333333	0,5882353	0,4444444	0,3157895	0,3529412	0,2857143

<i>Paulsen 779E</i>					
1	<i>V. rip. Montr. 5NW 5258-11</i>				
0,5714286	1	<i>140 Ruggeri Kl. 4</i>			
0,5263158	0,6	1	<i>V. rip. Quebec B3</i>		
0,25	0,3529412	0,5333333	1	<i>V. rip. Montr. 2NW 5158-37</i>	
0,3809524	0,5454545	0,5	0,3529412	1	<i>V. rip. splendens</i>
0,5263158	0,6	0,5555556	0,2666667	0,4	1
0,2105263	0,4	0,3333333	0,5333333	0,5	0,2222222

<i>V. rip. semis</i> <i>Oberlin</i>	
1	<i>V. rip. Quebec</i> <i>A</i>







Koeffizient DICE