

**„Genetische Kartierung und QTL-Analyse agronomischer  
Eigenschaften der Weinrebe unter besonderer  
Berücksichtigung der Pilzresistenz“**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

Birgitta Fischer

geb. am 16. Dezember 1970 in Ottweiler

Mainz, 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 2005

Gewidmet meinen Eltern, meinen Freunden  
und allen anderen, die gern ein gutes Glas Wein trinken.

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....	vii
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....	ix
1 AUFGABENSTELLUNG .....	1
2 EINLEITUNG .....	2
2.1 Wildformen der Weinrebe <i>Vitis vinifera</i> , ihre Verbreitung und Anpassungsfähigkeit .....	2
2.2 Problematik des Einsatzes von Pflanzenschutzpräparaten als sachliches Argument für die Resistenzzüchtung .....	2
2.3 Begründung der Resistenzzüchtung und erste Erfolge .....	3
2.4 Genetische Ressourcen für die Züchtung und ihre Charakterisierung durch molekulare Marker .....	5
2.5 Genetik der Weinrebe und züchtungsrelevante Aspekte .....	5
2.6 Sortenentwicklung am Beispiel von ‘Regent‘ .....	6
2.7 Vom molekularen Marker zum Ziellocus .....	7
2.8 Grundlagen der genetischen Kartierung .....	8
2.8.1 Erweiterung der Mendelgenetik durch die Konzepte der Kopplung und Rekombination .....	8
2.8.2 Statistische Verfahren der Kopplungsanalyse und der genetischen Kartierung .....	8
2.8.3 Zweipunktanalyse und Mehrpunktanalyse .....	9
2.8.4 Kartierungsfunktionen .....	10
2.8.5 Die Double-Pseudotestcross-Methode – ein strategisches Modell .....	11
2.8.6 Erleichterte Anwendung biometrischer Schätzverfahren durch Software für die Kartierung ..	12
2.9 Bedeutung molekularer Markerkarten .....	12
2.10 Molekulare Markerentwicklung für die Kartierung der Weinrebe .....	12
2.10.1 Genotypisierung anhand von Mikrosatellitenmarkern .....	13
2.10.2 Notwendige Vorarbeiten zu einer Mikrosatelliten-Analyse .....	14
2.10.3 Genotypisierung durch AFLP-Analyse .....	15
2.10.4 Von der Markerkarte zur Analyse von QTL .....	15
2.11 Quantitative Genetik .....	16
2.11.1 Untersuchungsmodelle quantitativ variierender Merkmale .....	16
2.11.2 Eigenschaften, die durch Quantitative Trait Loci (QTL) zu beschreiben sind .....	17
2.11.3 Abschätzung der Heritabilität .....	18
2.11.4 Intervallkartierung von QTL und Maximum Likelihood-Methode .....	18
2.12 Markergestützte Züchtung – theoretische Kriterien und praktische Umsetzung .....	19
2.12.1 Phänotypische Selektion (PS) und Markergestützte Selektion (MAS) .....	19
2.12.2 Nutzung der MAS zur Erzeugung erwünschter Genotypen („Genotype Construction“ oder „Gene Stacking“) .....	20
2.12.2.1 Genotype Construction auf Monogen-Ebene .....	20
2.12.2.2 Genotype Construction auf QTL-Ebene und MAS-kontrollierte Weitergabe von QTL .....	21
2.12.3 Begleitende Forschung .....	22
2.13 Charakterisierung des Genoms der Weinrebe: Ausgangssituation .....	22
2.14 Hintergrund: Wichtige Schadpilze der Rebe .....	23
2.14.1 <i>Botrytis Cinerea</i> - Grauschimmel .....	23

2.14.2	<i>Plasmopara viticola</i> - Falscher Mehltau .....	23
2.14.3	<i>Uncinula Necator</i> ( <i>Oidium tuckeri</i> ): Echter Mehltau .....	24
2.15	Abwehr von Phytopathogenen und Resistenz .....	25
2.15.1	Präformierte morphologische Barrieren .....	25
2.15.2	Resistenzfaktoren und induzierbare Mechanismen pflanzlicher Pathogenabwehr .....	25
2.15.3	Coevolution und Interaktion pflanzlicher Wirt-Parasit-Systeme .....	26
2.15.4	Pathogenperzeption .....	26
2.15.4.1	Verifizierung und Übertragbarkeit des <i>R</i> -Gen/ <i>Avr</i> -Gen-Modells .....	27
2.15.4.2	Klassifikation von <i>R</i> -Genen und Organisation komplexer Loci als Resistenzgencluster .....	27
2.15.5	Elicitierung .....	29
2.15.6	Frühe Reaktionen der Abwehr .....	29
2.15.7	Hypersensitive Reaktion und programmierter Zelltod .....	30
2.15.8	Die Rolle von Homöostasis und Stoffwechselmodulation bei der Abwehr .....	31
2.15.9	PR („pathogenesis related“) - Proteine .....	31
2.15.10	Die Rolle von Phytoalexinen und der Phenylpropanoidstoffwechsel .....	32
2.15.11	Pathogeninduzierte Promotorboxen .....	34
2.15.12	Induzierte morphologische Barrieren .....	35
2.15.13	Lokale Resistenz .....	36
2.15.14	Systemische erworbene Resistenz .....	36
2.15.15	Der Brückenschlag zwischen verschiedenen Modellen ist möglich .....	37
2.15.16	Globale Untersuchungsmethoden der Resistenz .....	37
2.16	Kenntnisstand zum Pilzresistenzverhalten der Weinrebe .....	39
2.16.1	Die Resistenzausprägung der Rebe im Freiland .....	39
2.16.2	Reaktion auf Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> im Experiment .....	40
3	MATERIAL UND METHODEN .....	42
3.1	Pflanzen .....	42
3.1.1	Der weibliche Elter: ‘Regent’ .....	42
3.1.2	Der männliche Elter: ‘Lemberger’ (Synonyme ‘Limberger’, ‘Blaufränkisch’) .....	42
3.1.3	Die Kreuzungspopulation ‘Regent’ x ‘Lemberger’ .....	43
3.2	Bewertung agronomischer Eigenschaften im Freiland .....	45
3.3	Molekularbiologische Methoden .....	46
3.3.1	Präparation genomischer DNA im Midi-Maßstab aus der Rebe .....	46
3.3.2	Normalisieren der Arbeitslösungen .....	47
3.3.3	DNA-Elektrophorese im horizontalen Agarosegel .....	47
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	49
3.3.5	PCR-Varianten .....	49
3.3.6	Primer für die PCR .....	50
3.3.7	SSR-Analyse .....	50
3.3.7.1	Spezifische Amplifikation von SSR-Loci .....	50
3.3.8	AFLP-Analyse .....	51
3.3.8.1	Vorbereitung der genomischen DNA für die AFLP-Analyse .....	52
3.3.8.2	Vorbereitung der Adaptoren .....	52
3.3.8.3	Restriktions – Ligations - („R-L“) Reaktion .....	52
3.3.8.4	Präselektive Amplifikation .....	53
3.3.8.5	Amplifikation der AFLP-Zielsequenzen .....	54
3.3.8.6	Parentalscreening zur Auswahl informativer AFLP-Primerkombinationen .....	55

3.3.9	Kartierte Marker, die nicht im Rahmen der Dissertation entwickelt wurden .....	57
3.3.10	Kapillargelelektrophorese mit dem ABI Prism GA 310 .....	57
3.3.10.1	Probenvorbereitung für die Fragmentanalyse.....	57
3.3.10.2	Denaturierende Fragmentanalyse auf dem ABI Prism GA 310 .....	58
3.3.10.3	Verwendung der <i>Genescan</i> <sup>TM</sup> Analyse-Software.....	59
3.3.10.4	Editieren von Daten in <i>Genotyper</i> <sup>TM</sup> .....	60
3.3.11	Denaturierende Polyacrylamid (PAA-) Gele.....	60
3.3.11.1	Vorbereitung der Glasplatten für die PAA-Gelelektrophorese.....	61
3.3.11.2	Herstellen des Polyacrylamidgels.....	61
3.3.11.3	Vertikale PAA-Gelelektrophorese und Färbung .....	62
3.3.12	Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus einer Gelmatrix .....	63
3.3.13	Standard-Ethanol-fällung.....	64
3.3.14	DNA-Sequenzierung .....	65
3.3.15	Southern Blot - Hybridisierung .....	66
3.3.15.1	Grundprinzip des Southern Blot.....	66
3.3.15.2	Dot Blot.....	66
3.3.15.3	Herstellen eine Digoxigenin-markierten Sonde für die Hybridisierung .....	66
3.3.15.4	Blotvorbereitungen.....	67
3.3.15.5	Durchführung des Southern Blot.....	67
3.3.15.6	Sondenhybridisierung.....	68
3.3.15.7	Detektion .....	68
3.3.16	PCR-Walking.....	69
3.3.16.1	Grundprinzip .....	69
3.3.16.2	PCR-Walking mit dem GenomeWalker <sup>TM</sup> Kit.....	70
3.3.16.3	Analyse der Walking-Ausgangsfragmente.....	71
3.4	Vorgehensweise bei Markererfassung und Kartierung.....	72
3.4.1	Tabellarische Markererfassung und Erstellen einer Verrechnungsmatrix.....	72
3.4.2	Mendelgenetik und Verteilungsfälle .....	73
3.4.3	Verrechnung der Markerinformation durch JoinMap®3.0 und MAPMAKER/EXP3.0.....	74
3.4.3.1	Genotypen-Codierung für die Verrechnung in JoinMap®3.0 .....	74
3.4.3.2	Genotypen-Codierung für die Verrechnung in MAPMAKER/EXP3.0 .....	75
3.4.3.3	Stringenter Test auf Mendel'sche Segregation ( $\chi^2$ -Test) .....	75
3.4.3.4	Erzeugung der MAPMAKER/EXP3.0-Quelldatenformate.....	76
3.4.3.5	Rahmenkriterien und Kartierung.....	76
3.4.3.6	Umsetzung und Darstellung der Kartierungsergebnisse.....	76
3.5	QTL-Analyse und Darstellung kartierter quantitativer Merkmale.....	77
3.6	Sequenzanalyse mit Bioinformatik - Tools.....	77
3.6.1	BLAST (Basic local alignment search tool, ALTSCHUL et al., 1990, 1997) .....	77
3.6.2	Motivalignments mit MAST 3.0 1.1.1 („Motif Alignment Search Tool“.....	79
3.6.3	Motivsuche mit NSITE .....	79
3.6.4	Vorhersage von Genstrukturen über GenScan .....	79
3.6.5	SplicePredictor .....	80
3.6.6	Topologische Analysen an abgeleiteten Proteinsequenzen .....	80
3.6.6.1	Targeting-Vorhersage über PSORT .....	80
3.6.6.2	Vorhersage von Sekundärstrukturen auf Proteinebene.....	80
3.6.7	Bioinformatikprogramme und Vorgehensweise bei der Analyse im Überblick.....	81
4	ERGEBNISSE.....	83
4.1	Auswertung von Felddaten .....	83
4.1.1	Jahreszeitliche Besonderheiten des Klimas im Untersuchungszeitraum .....	83
4.1.2	Merkmalskonstanz und Variation in den Bonituren.....	84
4.2	Markerentwicklung und molekularbiologische Genotypisierung.....	86

4.2.1	SSR-Genotypisierung.....	86
4.2.1.1	Optimierung der PCR-Bedingungen .....	86
4.2.1.2	Durchsatzsteigerung durch „Multiplex“- Methoden kann problematisch sein .....	86
4.2.1.3	Verwendbarkeit der SSR-Primer für ‘Regent’ x ‘Lemberger’ im Parentalscreening .....	87
4.2.2	Etablierung der AFLP-Markererfassung .....	89
4.2.2.1	Probenvorbereitung und Analyseläufe im ABI Prism GA 310 .....	89
4.2.2.2	AFLP-Primerauswahl für die Charakterisierung der Kreuzungspopulation.....	90
4.2.3	Markernomenklatur.....	92
4.3	Ergebnisse der Kartierung .....	93
4.3.1	Charakterisierung der erhaltenen Karten.....	93
4.3.2	Kopplungsgruppendefinitionen, IGGP-Abgleich und Harmonisierung .....	94
4.3.3	Integrierte Kopplungsgruppen.....	98
4.3.4	Wechselnde Markerpositionierung („Dreher“) im Vergleich der separaten mit den integrierten Karten .....	98
4.3.5	Informationsgewinn durch die Berücksichtigung von MAPMAKER/EXP3.0 .....	100
4.4	Ergebnisse der QTL-Analyse weinbaulicher Eigenschaften .....	102
4.4.1	In der Kreuzungspopulation festgestellte quantitative Major QTL-Effekte .....	104
4.4.2	Genauere Betrachtung signifikanter QTL – Effekte.....	107
4.4.2.1	Kopplungsgruppen mit Resistenz-QTL .....	107
4.4.2.2	Multiple Resistenzregionen.....	111
4.4.2.4	QTL zu Reife und Ertragsfaktoren .....	111
4.5	Isolierung und Bearbeitung von AFLP-Markerbanden aus QTL-Bereichen .....	116
4.6	Sequenzierung isolierter AFLP-Fragmente .....	116
4.7	Datenbankrecherchen mit Sequenzen isolierter AFLP-Fragmente in BLAST .....	117
4.8	Exemplarische Darstellung der AFLP-Fragmentanalyse am Beispiel des Markers R8.266.....	119
4.8.1	Isolierung des Fragments R8.266 .....	119
4.8.2	Direktsequenzierung des amplifizierten Isolats und Analyse mittels BLAST .....	120
4.8.3	Herstellung einer Sonde aus AFLP R8.266 für die Southern Blot Analyse .....	120
4.8.4	Dot Blot mit der Sonde AFLP R8.266 .....	121
4.8.5	Genomischer Southern Blot .....	123
4.9	Auswertung der Sequenzen aller isolierten AFLP-Marker mit Programmen zur Motiverkennung .....	123
4.9.1	Transposon- und Retroelements Signaturen .....	123
4.9.2	Statistische Analyse mit MEME/MAST/BLOCKS zum Auffinden repetitiver Motive .....	125
4.10	ADH- (Alkoholdehydrogenase-) ähnliche Sequenzmotive .....	125
4.11	Identifizierung von regulatorischen Motiven in den Fragmentsequenzen .....	126
4.11.1	Motivanalyse des Fragments R8.266 .....	127
4.11.2	Motivanalyse des Fragments R2.177 .....	127
4.11.3	Motivanalyse des Fragments R17.186 .....	127
4.11.4	Motivanalyse des Fragments RL17.367 .....	128
4.12	PCR-Walking ausgehend von AFLP RL17.367 .....	128
4.12.1	Gewinnung von geeigneten Ausgangsfragmenten für das PCR-Walking.....	129
4.12.2	Modifikation der Walking-PCR II und Ergebnis: Acht sequenzierte Walking-Fragmente („Runs“).....	130
4.12.3	BLAST-Analysen mit Sequenzen des Walking und Identifizierung eines putativen Thioredoxins.....	131
4.12.4	Homologisierung der Walking-Fragmente und hypothetische Architektur des Locus .....	132
4.12.5	Struktur der Walking-Sequenz.....	142

4.12.6	Speziesübergreifendes Alignment miteinander assoziierter Walksequenzen.....	146
4.12.7	Parallelen am Trx-Locus zwischen <i>Vitis vinifera</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	151
4.12.8	Recherchen im TIGR Vitis vinifera Gene Index (VvGI) .....	152
4.12.8.1	Abgleich in VvGI mit Run6_367: Homologie zu EST [>grape CB972430].....	152
4.12.8.2	Abgleich in VvGI mit der Walking-Sequenzvariante Run8_12.....	153
4.12.9	Analyse verschiedener Splice-Kombinationen mit PSORT und HMMTOP.....	156
5	DISKUSSION .....	160
5.1	Molekulare Marker und Kartierung.....	160
5.1.1	Erzeugung von Mikrosatelliten-Markern .....	160
5.1.1.1	Eignung der VMC-Mikrosatelliten-Primer für ‘Regent’ x ‘Lemberger’ .....	160
5.1.1.2	PCR mit fluoreszenzmarkierten SSR-Primern .....	160
5.1.2	Verwendbarkeit der AFLP-Primer aus dem eingesetzten Plant Mapping Kit.....	159
5.2	Diskussion der Kartierungsergebnisse.....	161
5.2.1	Die molekulare Markerkarte als Voraussetzung für die QTL-Kartierung und Vergleichsstudien.....	161
5.2.2	Evaluierung der Kartierungsprogramme JoinMap®3.0 und MAPMAKER/EXP3.0.....	161
5.2.3	Stand der Kartierungsuntersuchungen gegen Ende der Dissertation .....	161
5.2.3.1	Separat erzeugte Karten beider Eltern.....	163
5.2.3.2	Die Frage der unterschiedlichen Anzahl kartierter Marker beider Eltern.....	163
5.2.3.3	Homologer Abgleich der separaten Karten beider Eltern und Fusionieren von Kopplungsgruppen .....	164
5.2.3.4	Homologisierungen mit den Kopplungsgruppen der IGGP-Referenzkarte.....	164
5.2.3.5	Erstellung einer Konsenskarte aus kombinierter Verrechnung der Markerinformation beider Eltern.....	164
5.2.3.6	Anmerkungen zur Vererbung der Beerenhautfarbe.....	165
5.2.3.7	Mit MAPMAKER/EXP3.0 zusätzlich erreichte Fortschritte .....	165
5.3	Diskussion der QTL-Ergebnisse.....	166
5.3.1	Quantitative Effekte der Resistenz.....	166
5.3.1.1	Spezifische Major-Resistenz-QTL .....	166
5.3.1.2	Organspezifische oder unspezifische Resistenz .....	167
5.3.1.3	Unspezifische und leichtere QTL-Effekte.....	168
5.3.2	Quantitative Effekte zu Reife und Ertrag .....	169
5.3.3	Diskussion überlappender QTL-Effekte .....	169
5.3.4	Resistenz und Reifeprozess weisen Berührungspunkte auf, kartieren jedoch nur teilweise zusammen .....	170
5.3.5	Nutzung von QTL zur Sicherung von Hypothesen aus Feldbeobachtungen.....	172
5.4	Ausblick für den züchterischen Nutzen der identifizierten Major QTL .....	175
5.4.1	Introgression von Major-QTL in Analogie zum „Monogen“.....	175
5.4.2	Markergestützte Lokalisierung von Resistenzloci anderer Genotypen in ‘Regent’ x ‘Lemberger’ als Möglichkeit.....	176
5.5	Diskussion der QTL-basierten Fragmentanalysen.....	176
5.5.1	Auswahlkriterien .....	176
5.5.2	AFLP-Fragmentsequenzen mit codierenden Segmenten .....	177
5.5.2.1	Analyse des AFLP-Markers R17.186 (Proteinase-/TF-Motiv) .....	177
5.5.2.2	Analyse des AFLP R8.266 (enthaltene Tag1-Homologie).....	177
5.5.3	AFLP-Fragmentsequenzen mit Motiven cis-regulatorischer Elemente.....	178
5.5.3.1	Analyse des AFLP R2.177 (vierfache E-Box, G-Box, MADS-Box u.a.) .....	178
5.5.3.2	G-Box-artige Motive [CA (A) CGTG] .....	180
5.5.3.3	Zielmotive für Homöobox-Faktoren .....	181
5.5.4	Identifikation repetitiver Motive mit MEME .....	182
5.5.4.1	Datenbankannotierte Sequenzmotive in den repetitiven Segmenten.....	183

5.5.4.2	Zwei vorsichtige Interpretationen der beobachteten Adh-Ähnlichkeiten .....	183
5.5.5	Sekundärstruktur motive auf Proteinebene .....	184
5.5.6	Analyse des AFLP-Markers RL17.367 .....	185
5.5.7	Identifizierung eines Thioredoxin-Gens über markergestütztes PCR-Walking ausgehend von AFLP-Marker RL17.367 .....	185
5.6	Aspekte zu der im PCR-Walking identifizierten Genstruktur .....	185
5.6.1	Die Thioredoxinsequenz der Rebe als mögliches Ortholog von T10P12.4 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	185
5.6.2	Entstehung und Bedeutung von Gen- und Proteinfamilien am Beispiel Thioredoxin .....	187
5.6.3	Transposonsignaturen in der Walkingsequenz .....	189
5.6.4	Vorhersage topologischer Unterschiede und Untersuchung physikalischer Parameter mit PSORT und HMMTOP .....	189
5.7	Aspekte zu Regulation und Funktion .....	191
5.7.1	Thioredoxinvarianten als Redox-/ROS-Sensoren und Stoffwechsel-Checkpoint .....	191
5.7.2	Hypothetische differentielle Regulation des Thioredoxingens der Weinrebe durch Licht, oxidativen Stress und Pathogenelicitoren .....	191
5.7.3	Thioredoxin als Schlüsselkomponente bei oxidativem Stress, Zelltod und Erhaltung der Vitalität .....	193
5.7.4	Differentielle Funktionalität von Thioredoxin-Isoformen .....	195
5.7.5	Alternative Induktionswege für Thioredoxin münden ebenfalls in Zellschutz .....	195
5.7.6	Thioredoxin und Resistenz .....	196
5.7.6.1	Thioredoxin-Peroxiredoxinsysteme, Beeinflussung durch Pathogene und Reaktion mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	196
5.7.6.2	Das Thioredoxin CITRX -ein negativer Regulator pflanzlicher Pilzresistenz?... ..	196
5.7.6.3	Möglichkeiten natürlicher negativer Regulation von Thioredoxin .....	197
5.8	Thioredoxin domänen als modulare Elemente .....	198
5.9	Kritische Betrachtungen zur Bedeutung des identifizierten Thioredoxingens .....	199
5.10	Ergänzende Betrachtungen .....	200
5.10.1	Wie aussagekräftig ist die QTL-Kartierung, wenn man auf die Identifikation von Genen abzielt? .....	200
5.10.2	Interpretation quantitativer Resistenz ausprägung und der Begriff des Kandidatengens ....	202
5.10.3	Überlegungen zu pflanzlicher Pilzresistenz .....	203
5.10.4	Übergreifende Gemeinsamkeiten im Organismenreich .....	204
5.10.5	Besonderheiten von Pflanzen .....	204
5.10.6	Ausblick .....	205
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	206
LITERATURVERZEICHNIS .....		207
ANHANG .....		221



VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AC	Accession
Adh	Alkoholdehydrogenase
AGI	Arabidopsis Gene Index
AP	Adaptorprimer
Aps	Ammoniumpersulfat
ARE	Antioxidant bzw. anaerobe Response-Element
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>avr</i>	Avirulenz
<i>Bo</i> <sup>T</sup>	Toleranz gegenüber <i>Botrytis cinerea</i>
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bs	Binding site (Zielstelle für DNA-bindende Proteine)
BSA	Bulked Segregant Analysis / bzw. in Reaktionsansätzen: Bovine Serum Albumin
Cab. Sauv.	‘Cabernet Sauvignon‘
CAPS	Cleaved amplified polymorphic region
(C-C)	Coiled-coil
<i>Cf</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>
CITRX	<i>Cf</i> -9-interacting thioredoxin
cM	Centimorgan
cv.	Cultivar
DB	Database/Datenbank
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDS	Enhanced disease susceptibility (Genbezeichnung)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERE	ethylenresponsives Element
EST	Expressed Sequence Tag
F -	forward
FBX	Ladepuffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese
GBF	G-Box-bindender Faktor
GFP	Green fluorescent protein
GGA	Geranylgeranylacetone
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GSP	Genspezifischer Primer
GI	Gene Identifier
HIP	Hsp70 interacting protein
HR	Hypersensitive Reaktion
hsp	Hitzeschockprotein
IGGP	International Grape Genome Program
Int	integriert (bezogen auf kombiniert verrechnete Kopplungsgruppen beider Eltern)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KG	Kopplungsgruppe
L, Lem	‘Lemberger‘
LRE	lichtresponsives Element
LRR	leucine-rich repeats
LG	Linkage group
LOD	Logarithm of the odds
LTR	Long terminal repeat
MM	Mapmaker
NBS	Nucleotide binding site
NIL	nah-isogene Linie
Orf	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAA	Polyacrylamid

PCR	Polymerase chain reaction
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
PICOT	Protein kinase C-interacting protein
<i>Piv<sup>R</sup></i>	Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i>
PS	Phänotypische Selektion
pru	<i>Prunus</i>
MAP	Mitogen activated protein
Mbp	Megabasenpaare
MAS	Marker Assisted Selection
MeJa	Methyljasmonat
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NBS	Nucleotide binding site
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotid(e)
Ocs	Octopinsynthase
Oe	Oechsle
OIV	Office international de la vigne et du vin
PAD	Phytoalexin deficient
PGIP	Polygalacturonase Inhibiting Protein
Pos.	Position, Nukleotidposition
PR	Pathogenesis related
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QTL	Quantitative trait locus
R-	reverse
<i>R-</i>	Resistenz-
R, Reg	‘Regent‘
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RGA	Resistenzgen-Analogen
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rounds per minute
RPP	Resistance <i>Peronospora parasitica</i> (Resistenzgenbezeichnung)
RPM	Resistance Powdery Mildew (Resistenzgenbezeichnung)
SA	Salicylic acid (Salicylsäure)
SALK	Sequence-indexed library of insertion mutations in the Arabidopsis genome
SAR	Systemic acquired resistance
SCAR	Sequence characterized amplified region
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard saline citrate (Transfer-Hochsalzpuffer)
SSR	Simple sequence repeat
STK	Serin-Threoninkinasen
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC	Tentative Contig
$T_m$	Melting temperature (Schmelzpunkt)
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Trx	Thioredoxin
<i>Un<sup>R</sup></i>	Resistenz gegen <i>Uncinula necator</i>
USF	Upstream stimulating factor
UTR	Untranslated region (untranslatierter Bereich)
UV	ultraviolett
VMC	Vitis Microsatellite Consortium
Vol.	Volumen
VvGI	Vitis vinifera Gene Index
x	„gekreuzt mit“

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

2 EINLEITUNG

Abb. 2.1	‘Regent‘, Stock des Demonstrationssortiments auf dem Gelände des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen	S. 6
Abb. 2.2	Kartierungsfunktionen nach Haldane und Kosambi.	S. 11
Abb. 2.3	Übersicht über den Polyphenol- bzw. Phenylpropanoidstoffwechsel	S. 33
Abb. 2.4	Im Freiland erfolgte Infektion mit <i>Plasmopara viticola</i> des anfälligen Kreuzungselters ‘Lemberger‘	S. 35
Abb. 2.5	(a) Plasmoparabefall, ‘Lemberger‘ (Freiland). (b), (c) ‘Regent‘ (Freiland)	S. 39
Abb. 2.6	Peroxidaseaktivität an einer Infektionsstelle	S. 40
Tab. 2-1	Entwicklung der Rebsorte ‘Regent‘	S. 6
Tab. 2-2	Pathogeninduzierte Promotorelemente an Beispielen	S. 34

3 MATERIAL UND METHODEN

Abb. 3.1	Traubenvariabilität an Beispielen der Population ‘Regent‘ x ‘Lemberger‘	S. 44
Abb. 3.2	Schema des PCR-Walking.	S. 70
Abb. 3.3	Schema einer Markermatrix-Tabelle als Datenbasis für Kartierungssoftware	S. 72
Tab. 3-1	Überblick zur Bonitur der Kreuzungspopulation ‘Regent‘ x ‘Lemberger‘ nach anerkannten OIV-Kriterien	S. 45
Tab. 3-2	Präselektive PCR, Thermocyclerprogramm	S. 54
Tab. 3-3	Touchdown PCR-Programm zur spezif. Amplifikation der AFLP-Fragmente	S. 55
Tab. 3-4	Selektive AFLP-Primer im Parentalscreening	S. 56
Tab. 3-5	Sequenzbasierte Markerentwicklung für die Kartierung von ‘Regent‘ x ‘Lemberger‘	S. 57
Tab. 3-6	Segregationstypen, Darstellung in JoinMap-Codierung	S. 74
Tab. 3-7	Übersicht öffentl. verfügbarer Datenbanken für Genom- und Proteomanalysen	S. 78
Tab. 3-8	Überblick zur Datenbank- und bioinformat. Analyse der AFLP-Sequenzen	S. 82

4 ERGEBNISSE

Abb. 4.1	Bonitur weinbaulich interessanter Merkmale am Beispiel quantitativer Resistenz gegen Echten Mehltau ( <i>Uncinula necator</i> )	S. 84
Abb. 4.2	A–D, Bonitur weinbaulich interessanter Merkmale am Beispiel der <i>Plasmopara viticola</i> – Resistenz-Erfassung: Methoden im Vergleich	S. 85
Abb. 4.3	SSR-Analyse über silbergefärbte Polyacrylamidgele	S. 89
Abb. 4.4	AFLP-Analyse mittels Kapillarelektrophorese	S. 90
Abb. 4.5	(a), (b) Homologe Kopplungsgruppen beider Eltern und (c) verbleibende Einzelkopplungsgruppen	S. 96 f
Abb. 4.6	Integrierte Kopplungsgruppen einer kombinierten Verrechnung der Markerinformation beider Eltern mit JoinMap®3.0	S. 99
Abb. 4.7	Zusätzliche Kopplungsgruppe MM R26	S. 100
Abb. 4.8	Zusätzliche integrierte Kopplungsgruppe MM Int29	S. 100
Abb. 4.9	Fusionierung von L7 und L9 durch Abgleich mit MM Int14	S. 101
Abb. 4.10	Fusionierung von L4 u. L5 durch Abgleich mit MM Int24 und JoinMap Int6	S. 102
Abb. 4.11	A-C, Major QTL – Bereiche der Resistenz und der Veraison.	S. 105f
Abb. 4.12	Major QTL-Region von ‘Regent‘ R9 für Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i> als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung	S. 107
Abb. 4.13	Major QTL-Region von ‘Regent‘ R10 für Resistenz gegen <i>Plasmopara viticola</i> als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.	S. 109
Abb. 4.14	Major QTL-Region von ‘Regent‘ R16 für Resistenz gegen <i>Uncinula necator</i> / <i>Oidium tuckeri</i> als LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung	S. 110
Abb. 4.15	Major QTL-Region von ‘Regent‘ R1 für Faktoren, die Reife und Ertrag beeinflussen könnten, dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.	S. 112

Abb. 4.16	QTL-Effekte der Kopplungsgruppe R6 dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.	S. 113
Abb. 4.17	QTL der 'Regent'-Kopplungsgruppe R11 dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung	S. 114
Abb. 4.18	QTL der 'Regent'-Kopplungsgruppe R3, dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.	S. 115
Abb. 4.19	Auftrennung von PCR-Ansätzen ausgewählter Individuen der Kreuzungspopulation mit dem Primerpaar K8 über ein 6% -iges Polyacrylamidgel.	S. 119
Abb. 4.20	Ergebnis der Analyse des AFLP-Fragments R8.266 in BLASTX.	S. 120
Abb. 4.21	Herstellung einer Sonde ausgehend von dem AFLP-Fragment	S. 121
Abb. 4.22	Schematischer Stammbaum von 'Regent'.	S. 122
Abb. 4.23	Dot Blot mit einer Sonde aus Marker R8.266 im Vergleich mit der Erfassung des Markers als AFLP-Bande.	S. 122
Abb. 4.24	MEME-„Motivdiagramme“ der isolierten und sequenzierten AFLP-Fragmente.	S. 125
Abb. 4.25	Konsensus-Sequenzen der durch MEME identifizierten Wiederholungsmotive.	S. 125
Abb. 4.26	Charakteristisches Aminosäuremotiv aus Proteinasen und Transkriptionsfaktoren in der translatierten Fragmentsequenz von R17.186.	S. 128
Abb. 4.27 (a)	PCR-Walking ausgehend von AFLP RL17.367	S. 129
Abb. 4.27 (b)	PCR-Walking ausgehend von AFLP RL17.367 (Schema)	S. 129
Abb. 4.28	Alignment der Walking-Sequenzvarianten.	S. 132ff
Abb. 4.29	Hypothetische Anordnung der Fragmente aus dem PCR-Walking.	S. 143
Abb. 4.30	Speziesübergreifendes Alignment	S. 145
Abb. 4.31	Homologieanalyse mit Run6_367 über Wu-BLAST 2.0.	S. 151
Abb. 4.32	Homologieanalyse mit Run8_12 über Wu-BLAST 2.0.	S. 152
Abb. 4.33	Vorhersage eines Proteins (GenScan) und seiner subzellulären Lokalisierung (PSORT).	S. 153
Tab. 4-1	Klimadaten der Wetterstation 9f, Geilweilerhof	S. 83
Tab. 4-2	Optimierung und Troubleshooting bei der Auswahl von SSR- Primern für ein 'Regent' x 'Lemberger'-spezifisches Testset	S. 88
Tab. 4-3	Liste selektiver AFLP-Primer.	S. 91
Tab. 4-4	Überblick molekularer Markertypen der 'Regent' x 'Lemberger'-Kartierung	S. 93
Tab. 4-5	Eigenschaften der mit JoinMap@3.0 erstellten genetischen Karten für beide Kreuzungseltern	S. 93
Tab. 4-6	Reproduzierbare QTL-Effekte der Intervallkartierung im Überblick	S. 103
Tab. 4-7	Ergebnis der Direktsequenzierung QTL-korrelierter AFLPs im Überblick	S. 117
Tab. 4-8	AFLP-Fragmentanalyse: Ergebnisse mit mit BLASTN	S. 118
Tab. 4-9	AFLP-Fragmentanalyse: Ergebnisse mit BLASTX	S. 118
Tab. 4-10	Überblick der Ähnlichkeiten zu Retroelementsignaturen in sequenzierten AFLP-Fragmenten	S. 124
Tab. 4-11	Motive mit Bezug zu Adh-Genen aus sequenzierten AFLP-Fragmenten nach NSITE-Analyse	S. 126
Tab. 4-12	Homologien der Walkingfragmente gemäß BLASTX-Analyse.	S. 130
Tab. 4-13	Erläuterungen zur Darstellung der Walking-Fragmentvarianten in Abb. 4.27	S. 131
Tab. 4-14	TBLASTX-Homologien zu Thioredoxinen von Walkingbereichen.	S. 146 ff
Tab. 4-15	Locus 1g43560 / AtTrx1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) in seiner BAC-Umgebung	S. 149
Tab. 4-16	Exons und Splice-Einheiten des Walkings im Überblick.	S. 155
Tab. 4-17	Ergebnisse der Analyse verschiedener Splice-Kombinationen mit HMMTOP und PSORT	S. 156
5 DISKUSSION		
Abb. 5.1	Ausschnitt aus der Fragmentsequenz R17.186	S. 179
Tab. 5-1	Vergleich der organotypischen LOD-Maxima für <i>Uncinula</i> ( $Un^R$ ) – und <i>Plasmopara</i> ( $Plv^R$ ) –Resistenz aus drei Erfassungsjahren	S. 166

## 1 AUFGABENSTELLUNG

Phytopathogene wie der Falsche Mehltau *Plasmopara viticola*, der Echte Mehltau *Uncinula necator* sowie der obligate Parasit *Botrytis Cinerea* erfordern auch in den Weinbaugebieten der gemäßigten Klimazonen regelmäßige Pflanzenschutzmaßnahmen, denn klassische Kultivare sind in der Regel empfindlich gegen Pilzbefall. Resistenzen kommen in für die Weinbereitung ungeeigneten Wildarten amerikanischen Ursprungs vor. Daneben stehen im Weinbau seit einigen Jahren resistente Neuzüchtungen wie 'Regent' zur Disposition. Die genetischen Grundlagen, die bei 'Regent' den resistenten Phänotyp bewirken, waren noch weitgehend unklar, als die Sorte 1996 für den Anbau zugelassen wurde. Infektionsstudien ließen anklingen, dass die hypersensitive Reaktion eine Rolle spielt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, über genetische Analysen an 153 Nachkommen aus einer Kreuzung von 'Regent' und 'Lemberger' als klassischer pilzanfälliger Sorte zu einem besseren Verständnis der natürlichen Pilzresistenz der Weinrebe beizutragen. So könnte das in Wildarten und manchen Rebsorten deutlich ausgeprägte Abwehrpotential in der Züchtung gezielter genutzt und auch über Methoden der Biotechnologie zur Stärkung der Widerstandskraft klassischer Sorten gegen Phytopathogene eingesetzt werden. Ausgangspunkt für alle genannten Vorhaben ist die Erzeugung einer dichten molekularen Markerkarte der Weinrebe. Eine solche Karte durch die Platzierung von AFLP- und codominanten Mikrosatellitenmarkern auf Kopplungsgruppen herzustellen, war Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit. Wie eine Reihe weiterer agronomisch relevanter Eigenschaften variieren auch die Pilzresistenzen in der zu untersuchenden Kreuzungspopulation quantitativ. Die Einbindung von Feldbonituren über QTL-Intervallkartierung sollte die Markerkarte „informativ“ machen, die Entwicklung von Markerscreenings ermöglichen und zur chromosomalen Lokalisierung genetischer Faktoren für weinbaulich interessante Merkmale, insbesondere Resistenzeigenschaften, hinführen. Die Identifizierung und Charakterisierung solcher Faktoren sollte über die Natur der Pilzresistenz Aufschluss geben, um darauf aufbauend dann über ihre praktische Nutzbarkeit entscheiden zu können. Die Aufgabenstellung der Dissertation umfasste auch Methodenetablierung und Optimierung bezüglich der Markerentwicklung und -erfassungsmethoden. Bei guter Reproduzierbarkeit war ein hoher Durchsatz in der Genotypisierung zu erzielen. Die Methodenwahl sollte vergleichende Studien mit weiteren Sorten auch im internationalen Rahmen ermöglichen. Alle genannten Gesichtspunkte mündeten in dem Ziel, die Umsetzung umweltfreundlicher und moderner Weinbaukonzepte effizient zu gestalten.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Wildformen der Weinrebe *Vitis vinifera*, ihre Verbreitung und Anpassungsfähigkeit

Die Gattung ‘*Vitis*‘ lässt sich entsprechend ihrer geographischen Verbreitung drei natürlichen Hauptgruppen zuordnen. Systematiker schreiben etwa 25 bis 30 Arten nordamerikanischem Ursprung zu, in etwa das Gleiche gilt für die Anzahl asiatischer Arten. Nur eine einzige Art, die ‘*Vinifera*‘, ist originär für den Raum Eurasien (vgl. OLMO, 1996), und genau diese Art hat die Entwicklung der Weinbaukultur in grundlegender Weise geprägt.

Die kontinuierliche Verbreitung der Urform ‘*Vitis vinifera sylvestris*‘ vom Rheintal über den gesamten Mittelmeerraum bis in den Kaukasus spricht für ihr flexibles Potential. Über die letzte Eiszeit hinweg hat sich die Wildrebe in Inselformen halten können. Heute jedoch ist *Vitis v. sylvestris* in Europa vom Aussterben bedroht. Als Ursachen des Bestandsrückgangs sind neben der Verdrängung der Auenwälder, der Zunahme der UV-Strahlung und dem Klimawandel vor allem die Reblaus- und Schadpilzepidemien des neunzehnten Jahrhunderts zu sehen. Evolutionäre Anpassung kann allmählichen Veränderungen der Umwelt zwar in gewissem Rahmen entgegen wirken, hat jedoch für die Reaktion auf spontan auftretende, gravierende Umweltveränderungen oder plötzliche Störungen des ökologischen Gleichgewichts kaum Bedeutung.

### 2.2 Problematik des Einsatzes von Pflanzenschutzpräparaten als sachliches Argument für die Resistenzzüchtung

Anorganischen Pflanzenschutzmitteln (kupferhaltige Präparate gegen *Plasmopara viticola*, Schwefel als klassisches *Uncinula necator/Oidium*-Fungizid, gegen *Botrytis cinerea* zugelassene „Spezialbotrytizide“, z.B. auf der Basis von Dicarboximiden; HILLEBRAND et al., 1998) ist gemeinsam, dass sie für Mensch und Umwelt nach wie vor eine Belastung darstellen. Der mit der Applikation von anorganischen Fungiziden in Kauf zu nehmende Eintrag von Schwermetallen in den Boden kann sich bei kritisch erhöhten Werten außerdem für die Rebe selbst in phytotoxischen Effekten (VOGT und GÖTZ, 1987) und Qualitätsminderung des Weins bzw. Gärhemmung (WEISS, 1992) äußern. Neben den anorganischen Pflanzenschutzmitteln existiert heute eine Reihe organischer bzw. organisch-synthetischer Fungizide. Hier unterscheidet man solche, die wie die kupferhaltigen Präparate vorbeugend eingesetzt werden und Mittel, die bei

infizierten Pflanzen in den ersten Tagen nach dem Befall eine gewisse kurative Wirkung zeigen (HILLEBRAND et al., 1998). Allerdings ist das Risiko der Ausprägung von Resistenzen gegen synthetische Präparate seitens neuer phytopathogener Pilzrassen nicht von der Hand zu weisen und mitunter höher als im Fall anorganischer Präparate. Diesbezügliche Untersuchungen liegen für *Botrytis cinerea* (GULLINO et al., 2000), *Uncinula necator* (SAVOCCHIA et al., 1998) und auch *Plasmopara viticola* (MICHELMORE et al., 1988) vor.

Die Dosierung, der Zeitpunkt und die Häufigkeit der Applikation von Pflanzenschutzmitteln spielen für ihren erfolgreichen Einsatz eine entscheidende Rolle. Doch auch bei sachgemäßer Ausbringung lässt sich in vielen Fällen lediglich eine Eindämmung der Epidemie und damit eine Schadensbegrenzung erreichen (KAST, 1996).

Wenn man zudem bedenkt, dass im Schnitt 50% der in der Landwirtschaft Europas insgesamt ausgebrachten Pflanzenschutzmittel auf den Weinbau entfallen und dort hauptsächlich zur Bekämpfung von Pilzinfektionen eingesetzt werden (REUSTLE, 2004), so wird der aktuelle Stellenwert der Resistenzzüchtung und der mit ihr befassten Grundlagenforschung deutlich.

### **2.3 Begründung der Resistenzzüchtung und erste Erfolge**

Der Ursprung der Resistenzzüchtung in Deutschland und in Europa insgesamt steht in engem Zusammenhang mit der Einschleppung von Reblaus (*Phylloxera*) und Falschem Mehltau (*Plasmopara viticola*) gegen Ende des neunzehnten Jahrhunderts. Deren schlagartige Verbreitung wirkte sich im Wildbestand wie auf Kulturflächen verheerend aus, denn die Europäerrebe besitzt, anders als amerikanische Genotypen, keine Resistenzeigenschaften gegen die genannten Schaderreger. Natürliche Resistenzen amerikanischer Wildarten der Rebe spielen seit diesem Zeitraum in Zuchtprogrammen eine wichtige Rolle, doch sind viele der geschätzten klassischen Rebsorten anfällig gegenüber den Hauptpathogenen (neben *Phylloxera*, *Plasmopara viticola* und *Uncinula necator* zählt hierzu auch der Grauschimmel, *Botrytis cinerea*).

Die erfolgreiche Züchtung widerstandsfähiger Unterlagssorten durch MILLARDET, GRASSET und RICHTER in Frankreich und durch TELEKI und KOBER in Österreich und Ungarn sowie die Weiterentwicklung amerikanischer Hybriden in Frankreich trugen entscheidend zu der erfolgreichen Bekämpfung der Reblaus bei, deren Verbreitung durch

konsequenten Pfropfrebenbau mittlerweile erheblich eingedämmt werden konnte (vgl. ALLEWELDT, 2000; HAJDU, 2000).

Erste kupferhaltige Spritzmittel wie die Bordeauxbrühe (MILLARDET, 1883) aus der Zeit der großen Epidemien erwiesen sich damals wie heute als prinzipiell wirksam gegen *Plasmopara viticola*, sind jedoch als umweltbelastend eingestuft und können bei unsachgemäßer Anwendung zu Schäden an der Pflanze führen. Heute existieren zahlreiche Pflanzenschutzmittel, die zwar ohne Schwermetalle auskommen, jedoch weiterhin als mehr oder minder nachteilig für die Umwelt einzuschätzen sind, deren Zulassung oft nur vorübergehend gilt und die auf jeden Fall beträchtliche Kosten und Arbeitsaufwand verursachen. Wäre jedoch die natürliche Pilzresistenz einer neuen Sorte ausreichend, so könnte die Applikation von Pflanzenschutzmitteln niedriger dosiert werden, eventuell vielleicht ganz wegfallen. Nach ALLEWELDT (2000) hat sich die Verwendung pilz- und schädlingsresistenter Reben zum gegenwärtigen Zeitpunkt bereits als „ökonomisch billigste und umweltpolitisch günstigste Lösung des Pflanzenschutzproblems im Weinbau“ erwiesen.

Die Resistenzzüchtung wurde im zwanzigsten Jahrhundert in Deutschland entscheidend durch HUSFELD geprägt, dessen Züchtungsstrategien auf der Gültigkeitsannahme der klassischen Vererbungslehre Gregor Mendels basierten (vgl. HUSFELD, 1932). Seine Versuche, z.B. durch freies Abblühen der Resistenzträgersorte ‘Oberlin Noir‘ gewünschte resistente Genotypen zu selektieren, brachten zunächst nicht den erwarteten Erfolg, denn die genetische Basis seines Ausgangsmaterials erwies sich als zu begrenzt (ALLEWELDT, 2000). Fortschritte auch im Bereich der Weinqualität und der Beeinflussung des Reifezeitpunkts brachte das Einkreuzen von großbeerigen Sorten (z.B. ‘Foster’s White Seedling‘) und die Erweiterung des Resistenzspektrums durch französische Hybriden in den sechziger Jahren, ebenfalls unter Beteiligung von Husfeld. Der Ursprung der Sorte ‘Regent‘, deren Resistenzeigenschaften Gegenstand dieser Arbeit sind, geht auf diese Zeit zurück.

In Deutschland wird die Resistenzzüchtung bis heute kontinuierlich weiterverfolgt, während man sie in anderen Weinbau treibenden Ländern Europas vorübergehend auch einstellte (ebd.).



## 2.4 Genetische Ressourcen für die Züchtung und ihre Charakterisierung durch molekulare Marker

Im Verlauf der Kulturgeschichte des Weinbaus wurde die durch züchterische Tradition und regionale Besonderheiten bedingte Sortenvielfalt der Gattung *Vitis* nach und nach durch Selektion und die Fokussierung auf wenige stark nachgefragte Sorten (etwa ‘Chardonnay’, ‘Cabernet Sauvignon’ oder ‘Merlot’) immer mehr eingeschränkt (DETTWEILER, 2001).

Inzwischen haben jedoch viele Weinbau treibende Länder die Notwendigkeit erkannt, Maßnahmen gegen den Trend zur Vereinheitlichung des Sortenspektrums zu ergreifen, damit die Züchtung nicht in eine Sackgasse gerät. Allgemein erlebt die Evaluierung in Vergessenheit geratener oder ungewöhnlicher Kulturarten und Sorten, die oft auch gute Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse zeigen, im Rahmen der Bemühungen um eine umweltgerechte Bewirtschaftung agronomischer Flächen eine Renaissance (vgl. z.B. MIEDANER et al., 2002; BUDEWIG und LÉON, 2002). Diese Impulse führten für die Weinrebe zu Initiativen wie dem EU-Projekt „Genres 081“ zur Erhaltung und Dokumentation des Reservoirs genetischer Ressourcen (vgl. *European Vitis-Database*: <http://dainet.de/eccdb/vitis>; Koordination unter Mitwirkung des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof).

Die Charakterisierung über molekulare Markerprofile ist für ein solches Vorhaben substanziell, denn sie erlaubt über die Bestimmung von Heterozygotiegraden und Allelfrequenzen, die Diversität eines Genpools zu inventarisieren (vgl. CUISSET et al., 1995; ARADHYA et al., 2002), Erhaltungssortimente zu rationalisieren und durch die Kontrolle von Redundanz zu repräsentativen „Core Collections“ zu verdichten. Der Abgleich mit einer genetischen Karte gewährleistet bei der Ermittlung der genetischen Diversität eine gleichmäßige Berücksichtigung aller Genombereiche.

Mittlerweile sind eine Reihe verbreiteter Unterlagssorten (WOLF et al., 2000), Wildarten (SEFC et al., 1999; AGRAWAL et al., 2003) und viele Weinrebsorten (vgl. DETTWEILER et al., 2000; RÍAZ et al. 2001) zusätzlich zu ihrer agronomischen Eignung auch durch vergleichende Mikrosatellitenstudien charakterisiert.

## 2.5 Genetik der Weinrebe und züchtungsrelevante Aspekte

Die Rebe ist diploid ( $2n=38$ ), stark heterozygot und unterliegt gleichzeitig einer ausgeprägten Tendenz zur Inzuchtdepression. Selbstung führt im Verlauf von drei bis fünf Generationen zum Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit und der Vitalität (EIBACH, pers. Mitt.). Damit ist in der Rebenzüchtung die wiederholte Rückkreuzung keine

einfache Option. Im Weinbau kommt der Klonenselektion große Bedeutung zu. Etablierte Kulturformen von *Vitis* werden vegetativ vermehrt, so sollte die Anpassungsfähigkeit einer für den Anbau selektierten Sorte bzw. eines Klons idealerweise verschiedenen umweltbedingten Wechselfällen gerecht werden können, denn Rekombination kommt jeweils nur bei der Kreuzung zur Erzeugung neuer Sorten zum Tragen.

## 2.6 Sortenentwicklung am Beispiel von ‘Regent‘

Zuchtprogramme sind im Fall der Weinrebe in zahlreichen Stufen angelegt und erstrecken sich über ca. 30 Jahre<sup>1</sup>, denn die Balancierung komplexer Merkmale (z.B. Vereinbarung eines günstigen Aromaspektrums mit Resistenzeigenschaften) ist schwierig zu kontrollieren und erfordert lange Prüfzeiträume. Die Bewertung von Eigenschaften und weinbaulicher Eignung entspricht dabei im Allgemeinen den international anerkannten Standardkriterien und den Deskriptoren des Office International de la Vigne et du Vin (OIV). Auch der Zeitraum zwischen der Beantragung des Sortenschutzes und seiner Erteilung durch das Bundessortenamt kann sich über mehrere Jahre erstrecken. In Tabelle 2-1 ist die Entwicklung der Rebsorte ‘Regent‘ dargestellt.

**TABELLE 2-1 Entwicklung der Rebsorte ‘Regent‘**

1967: Kreuzung ‘Diana‘ x ‘Chambourcin‘  
 1969: Auspflanzung im Sämlingsquartier  
 1972: Selektion des Einzelstockes  
 1973: Übernahme in die Vorprüfung  
 1981: Übernahme in die Zwischenprüfung  
 1985: Erstellung einer Versuchsanlage  
 1989: Anmeldung zum Sortenschutz und zur Eintragung in die Sortenliste  
 1994: Erteilung des Sortenschutzes  
 1995: Eintragung in die Sortenliste  
 1996: Zulassung für Qualitätsweinproduktion  
 Erteilung des europäischen Sortenschutzes

### Klassifizierung

1996: Rheinland-Pfalz  
 1997: Baden-Württemberg  
 1998: Hessen  
 1999: Unterfranken  
 2000: übrige Anbauggebiete Bayerns und Sachsen-Anhalt  
 2003: geschätzte Anbaufläche 1200 ha



**Abb. 2.1** ‘Regent‘, Stock des Demonstrations-Sortiments auf dem Gelände des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

Die in ‘Regent’ vorhandenen Resistenzen stammen ursprünglich aus früh eingekreuzten amerikanischen Wildarten. Der berüchtigte „Hybridton“, bei resistenten Neuzüchtungen der ersten Generation noch wahrnehmbar und als unerwünschtes Erbe der „Amerikanerreben“ verurteilt, führte unberechtigterweise zu zögerlicher Akzeptanz moderner resistenter Sorten (HAJDU, 2000), obwohl der Fehlton im Verlauf der Züchtung erfolgreich unterdrückt werden konnte. ‘Regent’ erfüllt alle zur Etablierung als marktgängige Rebsorte notwendigen Kriterien und kann darüber hinaus dem schon geraume Zeit anhaltenden Trend zum farbintensiven Rotwein entsprechen (vgl. RÜCKRICH, 2000). Die Anbaufläche wächst dementsprechend schnell, und ‘Regent’ werden langfristig gute Chancen prognostiziert (ebd). Für die Sorte spricht in jedem Fall, dass sie im Vergleich zu klassischen Rebsorten weitaus weniger bis gar keine Pflanzenschutzapplikationen erfordert.

Trotz vieler im Verlauf der Sortenentwicklung gewonnenen Kenntnisse sind die genetischen Grundlagen der Pilzresistenz von ‘Regent’ noch nicht aufgeklärt.

## 2.7 Vom molekularen Marker zum Ziellocus

Die Entwicklung molekularer Marker dient der Charakterisierung des Genoms, der Aufklärung der genetischen Basis phänotypischer Merkmale und letztlich der Lokalisierung von Schlüsselgenen. MASOJC et al. (2002) unterscheiden vier Strategien für die Identifizierung eines Markers („gene-tagging“), der eng gekoppelt mit einem Zielgen von agronomischem Interesse vererbt wird:

- 1) Man macht sich sogenannte nah-isogene Linien (NILs) zunutze, die sich nur durch die Allelvarianten des Zielgens einschließlich flankierender Bereiche unterscheiden.
- 2) Die zweite Strategie beruht auf Bulked Segregant Analysis (BSA) zur Identifikation von Markern in Kopplung zu einem einzelnen Gen.
- 3) Eine dritte Möglichkeit führt auf der Basis einer Kopplungskarte über die Lokalisierung von Quantitative Trait Loci (QTL; PATERSON et al., 1988) zur Identifikation molekularer Marker, die die betreffenden QTL charakterisieren, und damit zur Annäherung an Zielgene.
- 4) Die vierte Strategie verwendet ausschließlich Sequenzdaten und computergestützte vergleichende Datenbankanalysen (*ab initio* approach, THOMSON et al., 2000).

---

<sup>1</sup> Zuchtschema und Erläuterungen siehe <http://www.bafz.de/siebeldingen>

Die Erzeugung nah-isogener Linien gemäß (1) über konventionelle Kreuzung kommt aufgrund der Neigung der Rebe zu Inzuchtdepression nicht ohne weiteres in Frage. Rebklone könnten diese Rolle jedoch einnehmen. Möglichkeit (1) setzt außerdem jedoch die Kenntnis des Zielgens voraus. Bulk-Segregant-Analysen (2) werden auch an der Rebe mit Erfolg betrieben (vgl. DONALD et al., 2002), zielen jedoch meist nicht auf quantitativ variierende Eigenschaften, sondern auf die Lokalisierung eines „Monogens“.

Der Absicht vorliegender Arbeit entspricht Herangehensweise (3) am besten, da das Interesse sich nicht auf monogen vererbte Eigenschaften, sondern auf die Identifikation quantitativer Merkmalsloci und Gene an ihrer Basis richtet. Dabei soll die Einbeziehung von Methoden aus (4) die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen.

## **2.8 Grundlagen der genetischen Kartierung**

Die klassischen Lehrsätze von Gregor Mendel (Uniformitätsregel, Spaltungsregel und das Prinzip der freien Vererbung) einschließlich der Konzepte zu Dominanz und Codominanz lassen sich in ihren Grundzügen auf die Vererbung molekularer Marker anwenden (PATERSON et al., 1988), und so dienen die Segregationsverhältnisse der Mendel'schen Erbgänge als Abstraktionsmodell zur Analyse realer Populationen. Dass die Weinrebe ein diplonter Organismus ist, ist von Vorteil für die Transparenz der Segregationsanalyse.

### **2.8.1 Erweiterung der Mendelgenetik durch die Konzepte der Kopplung und Rekombination**

BATESON und PUNNETT (in SEYFFERT, 2004: S. 463) erläuterten bereits 1908, dass Gene in Nachbarschaft zueinander nicht in jedem Fall gemeinsam („gekoppelt“) weitergegeben werden, sondern mit einer berechenbaren Wahrscheinlichkeit voneinander getrennt („rekombiniert“) werden können. Die Quantifizierbarkeit von Rekombinationsereignissen stellt die Basis für Kartierungsstrategien dar.

### **2.8.2 Statistische Verfahren der Kopplungsanalyse und der genetischen Kartierung**

Mittels  $\chi^2$ -Test wird das beobachtete Spaltungsverhältnis bezüglich eines einzelnen Markerlocus zunächst stringent auf Mendel'sche Segregation untersucht, also einer 1:1- oder 3:1 Verteilungen eines heterozygoten Markers/Merkmals in der Nachkommenschaft.

Anschließende Rekombinationsanalysen werden allgemein entweder anhand von Rückkreuzungen mit einem doppelt rezessiven Individuum bzw. einer F2 vorgenommen. Erst muss der Nachweis geführt werden, dass überhaupt Kopplung vorliegt, dann kann sich die Berechnung der Rekombinationswahrscheinlichkeiten über biometrische Schätzverfahren anschließen. Wichtige Kenngröße in diesem Zusammenhang ist die Rekombinationsfrequenz  $r$ : Sie ergibt sich aus der Zahl der rekombinanten Genotypen bezogen auf die Gesamtzahl an Genotypen in der Testpopulation. Rekombinationsfrequenzen dienen als Ausdrucksmittel zur Darstellung genetischer Distanzen. Gene einer Kopplungsgruppe können auf dieser Basis in eine relative Lage zueinander gebracht werden. Eine Rekombinationsfrequenz von 0% bezeichnet absolute Kopplung, 50 % bedeutet gemäß des Schemas formal die unabhängige Verteilung, kann aber in der Realität auch eine dementsprechend weite Distanz auf dem Chromosom bedeuten. Nach dem anerkannten System von Morgan bezeichnet die Maßeinheit 1 cM [„Centimorgan“] die genetische Distanz zwischen zwei Loci, die in 1% der untersuchten Fallbeispiele aus der Nachkommenschaft rekombinieren (MORGAN, 1915).

### 2.8.3 Zweipunktanalyse und Mehrpunktanalyse

Entsprechend ihrer linearen Anordnung auf dem Chromosom sollten sich die Abstände von Genen gemäß Morgan additiv verhalten. Morgan postulierte: Je weiter zwei Genorte auseinander liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für ein Crossing Over auf dem dazwischenliegenden Chromosomenabschnitt. Darum ist es möglich, anhand von Rekombinationsfrequenzen zwischen Genen ihren relativen Abstand zueinander anzugeben. Bei bekannter linearer Abfolge dreier Loci (X–Y–Z) lässt sich anhand der Rekombinationsfrequenzen X–Y und Y–Z der Abstand X–Z vorhersagen.

Ist die Abfolge nicht bekannt, so muss man die drei Rekombinationsfrequenzen zueinander in Beziehung setzen, um den in der Mitte liegenden Locus zu identifizieren. Dies leistet die Zweipunktanalyse, während die Dreipunktanalyse die Verrechnung um die Möglichkeit der Erfassung mehrerer Crossing Over-Effekte erweitert und präzisiert. Als Maß dafür wird der Koinzidenzkoeffizient  $C$  als Quotient aus tatsächlichem und erwartetem Crossing Over verwendet:

$$C = r_{1,2} / r_1 r_2 \quad (1)$$

### 2.8.4 Kartierungsfunktionen

Das Auftreten mehrerer Crossing Over führt dazu, dass durch die beschriebenen kombinatorischen Methoden ermittelte Genabstände gegenüber der Realität etwas zu gering ausfallen.<sup>2</sup> Positionseffekte verkomplizieren die Vorhersage von Rekombinationsereignissen zusätzlich: Behindern oder begünstigen sich benachbarte Crossing Over-Möglichkeiten gegenseitig, so spricht man von positiver beziehungsweise negativer Interferenz.

Bemühungen, die tatsächlichen Verhältnisse möglichst genau wiederzugeben, haben zu der Entwicklung von pragmatischen Schätzverfahren geführt, von denen die Haldane- und die Kosambi-Methode (vgl. Abb. 2.2) im folgenden erläutert werden.

Haldane legte die Poissonverteilung (2) bei seiner Modellierung zugrunde und beschreibt die beiden Grenzfälle (Interferenz = 1 und Interferenz = 0), zwischen denen sich die Mehrzahl der experimentellen Daten einordnen lässt:

$$P_{(x)} = (\lambda^x e^{-\lambda}) / x! \quad (2)$$

Dabei symbolisiert P die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von  $x = 0,1,2,3\dots$  Ereignissen in einer Grundgesamtheit, deren Mittelwert  $\lambda$  gegeben ist mit  $x =$  Anzahl der tatsächlichen Ereignisse,  $\lambda =$  mittlere Zahl der Ereignisse und  $e =$  Basis der natürlichen Logarithmen. Ein einzelnes Crossing Over führt zu 50% Rekombination; für die Bestimmung der „Map distance d“ nach Haldane bedeutet dies  $\lambda = 2d$ , so dass für das Verhältnis zwischen beobachteter Rekombinationsfrequenz und wahrscheinlicher Map Distance d (3) gilt:

$$R = (1/2) (1 - e^{-2d}) \quad \longleftrightarrow \quad 2r = (1 - e^{-2d})$$

woraus sich d ergibt als  $d = (1/2) \{-\log_e (1 - 2r)\}$  (3)

Die Kosambifunktion interpoliert zwischen diesen beiden Grenzfunktionen über den Tangens hyperbolicus tanh unter der Annahme, dass der Koinzidenzoeffizient C (1) proportional zu der Rekombinationsfrequenz r ist und erreicht so eine Annäherung an die Wirklichkeit:

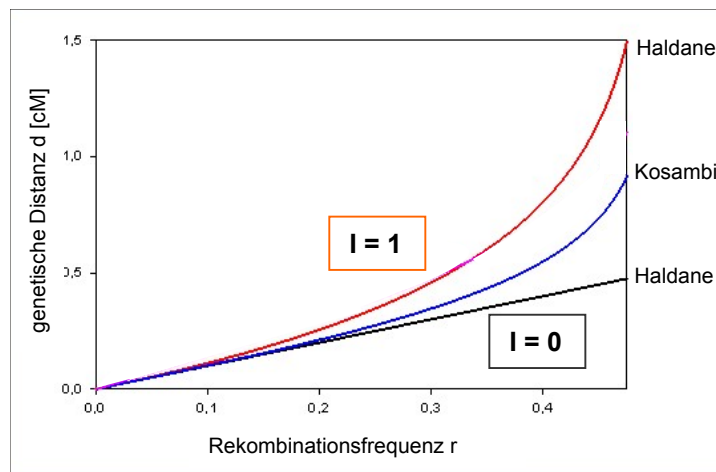
$$r = (1/2) \tanh 2d \quad (4)$$

<sup>2</sup> „Der zwischen zwei Außenmarkern direkt gemessene Abstand bleibt um das zweifache des Doppel-Crossing Overs hinter der Summe der Teilabstände zurück.“ (SEYFFERT, 1998: S. 469)

woraus sich durch Umformung ergibt:

$$d = (1/4) \{ \ln(1+r) / (1-2r) \} (5)$$

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Kartierungsergebnisse wurden anhand der Kosambifunktion (vgl. Abb. 2.2; KOSAMBI und RAGHAVACHARI, 1952) mit anschließender Zweipunkt- und Mehrpunktanalyse erzielt.



**Abb. 2.2 Kartierungsfunktionen nach Haldane und Kosambi.** Auf der Abszisse ist die beobachtete Rekombinationsfrequenz, auf der Ordinate der wahrscheinliche Abstand in cM aufgetragen. Dargestellt sind beide Grenzfälle nach Haldane für Interferenz  $I = 1$  (rot) und Interferenz  $I = 0$  (schwarz) sowie dazwischen die Schätzung nach Kosambi (blau). Darstellung in Anlehnung an SEYFFERT, 2003: S. 471.

### 2.8.5 Die Double-Pseudotestcross-Methode – ein strategisches Modell

Die Weinrebe ist als typisches Objekt der Klonenzüchtung im Hinblick auf genetische Studien nicht unproblematisch. So sind parentale Inzuchtlinien aufgrund der starken Neigung zur Inzuchtdepression nahezu unmöglich herzustellen, auch wiederholte Rückkreuzung kann schwierig werden. Eine pragmatische Lösung, Markerinformation der Weinrebe der statistischen Analyse zugänglich zu machen, bietet die Double-Pseudotestcross-Strategie (GRATTAPAGLIA und SEDEROFF, 1994; WEEDEN et al., 1998), die auf der Annahme eines hohen Heterozygotiegrades der Rebe basiert. Spalten molekulare Marker im Verhältnis 3:1, so werden die Kreuzungsnachkommen als F2 betrachtet; alternativ dazu wird modellhaft der Fall einer Rückkreuzung („Pseudotestcross“) zugrunde gelegt, um 1:1 spaltende Marker zu untersuchen. Dieser methodische Ansatz kann bei der computergestützten Kartierung molekularer Marker angewandt werden.

### **2.8.6 Erleichterte Anwendung biometrischer Schätzverfahren durch Software für die Kartierung**

Zur Umsetzung der geschilderten Kartierungsmethoden existiert heute eine Auswahl von Kartierungssoftware wie MAPMAKER/EXP3.0 (LANDER et al., 1987) oder JoinMap®3.0 (VAN OOIJEN und VOORRIPS, 2001). Beide Programme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die Segregation tabellarisch erfasster molekulare Marker einer Kreuzungspopulation und beider Kreuzungseltern zu untersuchen.

### **2.9 Bedeutung molekularer Markerkarten**

Molekulare Markerkarten sind eine wichtige Grundlage für Genomanalysen und die praktische Nutzung genetischer Information. Basierend auf der Analyse einer Kreuzungspopulation setzt sie den Rahmen für die Lokalisierung von Genen und sequenzcharakterisierten Regionen in Einzelpflanzen und bietet vergleichenden Studien eine substantielle Basis.

Die Korrelation mit Markerinformation ist für die Analyse und „Handhabbarkeit“ polygen bedingter Eigenschaften essentiell, denn solche quantitativ variierenden Merkmale erschweren bei der Rebe wie bei anderen Kulturpflanzen die Kontrollierbarkeit von langfristig angelegten Züchtungsprogrammen (DALBÓ et al., 1999).

### **2.10 Molekulare Markerentwicklung für die Kartierung der Weinrebe**

Vergleichsweise geringer Kosten- und Zeitaufwand, der geringe Bedarf an DNA und das Hochdurchsatzpotential der Analysemethode machen PCR-Marker zur Methode der Wahl, wenn es darum geht, das „Rückgrat“ einer genetischen Karte zu erarbeiten. PCR-Marker gehorchen den Mendel'schen Regeln der Vererbung einfacher Merkmale.

„Random“-Multi-Locus-Analysen wie die AFLP-Methode (ZABEAU und VOS, 1992; VOS et al, 1995) bieten aufgrund der hohen Markerfragmentausbeute Vorteile, während die Kartierung polymorpher codierender DNA-Abschnitte (z.B. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences- bzw. CAPS-Marker; KONIECZNY und AUSUBEL, 1993) zur funktionellen Interpretation bestimmter Genomabschnitte beitragen kann. Aus anonymen Markertypen wie AFLP werden i.d.R. zur Validierung, für vergleichende Studien und für Screenings sequenzcharakterisierte SCAR-Marker abgeleitet (SCAR - Sequences Characterized Amplified Region; NAQVI und CHATTOO, 1996).



Die Zuordnung von Genen zu Chromosomen und damit der intervarietale Vergleich ist letztlich erst dann sinnvoll, wenn Kopplungsgruppen reproduzierbar wiederzuerkennen sind. Chromosomen lassen sich zu diesem Zweck mittels sogenannter Ankerloci definieren, denen somit bei der Kartierung eine Schlüsselstellung zukommt. Auf der Grundlage, dass ein Ankerlocus genomweit nur an einem Genort vorkommen darf, können homologe Chromosomenpaare einander dann anhand der Anker-Allele gegenübergestellt und getrennt erstellte genetische Karten abgeglichen oder „harmonisiert“ werden. Die codominant auswertbaren Mikrosatelliten eignen sich nach einer Studie von GRANDO et al. (2003) besonders gut hierzu, zumal Mikrosatellitenloci innerhalb der Gattung *Vitis* als konserviert ausgewiesen sind (DI GASPERO et al., 2000). Sie erlauben damit die Etablierung einer allgemeinen Nomenklatur der Chromosomen der Weinrebe (vgl. RÍAZ et al., 2004).

Es lässt sich festhalten, dass AFLP- und Mikrosatellitenmarker sich bezüglich ihres Beitrags zu einer dichten und aussagefähigen genetischen Karte gegenseitig ergänzen. Deshalb lag der methodische Schwerpunkt im Rahmen dieser Arbeit auf der Integrierung dieser beiden Markertypen bei der Kopplungsanalyse der Population ‘Regent’ x ‘Lemberger’.

### **2.10.1 Genotypisierung anhand von Mikrosatellitenmarkern**

Mikrosatelliten oder SSRs (Simple Sequence Repeats; BECKMANN und SOLLER, 1990; pflanzliche SSRs: AKKAYA et al., 1992; WU et al., 1993) sind repetitive DNA-Sequenzen eines Typs, der im Tier- und Pflanzenreich gleichermaßen verbreitet ist. Mikrosatelliten neigen zur Bildung von Fragmentlängenpolymorphismen. Erklärbar ist das Zustandekommen der Hypervariabilität durch „replication slippage“ bei der mitotischen Vermehrung von Soma- und Keimzellen (SEYFFERT, 2003: S. 1043). Dabei betrifft ein Mutationsereignis meist eine einzelnes Repeat-Einheit, die neu hinzukommt oder verloren geht. Das Grundmuster von SSRs besteht aus einem bis wenigen Nukleotiden. Je nachdem, ob dieses Elementarsegment über den repetitiven Bereich hinweg exakt beibehalten wird oder Variationen aufweist, spricht man von „complete“ oder „incomplete pattern“ (THOMAS et al., 2000). Die Darstellung dieser leicht zu analysierenden diskreten Längenunterschiede macht Mikrosatelliten zum wertvollen Werkzeug für genetische Grundlagenstudien, denn sie bieten auch die Möglichkeit,

phylogenetische Entwicklungsprozesse nachzuzeichnen und Verwandtschaftsanalysen durchzuführen.

Viele taxonomische Untersuchungen an Kulturpflanzen werden gegenwärtig durch SSR-markerbasierte Untersuchungen ergänzt, um eine Vorstellung über die genetische Diversität der Varianten innerhalb einer Gattung oder Art zu gewinnen (z.B. umfassend beschrieben für *Citrus* in einem Übersichtsartikel von MOORE, 2001).

Ein Beispiel für die Weinrebe ist der Nachweis die Korrektur der Abstammung von 'Müller-Thurgau', bei dem es sich, rückschließend von SSR-Studien, um einen Nachkommen von ('Riesling' x 'Silvaner') x 'Madeleine Royale' handelt („true-to-type descent“; DETTWEILER et al., 2000). Auch Klone der Weinrebe sind durch SSR-Polymorphismen zu differenzieren (VIGNANI et al., 1996). Die Überprüfung der Authentizität von Pflanzgut ist im Fall von 'Pinot noir' und 'Chardonnay' bereits heute durch einen Schnelltest auf PCR-Basis zu einem frühen Stadium der Sämlingsentwicklung möglich (RÍAZ et al., 2001).

Für die Kartierung sind Mikrosatellitenmarker effektiv einzusetzen, weil sie codominant ausgewertet werden können und, wie es bislang scheint, meist nach dem Zufallsprinzip über das Genom verstreut vorkommt (AKKAYA et al., 1992). Bei bisher untersuchten Pflanzen ist etwa alle 200-500 kb mit einem Mikrosatellitenblock zu rechnen, dies entspricht z.B. bei *Oryza sativa* einer durchschnittlichen Dichte von ca. 6 cM (WU et al., 1993). Besonders nützlich ist auch die Identifizierung von „SSR-Inseln“ in der Nähe ansonsten polymorphismusarmer (konservierter oder regulatorischer) Bereiche (ebd.).

### **2.10.2 Notwendige Vorarbeiten zu einer Mikrosatelliten-Analyse**

Vor der SSR-Charakterisierung müssen Mikrosatellitenloci im Genom des Zielorganismus über angereicherte Banken, positive Selektionierung und Sequenzierung zunächst lokalisiert werden, bevor man dann flankierende Primer ableitet und testet (OSTRANDER et al., 1992; WU et al., 1993). In der Regel fallen methodisch bedingt viele „leere Klone“ an; bei den zunächst positiven Klonen hat man noch dazu mit Redundanz von SSR-Inserts zu rechnen (über 50%; P. ISAAK, pers. Mitt.). Die Mikrosatellitenentwicklung für die Weinrebe wurde in Kooperation von zwanzig Forschungsgruppen des *Vitis Microsatellite Consortium (VMC)* aus zehn Ländern (koordiniert von AgroGene, S.A., Moissy Cramayel, Frankreich) geleistet.

### 2.10.3 Genotypisierung durch AFLP-Analyse

Molekulare Marker des Typs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms; ZABEAU und VOS, 1992) sind sehr gut reproduzierbar<sup>3</sup> und verbinden die Verlässlichkeit der RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; MONCKTON und JEFFREYS, 1993) mit der bequemen Handhabung von PCR-Markern. Zwei universelle Ausgangsschritte, eine kombinierte Doppel-Restriktion-Adaptorligation und eine Präamplifikation, stellen einen Pool polymorpher Fragmente zur Verfügung. Durch den Einsatz verschiedener Sets selektiver Primer werden Subpopulationen von Fragmenten erzeugt, die in Elektropherogrammen gute Auflösung bei hoher Ausbeute erzielen. Sukzessive ist die Generierung und Registrierung einer großen Zahl von Polymorphismen durch Variation der selektiven Primer möglich.

Die geringe Menge von 100 - 500 ng Ausgangs-DNA, also weniger als 1/10 der für eine einzige RFLP nötigen Menge, genügt für ca. 50 selektive Multilocusreaktionen, die in Abschätzung jeweils zwischen 5 und 50 Polymorphismen erkennen lassen. Rein rechnerisch wäre die AFLP damit um vier Größenordnungen effizienter. Diese Produktivität garantiert zusammen mit der Nutzung von hochdurchsatzfähigen Geräten wie 96-Well-Thermocyclerblocks, automatischer Kapillargelelektrophorese und computer-gestützter Auswertung eine effiziente Polymorphismendarstellung. Ähnlich wie bei RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA; WILLIAMS et al., 1989; 1993) ist die AFLP-Markererzeugung von der Statistik mitbestimmt, was die Methode unvoreingenommen macht und die Wahrscheinlichkeit einer gleichmäßigen Charakterisierung des Genoms erhöht.

### 2.10.4 Von der Markerkarte zur Analyse von QTL

Im Kontext einer gleichmäßig dicht mit molekularen Markern besetzten genetische Karte guter Sättigung (d.h. mit ein bis wenigen cM als durchschnittlichem Abstand) lässt sich über statistische Bewertung quantitativer Merkmalsloci (QTL) der Zusammenhang erblicher Eigenschaften mit bestimmten Genomabschnitten aufdecken. Die Prinzipien und Voraussetzungen der QTL-Kartierung werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

---

<sup>3</sup> In einer EU-weiten, laborübergreifenden Studie zur methodenunabhängigen Reproduzierbarkeit von AFLPs ergab sich ein Wert von über 98% Konsistenz (JONES et al., 1997).

## 2.11 Quantitative Genetik

Die Grundlagen auf dem Gebiet der theoretischen quantitativen Genetik sind in den vierziger Jahren von MATHER erarbeitet worden (MATHER, 1941). Zwischenzeitlich haben die theoretischen Verfahren für die biometrische Abschätzung quantitativer Vererbung einen hohen Grad an Komplexität erreicht (vgl. LEIBENGUTH, 1982). Vereinfacht wird der Weg zur Identifizierung von quantitativen Merkmalsloci (Quantitative Trait Loci, QTL), sofern eine mit molekularen Markern besetzte genetische Karte des Untersuchungsobjektes vorliegt, die zu phänotypischen Daten in Korrelation gesetzt werden kann (PATERSON et al., 1988). Einige Forschungsansätze verfolgen das Ziel, die Grenzen der QTL-Analyse zu analysieren, denn ihre Aussagekraft kann durch schwer prognostizierbare, komplexe Wechselwirkungen, epigenetische Effekte, Pleiotropie etc. beeinträchtigt sein (LEFEBVRE und PALLOIX, 1996), besonders, wenn es, wie in Züchtungsprogrammen, um die Übertragbarkeit und Erhaltung der Ausprägung eines Merkmals geht.

CABALLERO und KNIGHTLEY (1994) weisen darauf hin, dass es in Freilandpopulationen gerade die pleiotropen Effekte sind, die für die Aufrechterhaltung eines QTL unter wechselnden Bedingungen verantwortlich sind, während BEAVIS (1994) warnt, dass schwache Effekte oft nicht ihrer Bedeutung entsprechend erkannt werden. Trotz dieser Einschränkungen erachten MITCHELL-OLDS und PEDERSEN (2001) die QTL-Kartierung als insgesamt effektivste Methode zur Untersuchung quantitativer Eigenschaften.

### 2.11.1 Untersuchungsmodelle quantitativ variierender Merkmale

Für eine Reihe wichtiger Kulturpflanzen, so auch für die Weinrebe, war der Kenntnisstand über die Vererbung quantitativer Merkmale zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch begrenzt. Gerade agronomisch interessante Eigenschaften wie Qualität, Ertrag etc. sind meist von komplexer genetischer Organisation, was ihre Untersuchung und züchterische Kontrolle erschwert, denn bei kontinuierlich variierenden Merkmalen ist es nicht ohne weiteres möglich, einen klaren Zusammenhang zu der Wirkung einzelner Allelpaare zu erkennen. Phänotypisch in Erscheinung tritt die Totalvariation zwischen den betrachteten Individuen als Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Komponenten. Gene, die sich konzentriert auf ein quantitatives Merkmal auswirken, können sich dementsprechend komplementär, modifizierend oder additiv verhalten (vgl. LEIBENGUTH, 1982: S. 91). In Abhängigkeit vom jeweiligen

physiologischen Zustand der Pflanze und umweltbeeinflusstem Feedback ist eine Variation der Zusammenwirkung über Regulationsprozesse möglich.

Angesichts der komplizierten Sachlage bemüht sich die Forschung parallel zu empirischen Züchtungsmethoden um mathematische Schätzverfahren. Die Beschreibung der komplexen Vererbung polygen bedingter Eigenschaften über statistische Methoden verläuft in Näherung über polynomische Gleichungen. Liegt keine Dominanz vor, ist eine symmetrische Binomialverteilung mit diskreten Häufigkeitswerten zu erwarten<sup>4</sup>. Mit wachsender Anzahl beteiligter Genpaare nähert sich die Darstellung der diskreten Merkmalsausprägungen in der Population der „Glockenkurve“ einer Normalverteilung an, damit werden die Varianz und das arithmetische Mittel zu charakteristischen Schätzgrößen (vgl. LORENZ, 1988). Der Modellfall polygener Merkmalsausprägung impliziert in der Regel, dass jedes der kumulativ wirkenden Allele unabhängig von seiner Zugehörigkeit zum betrachteten Locus zu genau gleichen Teilen zum Erscheinungsbild des resultierenden Phänotyps beiträgt. Darauf bauen die meisten Kartierungsalgorithmen auf, wenngleich der Zusammenhang nach WEBER (2002) in der Realität eher multiplikativer statt additiver Art ist. Die biometrischen Verfahren basieren demgemäß auf einer Idealisierung der tatsächlichen Natur polygener Merkmalsausprägung. Trotz der damit verbundenen Skepsis, besonders im Fall vergleichsweise kleiner Testpopulationen, kann die empirische Herangehensweise über molekulare Marker mit anschließender QTL-Analyse entscheidende Fortschritte bringen (MELCHINGER und UTZ, 2002).

### **2.11.2 Eigenschaften, die durch Quantitative Trait Loci (QTL) zu beschreiben sind**

Typische quantitative Merkmale agronomisch interessanter Kultivare beeinflussen den Ertrag, den Wuchs oder den Gehalt an bestimmten Inhaltsstoffen (ALLARD, 1960; PATERSON et al., 1988; WONG et al., 2004). Auch Toleranz- und Resistenzeigenschaften gegen abiotische und biotische Faktoren eignen sich für die QTL-Analyse. Solche Merkmalsgruppen zeigen bei der Weinrebe wie bei vielen anderen Kulturarten (z.B. *Zea mays*, *Solanum*) kontinuierliche Variation in der Ausprägung.

Die Untersuchung der natürlichen Resistenz der Rebe gegen phytopathogene Pilze mit den Methoden der QTL-Analyse und –kartierung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Daneben wurden auch Eigenschaften wie das Einsetzen der Reife und morphologische Kriterien (Habitus, Traubenarchitektur etc.) untersucht.

---

<sup>4</sup> Auch multiplikative statt additiver Genwirkung verursacht Asymmetrie der Verteilung.

### 2.11.3 Abschätzung der Heritabilität

Die tatsächliche Ausprägung von Merkmalen, die durch die genetische Veranlagung ihren Möglichkeitsrahmen erhält, kann mehr oder weniger den Einflüssen von Umweltfaktoren oder internen biochemischen Effekten unterliegen. Für den Erfolg einer QTL-Analyse sind besonders solche Merkmale interessant, die gute Heritabilität zeigen, also stark vom Genotyp und wenig von Umweltfaktoren (Klima, Standort u.s.w.) bestimmt werden. Dies lässt sich prüfen, indem vegetativ vermehrte, genetisch identische Pflanzen (bei der Weinrebe der Regelfall) in verschiedenen Umgebungen aufgezogen werden.

Der genetische Anteil der phänotypischen Variation wird als „Heritabilität im weiteren Sinne“ bezeichnet. Er kann durch QTL-Analyse abgeschätzt werden. Für Züchtungsvorhaben ist die „Heritabilität im engeren Sinne“ als „durch Selektion fixierbarer Anteil der erblichen Variation“ ausschlaggebend (vgl. SEYFFERT, 2003: S. 451 u. 454). Im Stammbaum der Rebsorte ‘Regent’ wurde im Vorfeld dieser Arbeit bezüglich der Pilzresistenz eine gute Heritabilität beobachtet (EIBACH et al., 1989).

### 2.11.4 Intervallkartierung von QTL und Maximum Likelihood-Methode

Anhand einer Intervallkartierung der QTL (LANDER und BOTSTEIN, 1989; YOUNG, 1996) auf der Basis einer dichten molekularen Markerkarte mit Hilfe der Maximum Likelihood-Distanz zwischen zwei Loci und der ursprünglich aus der Humangenetik<sup>5</sup> stammenden Signifikanzeinstufung über LOD-Scores (Logarithm of the Odds; MORTON, 1955: der Quotient aus der Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Effekt von einem mit dem Marker gekoppelten QTL herrührt und der Wahrscheinlichkeit, dass für diesen Marker keine Kopplung vorliegt) können Zusammenhänge zwischen Felddaten und chromosomalen Regionen analysiert werden. Gängige Darstellungsweisen bzw. Programmoptionen von Kartierungssoftware bilden einen QTL als Korrelation zwischen einem Merkmal und einer Serie gemeinsam mit ihm vererbter Marker in Form einer Kurve „entlang“ einer kartierten Kopplungsgruppe ab, wobei der Centimorganabstand zweier Marker auf dem Chromosom gegen die in diesem Intervall erzielten LOD-Scores aufgetragen ist. Diese Art der Darstellung wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählt.

---

<sup>5</sup> (HUNTLEY et al. (1966): *Heritability of intelligence*. In: MEADE, J.E., PARKERS, A. S. (eds.) *Genetic and environmental factors in human ability*: 201-218, Oliver and Boyd, Edinburgh)

## **2.12 Markergestützte Züchtung – theoretische Kriterien und praktische Umsetzung**

Die größten Hoffnungen, die sich mit der Genomkartierung und mit molekularen Markern insgesamt verbinden, richten sich auf ihren späteren Einsatz für eine effizientere Auswahl von Pflanzenmaterial für züchterische Zwecke (MELCHINGER und UTZ, 2002). Die Grundidee dabei ist, dass molekulare Marker als Merkmale oder Mendel'sche Faktoren betrachtet werden. Als Selektionskriterium für die Züchtung kann - parallel zur Bonitur äußerlich sichtbarer Eigenschaften des pflanzlichen Phänotyps - der sogenannte Markerindexwert aus einer Genotypisierung dienen (LANDE und THOMPSON, 1990).

Die vorliegende Arbeit soll zur Nutzung markergestützter Selektionsverfahren für die Weinrebe, speziell im Hinblick auf Resistenzzüchtung, einen Beitrag leisten.

### **2.12.1 Phänotypische Selektion (PS) und Markergestützte Selektion (MAS)**

Pflanzen sind von Beginn ihrer Existenz an - angefangen bei Keimfähigkeit und früher Entwicklung - unterschiedlichen Arten von natürlichem Selektionsdruck ausgesetzt, hinzu kommt die Auswahl durch den Züchter nach den Methoden der PS. Ein Züchter kann - ohne biotechnologische Analysemethoden - jedoch nur nach Kriterien bewerten, die unter praktischen Gesichtspunkten auch beurteilbar sind, d.h. existierende Unterschiede müssen sich auch phänotypisch im Bereich des „Sichtbaren“ bzw. „Messbaren“ manifestieren. Wertvolle Eigenschaften, die sich herkömmlichen Boniturverfahren der PS entziehen und damit für den gezielten Erhalt verloren sind, können durch molekulare Marker und den Ansatz der MAS („Marker Assisted Selection“) möglicherweise erfasst werden. Beispiele sind günstige genetische Konstellationen, die aber „still“ bleiben, die unter epigenetischer Kontrolle stehen oder die erst in späten Entwicklungsstadien exprimiert werden (z.B. Maskierung eines rezessiven Gens durch ein dominantes, Silencing, Reprimierung etc.). Theoretisch kann auch eine phänotypisch unattraktive Pflanze Träger interessanter Eigenschaften sein. Des weiteren ist die MAS der PS überlegen, wenn sie eine höhere Selektionsintensität erlaubt als die PS (DUDLEY, 1993).

Die Entwicklung eines Sets molekularer Marker aus der Umgebung züchterisch interessanter Genombereiche für die MAS soll helfen, die Auswahl von Zuchteltern und fortzuführenden Linien effizienter zu gestalten. Auf diese Weise wird für den Züchter die Palette der Boniturstadien durch gen- oder merkmalsgekoppelte molekulare Marker bereichert. Ein entscheidender Vorteil ist auch, dass die Bewertung anhand von Markerinformation sich vom Entwicklungsstadium der Pflanze abkoppeln lässt.

Prognosen - beispielsweise über die Traube (Dichte, Einheitlichkeit, Beerenhautfarbe und Einsetzen der Reife) oder über Resistenz – wären lange vor der Manifestation der Eigenschaften über ein bewährtes Markerset möglich, im Fall der Weinrebe schon zirka drei Jahre vor dem ersten Blühen des Stocks.

Aus züchterischer Sicht ideal wäre ein Szenario, in dem das genetische Potential bezüglich verschiedener Zuchtziele bereits Jahre vor ihrer Ausprägung über einen schnellen genetischen Fingerabdruck prognostizierbar wäre. Um Markerinformation für diese Art der Nutzung brauchbar zu machen und das Vertrauen der Praktiker zu gewinnen, ist viel Vorarbeit nötig. Dann aber kann die Methode Versuchsfläche, Zeit und Arbeit sparen. Dass sich der Aufwand lohnt, belegen bisher erzielte MAS-Erfolge.

### **2.12.2 Nutzung der MAS zur Erzeugung erwünschter Genotypen („Genotype Construction“ oder „Gene Stacking“)**

Das Konzept der Genotype construction umfasst z.B. die Introgression, die markergestützte Rückkreuzung und das sogenannte „Pyramidisieren“. Beim Pyramidisieren werden mehrere erwünschte Eigenschaften verschiedener Kreuzungspartner im Verlauf mehrere Züchtungsschritte bzw. Generationen kombiniert und erhalten.

#### **2.12.2.1 Genotype Construction auf Monogen-Ebene**

##### **Bsp.1: Pyramidisieren von Resistenzgenen**

Ein Beispiel für erfolgreiche MAS ist das Pyramidisieren von Resistenzgenen beim Reis (MELCHINGER, 1990; SANCHEZ et al., 2000). In vier Kreuzungsschritten wurden insgesamt drei Resistenzgene in eine Elitelinie übertragen und lagen schließlich im Genom resultierender Pflanzen vereint vor. Die Pflanzen der beteiligten Generationen wurden jeweils über MAS anhand eng gekoppelter Mikrosatellitenmarker auf das Vorhandensein der drei Zielregionen getestet. Die Vorhersage des Phänotyps von 50 geprüften Pflanzen wies letzten Endes eine Treffsicherheit von über 86% für jeden der drei Loci auf. Linien, bei denen alle drei Resistenzgene pyramidisiert vorlagen, erreichten außerdem schließlich ein höheres Resistenzniveau (Transgressionseffekt<sup>6</sup>) als

---

<sup>6</sup> Übertreffen die Nachkommen einer Kreuzung die Eltern bezüglich einer gleichsinnig- additiv bestimmten Leistungseigenschaft oder ergibt sich durch Rekombination und Überwindung epistatischer Effekte ein höherer Leistungsstandard als völlig neues Merkmal, so spricht man von Transgression. Die Transgressionszüchtung hat zum Ziel, möglichst viele Gene, die ein quantitatives Merkmal in gleichsinniger Weise beeinflussen, zu pyramidisieren. In der Vergangenheit erreichte man dies häufig nur durch sehr viele Kreuzungen „auf Verdacht“ (vgl. LEIBENGUTH, 1982: S. 111).



es aufgrund der summarischen Wirkung der Einzelgene zu erwarten gewesen wäre (SANCHEZ et al., 2000).

**Bsp. 2: Monitoring der Introgression eines Resistenzlocus der Rebe als Perspektive**

Für die Rebe wäre in Zukunft die markerkontrollierte Introgression des von DONALD et al. (2002) identifizierten Run1-Resistenzlocus eine Anwendungsmöglichkeit der Genotype Construction: Drei Marker, die über RFLP aus Resistenzgenanaloga (RGAs) entwickelt wurden, erwiesen sich im Rahmen einer Bulk Segregant Analyse als eng mit dem Run1-Resistenzlocus aus *Muscadinia Rotundifolia* gekoppelt.

**2.12.2.2 Genotype Construction auf QTL-Ebene und MAS-kontrollierte Weitergabe von QTL**

Auch das Pyramidisieren von QTL-Regionen und ihre Kontrolle über MAS ist denkbar. Dieser Idee liegt die Hypothese zugrunde, dass konservierte QTL-enhaltende Genomarrangements möglicherweise Funktionseinheiten darstellen (in dem Sinne, dass mehrere Gene kumulativ an der Ausprägung eines Merkmals beteiligt sind; vgl. SEYFFERT, 2003: S.441) und es zur Annäherung an ein Zuchtziel jeweils optimale Allelkombinationen gibt, die durch Strategien wie das „Recycling Breeding“ vereint werden sollen (MELCHINGER, 2002). Sind Genomregionen, die für die Ausprägung erwünschter Leistungseigenschaften eine Rolle spielen, durch molekulare Marker und über QTL ausreichend charakterisiert, so kann die Selektion erhaltenswerter<sup>7</sup> Linien aus der Vielzahl der Sämlingsnachkommenschaft einer Kreuzung basierend auf PCR-Methodik gezielt durchgeführt werden, denn Rekombinationsereignisse oder Erhaltung chromosomaler Abschnitte der Kreuzungseltern in Pflanzen der Nachkommenschaft lassen sich in Näherung über korrelierende molekulare Marker abbilden (CHIN et al., 2001). Gelingt es, intakte merkmalsrelevante Chromosomenabschnitte eines Donoreltern im Genom eines Nachkommen nachzuweisen, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Merkmalsvererbung in Abhängigkeit von der Markerdichte der Region und der Rolle, die dieser Bereich anteilig für den Phänotyp spielt. Dies ist auch die Basis für markergestützte Rückkreuzung (vgl. FRISCH und MELCHINGER 2001). Alternativ zur konservierten Weitergabe können aber auch gerade neue Konstellationen, die wiederum über Marker charakterisierbar sind, im Genom der Nachkommenschaft zur Annäherung an ein bestimmtes Zuchtziel führen.

---

<sup>7</sup> Erhaltenswert im Sinne der beschriebenen Hypothese der QTL-Region als vererbbarer Funktionseinheit.

Die Verfahren der konventionellen Züchtung zur Erzeugung bestimmter Genotyp-Kombinationen sind in der Regel aufwendig und erstrecken sich, wie bei der Introgression, über viele Generationen ausgelesenen und weitergekreuzten Zuchtmaterials. Erfolge manifestieren sich eher allmählich (MELCHINGER, 2002). Folgende Überlegung verdeutlicht die Chancen der MAS: Angenommen, eine seltene genetische Konstellation, die gezielt erst durch viele Einzelschritte erreichbar gewesen wäre und im frühen Entwicklungsstadium der Pflanze (z.B. Sämling) phänotypisch nicht offensichtlich ist, tritt zufallsbedingt bereits in der ersten Folgegeneration auf, so ermöglicht ein Markerscreening das Auffinden solcher Rekombinanten unter der Voraussetzung ausreichender Markerdichte.

### **2.12.3 Begleitende Forschung**

Quantitativ ausgeprägte Merkmale stehen in komplexer Wechselwirkung mit inneren und äußeren Parametern. Die Interpretation von QTL-Ergebnissen bedarf deshalb eines Interpretationsrahmens mit Bezug zu Stoffwechselprozessen, biotischen und abiotischen Umweltfaktoren etc.. Am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof spiegelt sich die umfassende Herangehensweise an Fragen der Pathogentoleranz und -resistenz in verschiedenen Projekten zur Untersuchung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, physiologischer Prozesse bei Stress und Elizitierung, der Klonierung von Schlüsselgenen wie der Wachssynthese, der Untersuchung von Wildarten und schließlich, in internationaler Kooperation, in Ansätzen, die heute unter dem Begriff „Genomics“ zusammengefasst sind.

### **2.13 Charakterisierung des Genoms der Weinrebe: Ausgangssituation**

Zu Beginn der Kartierungsstudien an der Kreuzungspopulation ‘Regent’ x ‘Lemberger’ 1997 existierten noch keine umfangreichen genetischen Karten für die Rebe. Einige Kopplungsanalysen wurden für relativ kleine Populationen publiziert, bei denen amerikanische Wildarten eine Rolle spielten (LODHI *et al.*, 1998; DALBÓ *et al.*, 1999).

Erste partielle Kartierungen der Parentaltypen ‘Regent’ und ‘Lemberger’ basierten zunächst auf RAPD-Markern (vgl. BUCK und ZYPRIAN, 2000).

Die im Verlauf der vorliegenden Dissertation erarbeiteten Daten sollten zu einer komplexen molekularen Markerkarte für Weinreben des europäischen Typs führen. Die resultierende Karte sollte durch die QTL-Analyse zusätzlich an Informationswert bezüglich agronomischer Eigenschaften gewinnen.

## **2.14 Hintergrund: Wichtige Schadpilze der Rebe**

Zur Illustration des Aspekts Wirt-Pathogen-Interaktion und möglicher Resistenzursachen schließt sich nun eine Betrachtung wichtiger Schadpilze der Rebe an.

### **2.14.1 *Botrytis Cinerea* - Grauschimmel**

Der Grauschimmel *Botrytis cinerea* lebt als nekrotropher Pilz auf verrottenden Pflanzenteilen. Er beschert dem Weinbau die Edelfäule. Gerät er jedoch zu einem ungünstigen Zeitpunkt außer Kontrolle, verursacht er große Ernteschäden. Spezifische genetisch bedingte Resistenz gegen nekrotrophe Schaderreger wird als formal problematisch betrachtet. Es gibt jedoch erbliche Prädispositionen, die der Pflanze resistenzähnliche Eigenschaften verleihen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird statt des Begriffs „Resistenz“ im Fall von *Botrytis cinerea* „Toleranz“ verwendet („*Botrytis*-Toleranz“). Nekrotrophe Pathogene wie *Botrytis* produzieren Toxine, die als Ursache der Krankheitssymptome der Wirtspflanze angesehen werden. Phänotypische Toleranz könnte z.B. als Effekt erfolgreicher Inaktivierung oder Entgiftung seitens der Pflanze in Erscheinung treten.

*Botrytis cinerea* reagiert in manchen Fällen sensitiv auf das Resveratrol der Weinrebe. Bei Versuchen mit transgenem Tabak, der die Stilbensynthese der Weinrebe exprimiert, wurde von signifikant gesteigerter Widerstandskraft der Pflanzen gegen *Botrytis cinerea* berichtet (HAIN et al., 1993). Leider sind solche Effekte bei der Weinrebe nicht durchweg systematischer Natur (HOOS, 1988), obwohl Berichte über enge Korrelationen zwischen sortenabhängig erhöhter Stilbenproduktion und entsprechend stärkerer *Botrytis*-Widerstandskraft existieren (z.B. STEEL et al., 2001).

Für die Abwehr von *Botrytis cinerea* ist u.a. relevant, in wieweit die Pflanze in der Lage ist, möglichst hohe Stilbenkonzentrationen in einer ausreichend breiten Zone um den Ort der Infektion aufzubauen und lange genug beizubehalten (HOOS, 1988).

### **2.14.2 *Plasmopara viticola* - Falscher Mehltau**

*Plasmopara viticola* gehört zur Familie der Peronosporaceen und damit zu den Oomyceten, die ihrerseits den niederen Pilzen zugeordnet werden (ALEXOPOULOS et al., 1996). Die Vertreter der Peronosporaceen richten weltweit verheerende Schäden in der Landwirtschaft an; auch der Befall der Weinrebe mit *Plasmopara viticola* (im Weinbau häufig als „Peronospora“ bezeichnet), führt zu hohen Ertragsverlusten, beeinträchtigt die Holzreife der Triebe und vermindert außerdem die Qualität des Weines. Durch das

Auftreten von Folgeepidemien stellt sich ein langfristiges Problem, denn encystierte Oosporen (auch Wintersporen genannt) können mehr als ein Jahrzehnt im Boden überdauern (HILLEBRAND et al., 1998).

Oosporen treiben im Frühjahr bei ca. 8°C auf dem feuchten Boden aus. Sie bilden am Ende ihres Keimschlauches ein Primärsporangium, das mit Spritzwasser übertragen wird und begeißelte Zoosporen entlässt. Diese entsenden einen Keimschlauch durch die Stomata der Wirtspflanze; die Hyphen wachsen in den Interzellularraum (Primärinfektion) und entsenden Haustorien als Versorgungseinheiten in die Zellen des Wirtes. Reife Sporangien (Konidienträger) brechen auf der Blattunterseite aus den Spaltöffnungen hervor. Die der vegetativen Vermehrung dienenden Konidien werden als Ganzes abgeworfen, sie entlassen erneut Zoosporen (Zweitinfektion). Die Oogonien bilden sich interzellulär. Encystierte Oosporen überwintern nach dem Laubzerfall im Boden. Die Infektion mit *Plasmopara viticola* zeigt sich zunächst durch Ölflecken an den Blättern, schreitet dann über daunigen Sporenbelag auf der Blattunterseite, bläuliche Verfärbungen und schließlich herbstlaubartigen Verfall voran. Beim Befall älterer Blätter werden die infizierten Bereiche durch verhärtete Blattadern begrenzt und es bildet sich ein buntes Mosaik. Beeren sind nur etwa bis Erbsengröße infektionsgefährdet. Sie wachsen bei Befall nicht weiter, sondern verhärten, schrumpfen zu typischen „Lederbeeren“ ein und verfärben sich bläulich. Schließlich fallen sie ab. Reife Beeren haben recht gute Widerstandskraft gegen *Plasmopara viticola*, wenn jedoch Beerenstielchen befallen sind und absterben, vertrocknen auch die von der Versorgung abgeschnittenen Beeren. *Plasmopara viticola* benötigt tropfbares Wasser, das auf der Pflanzenoberfläche verbleibt.

### **2.14.3 *Uncinula Necator (Oidium tuckeri)* - Echter Mehltau**

Der Name „Mehltau“ ist mit dem typischen hellen bis aschgrauen Puderbelag aus vegetativen Konidien auf der Pflanze zu erklären. Im Weinbau ist für *Uncinula necator* (geschlechtliche Form) der Name der ungeschlechtlichen oder Nebenfruchtform, *Oidium tuckeri*, oder kurz: „Oidium“ als Synonym gebräuchlich.

Die Infektion bricht bei relativer Trockenheit aus, obwohl die Freisetzung der Sporen erfolgt, sobald Niederschlag (2,5 mm oder mehr) gefallen ist. Die Temperatur muss dazu über 10°C liegen. Die geschlechtlich entstandenen Ascosporen überdauern den Winter teils in Kleistothecien auf der Oberfläche von Beeren oder Blättern, in der Borke oder in befallenen Knospen. Diese wachsen im Folgejahr zu infizierten Zeigertrieben aus.

Werden die Blätter nahe der Borke durch Sporen erreicht, so breitet sich der Echte Mehltau ausgehend von Ölflecken auf allen grünen Pflanzenteilen aus. Der Pilz heftet sich mit einem Appressorium auf der Pflanzenoberfläche fest. Lediglich die Haustorien des obligaten Parasiten dringen ins Innere der Pflanze: Epidermiszellen des Wirtes werden dazu mit einem Stachel an der Unterseite der Appressorien angebohrt. Gezielte Infektionsversuche zeigen, dass die Beeren von der Blüte an gerechnet nur in einer kurzen Phase extrem anfällig sind. Ab dem Stadium der „Erbsengröße“ ist dann ein relativ hohes (sortenabhängiges) Resistenzniveau erreicht (KAST, 1996). Infizierte Beeren retardieren im Wachstum, werden zu spröden „Glasbeeren“ und platzen leicht.

## **2.15 Abwehr von Phytopathogenen und Resistenz**

### **2.15.1 Präformierte morphologische Barrieren**

Eine dicke Cuticula, aber auch die Behaarung von Blättern sind Eigenschaften, die bestimmten Genotypen der Rebe morphologiebedingt Schutz vor Pilzbefall bieten (KORTEKAMP et al., 1999), indem die Pilzhyphe das Zielgewebe gar nicht erst erreichen können. Durch den von Wilhelm BARTHLOTT und Mitarbeitern (NEINHUIS et al., 2001; WAGNER et al., 2003) beschriebenen Lotuseffekt finden Pilzsporen auf hydrophob imprägnierten Pflanzenoberflächen kaum Halt. Die Auflagerung von Wachsen ist bei den Beeren der Rebe kultivarspezifisch stärker oder schwächer ausgeprägt. Da die Vitalität eines Schaderregers auf der Pflanze im Anfangsstadium der Besiedelung unmittelbar von der Benetzbarkeit der Pflanzenteile mit Wasser abhängen kann, bieten die genannten morphologischen Besonderheiten durchaus wirksamen Schutz vor Pathogenen.

### **2.15.2 Resistenzfaktoren und induzierbare Mechanismen pflanzlicher Pathogenabwehr**

Die Grundlagenforschung der letzten Jahre (Review: BOWLES *et al.*, 1997) hat belegt, dass viele Prinzipien der pflanzlichen Reaktion auf Stressreize, der lokalen wie der „long-range“-Resistenzantwort, offenbar über weite taxonomische Grenzen hinweg ausgeprägt sind. Neben der Modulation des Stoffwechsels durch komplexe Feedbacksysteme im Austausch mit der Umwelt spielen aber auch sortenspezifische Merkmale eine Rolle, die bestimmte Genotypen einer Art grundsätzlich widerstandsfähiger machen als andere.

Meist äußert sich Resistenz kontinuierlich-quantitativ, ist also offenbar in vielen Fällen polygen bedingt und zudem von epigenetischen Interaktionen geprägt. Viele Phänomene

führen wohl in Kombination, Abstufung und „Crosstalk“ miteinander zu einer quantitativ abgestuften Resistenzausprägung (PIETERSE et al., 2001). Dennoch wurden wichtige Ergebnisse auf dem Forschungssektor Resistenz unter der Annahme monogen bedingter Merkmalsausprägung und einer auf einfache Interaktionsmodelle reduzierten Sicht erzielt (vgl. „Gene-for-gene concept“, FLOR, 1971; „Enzymatic resistance“ concept, Review: ECKARDT, 2004). WARREN et al. (1998) gelang es, an *Arabidopsis* zu zeigen, dass ein einziger Aminosäureaustausch in der konservierten Region eines Resistenzgens zu weitreichenden pleiotropen Effekten mit Auswirkungen auf eine Reihe anderer *R*-Gene und letztlich zur *Peronospora parasitica*-Resistenz führte.

Die außerordentliche Vielfalt und Komplexität resistenzbezogener Modellentwürfe zwingt hier zu einer Übersichtsbetrachtung, die einen Interpretationsrahmen für die in dieser Arbeit gewonnenen Daten schaffen soll.

### **2.15.3 Coevolution und Interaktion pflanzlicher Wirt-Parasit-Systeme**

Pflanzen besitzen gegenüber Pathogenen, für die sie nicht als Wirt fungieren, eine Basisresistenz (EBEL und SCHEEL, 1992; DANGL und JONES 2001), die sich als erfolgreiche Kombination aus präformierten, als Infektionsbarrieren wirkenden Eigenschaften und induzierbaren Abwehrreaktionen einstellt und normalerweise nicht mit Zelltod- oder hypersensitiven Reaktionen einhergeht (GRANT und MANSFIELD, 1999), während für Wirtspflanzen ein enger Zusammenhang zwischen hypersensitiver Reaktion und Pilzresistenz postuliert wird (SCHULZE-LEFERT und VOGEL, 2000). Gelingt es einer Gruppe von Mikroorganismen, die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu überwinden (durch Pathogenitätsfaktoren) oder zu unterdrücken (durch Suppressoren), so entsteht ein Verhältnis der Basiskompatibilität (SHIRAISHI et al., 1994), bei der die Pflanze zum Wirtsorganismus wird. Dieser Zustand kann im Kontext von Coevolution durch die Entstehung resistenter Varianten mit der Befähigung zur spezifischen Pathogenerkennung und Abwehr wieder überwunden werden.

### **2.15.4 Pathogenperzeption**

Es gilt als erwiesen, dass die direkte Erkennung von Pathogenen durch die Wirtspflanze durch Familien von funktionell variablen, jedoch strukturell verwandten Resistenzgenen (*R*-Genen) vermittelt wird. Man geht in Anlehnung an das „Gene-for-gene concept“ davon aus, dass solche *R*-Genprodukte jeweils spezifische Pathogen-Avirulenzdeterminanten (*Avr*) erkennen (vgl. FLOR, 1971) und dass ein

Überwachungssystem von *R*-Gen-codierten Rezeptoren über einen ähnlichen Mechanismus auf unterschiedliche Varianten von Pathogenen reagiert - oft unabhängig davon, ob es sich um Viren, Bakterien, Pilze oder Nematoden handelt (ELLIS et al., 2000).

#### **2.15.4.1 Verifizierung und Übertragbarkeit des *R*-Gen/*Avr*-Gen-Modells**

Die im komplexen Resistenzlocus RPP1 geclusterten *R*-Gene von *Arabidopsis thaliana*, die sich gezielt gegen *Peronospora parasitica*-Isolate richten (BOTELLA et al., 1998), belegen das Zutreffen der „Gen-für-Gen“-Hypothese spezifischer Pathogenerkennung. Drei von vier beschriebenen eng gekoppelten Gene dieser Region codieren für NBS-LRR (nucleotide binding site-leucine rich repeat)-Rezeptorproteine und besitzen eine sogenannte TIR (Toll-Interleukin-1-Resistance)-artige Domäne (ebd.).

Resistenzgenanaloga (RGA) der Weinrebe, die die Hauptstrukturmerkmale funktioneller *R*-Gene in ihrer Basenfolge codiert enthalten, wurden auf der Basis ihrer Ähnlichkeit mit Sequenzen aus u.a. *Arabidopsis thaliana* über PCR mit degenerierten Primern isoliert (DI GASPERO et al., 2002 und 2003), sie sind jedoch noch nicht kartiert. Allerdings erwiesen sich in einer weiteren Studie drei Marker, die über RFLP aus Resistenzgenanaloga entwickelt wurden, im Rahmen einer Bulk Segregant-Analyse als eng mit dem gegen *Uncinula necator* gerichteten Run1-Resistenzlocus aus *Muscadinia Rotundifolia* gekoppelt (DONALD et al., 2002).

#### **2.15.4.2 Klassifikation von *R*-Genen und Organisation komplexer Loci als Resistenzgencluster**

Bei der gegenwärtigen Klassifikation von *R*-Genen unterscheidet man vier Hauptgruppen (DI GASPERO und CIPRIANI, 2003 und Referenzen darin), die sich durch eine modulare Strukturorganisation und überlappende Merkmale auszeichnen: (1) Cytoplasmatische Serin-/Threoninkinasen (STK) (z.B. Pto, *Lycopersicon esculentum*), (2) Proteine mit einer nucleotide binding site (NBS) und leucine-rich repeats (LRR) zusammen mit einer Toll/Interleukin-1 receptor (TIR)-Domäne oder einem Coiled-coil (C-C)-Strukturmotiv (z.B. RPS2, *A. thaliana*); (3) extrazelluläre LRRs, die mit einer Transmembrandomäne verankert sind (z.B. Cf-9, *Lycopersicon esculentum*); und (4) rezeptorartige Kinasen (RLK, receptor-like kinases) mit extrazellulären LRRs und einer intrazellulären Serin-/Threoninkinase-Domäne (z.B. Xa21, *Oryza sativum*; FLS2, *A. thaliana*). Vertreter der Gruppen (1), (2) und (4) sind inzwischen auch für die Weinrebe identifiziert worden (ebd.).

Dockt ein Ligand an der Bindungsdomäne eines *R*-Gens an, so wird im Rahmen einer Konformationsänderung die NBS- oder STK-Domäne für die Interaktion mit „downstream“-Signalkomponenten exponiert, um letztlich multiple Abwehrreaktionen in Gang zu bringen.

Es gibt Bindungsdomänen, die rassenspezifisch mit bestimmten *Avr*-Genprodukten interagieren und solche, die allgemein mit Elicitoren in Wechselwirkung treten (z.B. Lectindomänen, die Polysaccharidelicitoren binden können; ebd.). Analog zum Immunsystem der Säuger wäre demnach ein hoher Grad an Variabilität zur Erkennung eines breiten Spektrums möglicher Liganden zweckdienlich. Ebenfalls passend zu diesen Überlegungen erkennen verschiedene funktionelle *R*-Genprodukte der *Mla*-Familie, bei denen es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt, verschiedene Isolate des Echten Mehltaus (exemplarisch untersucht an *Hordeum* und *Arabidopsis*; SCHULZE-LEFERT und VOGEL, 2000 sowie Referenzen darin). Als möglicher Evolutionsmechanismus hin zu einer größeren Bandbreite der Pathogenerkennung ist für RPP8 (einem *Peronospora parasitica*-Resistenzgenlocus aus *Arabidopsis*) ungleiches Crossing over in der Ligandenbindungsregion der LRR-Sequenzen beschrieben (MC DOWELL et al., 1998). Auch die Vergesellschaftung mit Retroelementsignaturen in den Bereichen der Resistenzgencluster (DI GASPERO und CIPRIANI, 2003) begünstigt eine beschleunigte Evolution (CHIN et al., 2001).

Phänomene wie die geschilderten haben offenbar dazu geführt, dass funktionelle *R*-Gene im pflanzlichen Genom neben zahlreichen Resistenzgen-Analoga in Clustern zusammen vorliegen, die u.U. multiple Resistenz gegen verschiedene Schaderreger vermitteln und als Major-Gen bzw. QTL-Region in Erscheinung treten können (DI GASPERO und CIPRIANI, 2003). Bei konstanter Anordnung der Strukturelemente und Motive (z.B. im Bereich der hydrophoben GLPL-Domäne oder des Motivs „CFLY“; vgl. BALLVORA et al., 2002) zeigen die Domänen auf der extrazellulären Seite (derjenigen der Pathogenerkennung und Elicitor-Interaktion) tatsächlich große Variabilität, während die funktionellen NBS- und STK-Domänen bis auf wenige definierte Aminosäurepositionen artübergreifend stark konserviert sind (DI GASPERO und CIPRIANI, 2003). Insgesamt entspricht dies der Beobachtung, dass Resistenzmechanismen „downstream“ der Pathogenperzeption fast stereotyp verlaufen (REUBER et al., 1998).



### 2.15.5 Elicitierung

Elicitoren sind in der Regel von Pathogenen sezernierte Proteine, daneben auch Polysaccharidfragmente der pflanzeigenen angegriffenen Zellwand. Ihre Bindung an spezifische Rezeptoren löst in den Pflanzenzellen Signalkaskaden der Stressantwort aus, auch wenn noch keine ausgeprägtere Verwundung vorliegt. Insgesamt hat die Elicitierung ähnliche Effekte wie die Pathogenerkennung, die man in „frühe“ und „long range“-Reaktionen unterteilt. Selbst artfremde Elicitoren zeigen gute Wirkung, z.B. reduziert Laminarin, ein Beta-1,3-Glucan der Braunalge *Laminaria digitata*, die Infektion von *Vitis vinifera* L. durch *Botrytis cinerea* und *Plasmopara viticola* um ca. 55 bzw. 75% (AZIZ et al., 2003).

### 2.15.6 Frühe Reaktionen der Abwehr

In Bruchteilen von Sekunden reagieren Pflanzen auf Pathogenbefall/Elicitierung, unspezifischen Wundreiz oder UV-Strahlung. Änderungen der Protonen- und elektrochemischen Gradienten über die Plasmamembran (SCHALLER und OECKING, 1999) und Ionenflüsse (d.h.  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -Einstrom,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom) gehören dabei zu den unmittelbarsten physiologischen Effekten. Sie verursachen zusammen mit elicitorstimulierten Redoxenzymen der Plasmamembran (AUH und MURPHY, 1995) den „Oxidative Burst“ (GRANT und LOAKE, 2000). In den Zellen des betroffenen Gewebes akkumulieren schlagartig reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS, Reactive Oxygen Species), die offenbar zum großen Teil auf eine membrangebundene NADPH-Oxidase zurückzuführen sind (SCHOPFER et al., 2001, TENHAKEN et al, 1998). Zu den ROS zählen Wasserstoffperoxid  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Superoxidanionen  $\cdot\text{O}_2^-$  und Hydroxylradikale  $\cdot\text{OH}$ .

Diese freigesetzten radikalischen Sauerstoffverbindungen erfüllen bei der Pathogenantwort mehrere Funktionen. Sie wirken selbst toxisch und stehen außerdem als Reaktionspartner und Startermoleküle für Phenoloxidationen, Zellwandcrosslinking sowie weiteren Reaktionen mit starkem Redoxgefälle, die die Abschottung des Infektionsortes gegen das angrenzende Gewebe und die Abwehr gewährleisten, zur Verfügung.

Die lokal begrenzten Symptome und die längerfristigen Auswirkungen des „Oxidative Burst“, punktuelle Zelltodreaktionen und Gewebeläsionen, werden üblicherweise unter dem Begriff der hypersensitiven Reaktion (HR) zusammengefasst.

### 2.15.7 Hypersensitive Reaktion und programmierter Zelltod

Die HR des befallenen Gewebes nach Pathogenbefall schränkt die systemische Ausbreitung einer Infektion ein, indem das Wachstum invasiver Schaderreger gebremst und ihre Vitalität beeinträchtigt wird (GOODMAN und NOVACKY, 1994). Während der HR manifestiert sich eine nicht nur vorübergehend, sondern anhaltend erhöhte Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  im Cytoplasma, die in *Arabidopsis* von einem funktionellen *RPM1*-Genprodukt und der Gegenwart des zugehörigen *vRpm1*-Avirulenz-Genprodukts abhängig ist (GRANT et al., 2000). In Petersilie wurden elicitorinduzierte Ionenflüsse und die radikalischen Sauerstoffverbindungen des „Oxidative Burst“ als entscheidend und ausreichend für das Auslösen pflanzlicher Abwehrreaktionen, insbesondere der HR, der Phytoalexinproduktion und der PR-Genexpression beurteilt (JABS et al., 1997).

Einige Autoren sehen in der HR eine Variante des programmierten Zelltods (DIETRICH et al., 1994; GREENBERG et al., 1994). Der Begriff der Apoptose wird zurzeit im Bezug auf Pflanzen noch vorsichtig verwendet, denn trotz offensichtlicher Parallelen (SOLOMON et al., 1999) möchte man zu voreilige Analogien zum Tiermodell vermeiden (ZHAO et al., 1999). GREENBERG et al. (1994) zeigten, dass der pathogeninduzierte programmierte Zelltod in Pflanzen mit vielfältigen Abwehrreaktionen koordiniert verläuft.

Bei *Vitis vinifera L.* führt der Elicitor Laminarin zum „Oxidative Burst“, zur Bildung abwehraktiver Proteine (u.a. Chitinase und Glucanase) und Stilbene, ohne jedoch programmierten Zelltod zu induzieren (AZIZ et al., 2003), während Beobachtungen von GROSS et al., (1993) anklingen lassen, dass die Aktivierung des programmierten Zelltods konzertiert mit der Pathogenantwort verlaufen *kann*, die Reaktionswege der Abwehr jedoch auch abkoppelbar sind.

Weitere Untersuchungen zum programmierten Zelltod haben inzwischen zu einer noch differenzierteren Betrachtungsweise geführt, bei der *apoptoseartige Ereignisse* (durch Induktion spezifischer Gene, keine Entzündung) von der *inflammatorischen Zellantwort* (nekrotische Läsionen durch chemische Schädigung und Anschwellen der Zellen, PR-Geninduktion und Salicylsäureproduktion parallel, aber nicht gekoppelt) abzugrenzen sind.

MITTLER et al. (1996) fanden in Tabak tatsächlich konkrete Hinweise für die Existenz dieser zwei verschiedenen Wege, deren Regulation offenbar über Sauerstoffpartialdruck und Redoxstatus verläuft.  $\text{H}_2\text{O}_2$  schädigt das Gewebe bei Tier und Pflanze chemisch und verursacht Entzündung, spielt beim programmierten Zelltod der Pflanze offenbar jedoch keine Rolle (ebd).

### 2.15.8 Die Rolle von Homöostasis und Stoffwechselmodulation bei der Abwehr

Durch Pathogenerkennung, Elicitierung und weitere Reize ausgelöste Signale führen z.B. über MAP-Kinase-Kaskaden und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern zur Expression von Genen der Stressantwort (ROMEIS et al., 1999), wobei sich auch der Schwerpunkt von Stoffwechselaktivitäten verlagert. Der Schwenk von ausschließlichen Housekeeping-Funktionen auf Abwehrreaktionen geht mit einer Mobilisierung und Umverteilung von Energieressourcen einher (vgl. Umprogrammierung des Isoprenoidstoffwechsels, S. 32). Dabei werden 1) abwehraktive Komponenten, deren Vorstufen bereits vorliegen, aktiviert und 2) neue Transkriptionsprozesse in Gang gebracht (SCHEIDELER et al., 2002). Möglicherweise wird die Wahrnehmung verschiedener Reize „downstream“ der Signalperzeption (auf der Ebene der „frühen Reaktionen“) kanalisiert, um eine möglichst schnelle, ressourcenschonende Reaktion zu ermöglichen. So könnten verschiedene Reize sich auch gegenseitig verstärken.

Reaktive Sauerstoffverbindungen wären geeignete Kandidaten für eine Vermittlerstellung, denn sie übernehmen nicht nur regulierende Funktion in Entwicklungsprozessen (z.B. bei der Samenkeimung, bei Seneszenz), sondern beeinflussen auch punktuell den Redoxzustand des Cytoplasmas bei externem Stress (SCHOPFER et al., 2001). Grundsätzlich ist es denkbar, dass Reize und wechselnde zelluläre Zustände in einen „Redoxcode“ übersetzt werden, sodass Redoxstatus sowie Energieladung im Verbund mit zellulären Sensorsystemen Signalwirkung haben. Kompartimentierung ist dazu eine wichtige Voraussetzung (neben den bereits angesprochenen Membrangradienten etwa auch die Licht-Dunkel-Regulation des reduktiven und oxidativen Pentosephosphatwegs im Stroma der Chloroplasten).

Konservierte Redox-Sensoren, die auch das Signal für „Belichtung“ auf Proteine übertragen (vgl. HELDT, 1999: 188), sind die in der gesamten belebten Welt verbreiteten Thioredoxin-Glutathion-Systeme (DELAUNAY et al., 2002).

Für das Überleben der Pflanze ist letztlich entscheidend, ob sie den Erhalt notwendiger Grundfunktionen und die effektive Abwehr ausbalancieren und vereinbaren kann.

### 2.15.9 PR („pathogenesis related“) - Proteine

Hierzu zählen z.B. Chitinase und Glucanase (sie greifen die Chitinzellwand pilzlicher Phytopathogene an), Polygalacturonase Inhibiting Proteins (PGIPs; BEZIER et al., 2002), Major Allergen-artige Proteine (PR-10; COUTOS-THEVENOT et al., 2001), Thaumatin-

und Osmotin-artige Proteine (TATTERSALL et al., 1997) sowie systemische „Defensine“ (THOMMA et al., 2002), die durch Stress, Pathogenbefall oder auch Elicitoren induzierbar sind und potentielle Schaderreger physisch schädigen bzw. die Pflanze stärken.

#### **2.15.10 Die Rolle von Phytoalexinen und der Phenylpropanoidstoffwechsel**

Der Sammelbegriff „Phytoalexin“ bezeichnet Sekundärmetabolite unterschiedlicher Stoffklassen (Isoprenoide, Flavonoide und Stilbene) mit breitem antimikrobiellem Wirkungsspektrum, die oft erst auf Elicitierung hin gebildet werden und in Lipidvesikeln an ihren Wirkungsort gelangen. Kompatible Phytopathogene sind ihrerseits mitunter in der Lage, Phytoalexine zu detoxifizieren.

Die Fähigkeit einer Pflanze zur effizienten Phytoalexinbildung gehört zu den bereits gut untersuchten Resistenzfaktoren. Belege dafür brachten u.a. Infektionsstudien an *Arabidopsis thaliana*. Dabei wurden an mehreren „PAD“-Mutanten (Phytoalexin deficient“, an jeweils einem von fünf „PAD“-Loci mutiert) die Rolle von Phytoalexinen für die Pathogenresistenz von *Arabidopsis* untersucht. Vier Loci sind zu unterschiedlich starken Anteilen für die Resistenzausprägung gegen *Peronospora parasitica* erforderlich, wobei dem fünften eine regulative Funktion zukommt. Insgesamt wird der Beitrag der fünf Loci zur phänotypischen Resistenz als kumulativ interpretiert (GLAZEBROOK et al. 1997).

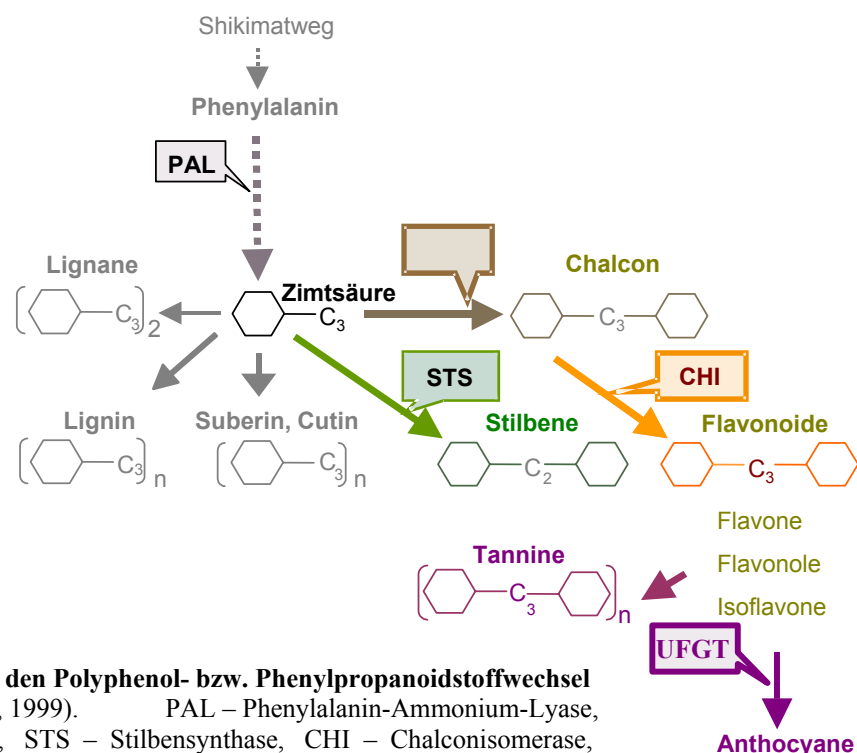
Viele **Isoprenoide** bzw. Terpenoide haben Phytoalexinwirkung. In die Gruppe der Isoprenoide gehören außerdem Pflanzenhormone, Pigmente und Elektronentransportüberträger, Vorstufen von ätherischen Ölen und Duftstoffe. Die Monoterpene als Hauptaromakomponenten des Weins zählen ebenfalls zu dieser Stoffklasse.

Der Isoprenoidstoffwechsel wird in erster Linie auf der Ebene der Genexpression reguliert, so ist bei Elicitierung und Verwundung oft eine sehr schnelle Verlagerung der Isoprenoid-Synthesekapazität auf die Produktion von Phytoalexin-Isoprenoiden zu beobachten. Bei Tabak löst dieses „Umschalten“ zunächst eine Konkurrenzsituation, in rascher Folge sogar den Stillstand der Steroidsynthese aus und ermöglicht so der Pflanze die Fokussierung ihres Stoffwechsels auf die Abwehr (HELDT, 1999 und Referenzen darin).

Als Phytoalexine der Weinrebe stehen die **Stilbene** Resveratrol und Viniferin im Vordergrund (JEANDET et al. 2002). Außer durch Pathogene wird das Schlüsselenzym

Stilbensynthase auch durch UV-Strahlung verstärkt induziert. Im Freiland steigert sich die Kapazität zur Stilbensynthaseexpression im frühen Stadium des Beerenreifeprozesses, sodass Resveratrol in dieser Periode schlagartig und stark akkumulieren kann (BAIS et al., 2000).

Stilbene leiten sich als **Polyphenole** aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel ab, der als Pool für Zellschutz, Abwehr und Entwicklung eine zentrale Stellung in der pflanzlichen Stoffwechselphysiologie einnimmt (vgl. Abb. 2.3). Neben den Stilbenen hat auch eine Reihe weiterer Polyphenole unmittelbar antibiotische/fungizide Wirkung.



**Abb. 2.3 Übersicht über den Polyphenol- bzw. Phenylpropanoidstoffwechsel** (modifiziert nach HELDT, 1999). PAL – Phenylalanin-Ammonium-Lyase, CHS – Chalconsynthase, STS – Stilbensynthase, CHI – Chalconisomerase, UFGT – UDF-Glucose-Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase.

Den Polyphenolen als Gruppe sekundärer Stoffwechselprodukte wird gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben (z.B. Resveratrol in Rotwein). Ein Teil dieses Effekts lässt sich auf ihre antioxidative und gleichermaßen entzündungshemmende Wirkung zurückführen (Beispiele vgl. GEHM et al., 1997).

Die als Gerbstoffe des Rotweins bekannten **Tannine** binden fest an Proteine; ihre Abwehrfunktion besteht in der Inaktivierung zellwandhydrolysierender Enzyme und Proteasen, die durch Pflanzenpathogene während des Infektionsprozesses nach außen abgegeben werden.

Die **Flavonoide** sind Grundbausteine für verschiedene Antioxidantien, UV-Schutzpigmente und Farbstoffe. Aus dem Pool der Polyphenole leitet sich auch die **Salicylsäure** ab, der bei der Pathogenantwort eine Schlüsselrolle als Effektor und Botenstoff zukommt (MUR et al., 2000).

Durch die enge Verzahnung der Bildung von abwehraktiven Sekundärmetaboliten und Aromakomponenten auf biochemischer Ebene kann es für die Rebenzüchtung zur anspruchsvollen Aufgabe werden, unerwünschte Duft- und Geschmacksträger unter Erhalt der Resistenz (und der Farbe) bei der Erzeugung neuer Sorten zu unterdrücken.

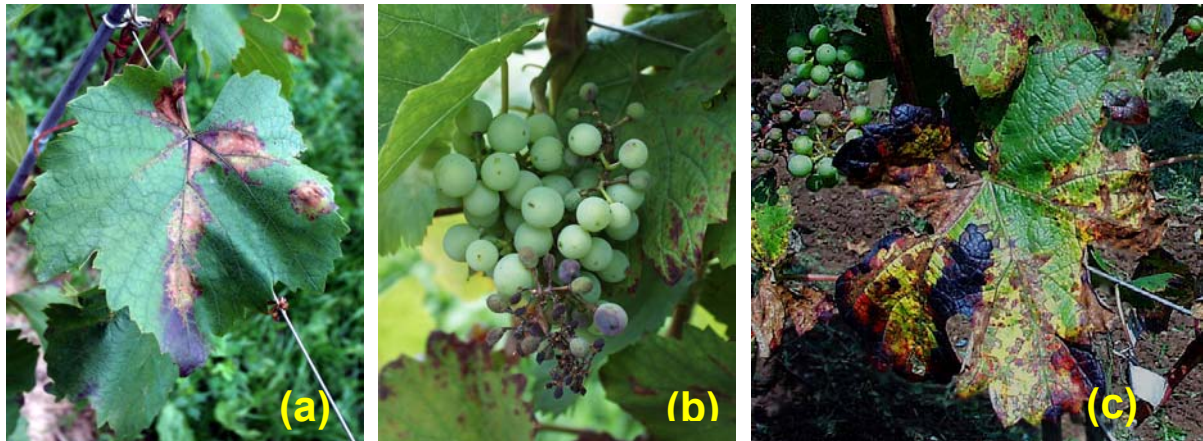
### 2.15.11 Pathogeninduzierte Promotorboxen

Viele Gene des Phenylpropanoidstoffwechsels sowie die damit assoziierten substratspezifisch arbeitenden Cytochrome P450 enthalten eine Reihe ähnlicher Motive in ihren Promotorbereichen, die Grundlage einer koordinierten Regulation sind (vgl. Tab. 2-2). Diese Boxen sind häufig Kernbestandteil elicitor- oder auch lichtinduzierbarer Arrangements (WHITBRED und SCHULER, 2000), kommen in den regulativen Bereichen von PR-Genen (RUSHTON et al., 1996) oder gleichermaßen in stressinduzierten Genen vor.

TABELLE 2-2 Pathogeninduzierte Promotorelemente an Beispielen

Bezeichnung	Effekt	Referenz
Elicit-Box E/E-Box	Elicitierbarkeit	GRIMMIG und MATERN (1997)
W-Box u.a. Teil von EREs (Elicitor-Response-Elementen)	Elicitierbarkeit, Salicylsäure- und HR-Induzierbarkeit, differentielle Regulation v. Stressgenen	LALOI et al. (2004) YODA et al. (2002) DONG et al. (2003)
G-Box u.a. Teil von cAMP-Response-Elementen	Induktion v. Abwehr- und Stressgenen, Änderung der Chromatinstruktur	MENKENS et al. (1995) PAUL und FERL (1998)
Anaerobes/antioxidantes Response Element (ARE)	- " -	DOLFERUS et al. (1994)
Lichtresponsives Element (LRE)	- " -	BORELLO et al. (1993)
Hitzeschockelement (HSE)	- " -	SCHÖFFL et al. (1998)

Die pathogeninduzierte Stimulierung von Komponenten des Phenylpropanoidstoffwechsels wird bei der Weinrebe äußerlich sichtbar, wenn sie zur lokalen Induktion von Farbstoffen wie Anthocyan, lange vor ihrer entwicklungsgesteuerten systemischen Induktion führt. Dies ist am Beispiel der Sorte ‘Lemberger‘ gezeigt (vgl. Abb. 2.4 (a) – (c)).



**Abbildung 2.4 Im Freiland erfolgte Infektion mit *Plasmopara viticola* des anfälligen Kreuzungselters ‘Lemberger‘**

(a) Blattverfärbungen bei Plasmoparabefall.

(b) Blauviolette Verfärbungen an noch unreifen pilzbefallenen Beeren, die zu Lederbeeren werden.

(c) Plasmoparageschädigtes älteres Blatt mit „Mosaikmuster“, im Hintergrund zurückgebliebene befallene Beeren.

### 2.15.12 Induzierte morphologische Barrieren

Als Reaktion auf mechanische Reize und Verwundung werden Verhärtungen im Abschlussgewebe neu angelegt, die - gegebenenfalls zusätzlich zu präformierten morphologischen Barrieren - das Penetrieren der Epidermis durch invasive Pathogene erschweren. Beispiele sind lokale Calloseablagerungen zwischen Zellwand und Plasmalemma an der Stelle einer frischen Infektion oder an Spaltöffnungen (KORTEKAMP et al., 1997), Papillenbildung am Infektionsort (PRATT, 1984) sowie die Vernetzung der Zellwand durch Crosslinking (radikalische Polymerisierungen aus phenolischen Bausteinen unter Beteiligung von Laccasen, Peroxidasen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) die auf den „Oxidative Burst“ folgen (OTTE und BARZ, 2000).

Im Vergleich pilzsensitiver mit toleranten Rebsorten kann die Verstärkung des Abschlussgewebes in der Regel jedoch nicht als eindeutige bzw. alleinige Diskriminante der Resistenz bewertet werden (KORTEKAMP et al., 1997), obwohl eine Korrelation zur Resistenz besteht (KORTEKAMP et al., 2003).

### 2.15.13 Lokale Resistenz

Die Fähigkeit zur lokalen Resistenzantwort bezeichnet die unmittelbare Erstreaktion des Gewebes am Ort einer Verwundung. Sie verläuft meist schnell und unspezifisch. Dem Charakter nach handelt es sich in der Regel um eine hypersensitive Reaktion und/oder eine Verstärkung des umliegenden Abschlussgewebes. Die „Resistenz“ beruht möglicherweise auf der *Effizienz* des „Oxidative Burst“ und der HR, d.h. einer erfolgreichen Abschottung des Infektionsorts unter gleichzeitiger Erhaltung der Vitalität der Pflanze. Drei Beispiele sollen dies illustrieren:

(1) Für Tabak konnte gezeigt werden, dass sich Resistenzverlust als direkte Folge einer Attenuation des „Oxidative Burst“ beobachten lässt: bringt man die Pflanzen mit avirulenten Pathogenen in Kontakt, so schwächt sich der potenzierende Effekt der Salicylsäure auf den „Oxidative Burst“ ab, sodass die Reaktion langsamer, milder und damit weniger effektiv verläuft (MUR et al., 2000).

(2) In *Arabidopsis thaliana* potenzieren die positiven Regulatoren EDS1 und PAD4 über Salicylsäure-vermittelte Feedback Reaktionen, die bei *Peronospora parasitica*-Befall zum R-Gen-vermittelten Zelltod führen, während der negative Regulator LSD1 die Ausbreitung von Zelltodreaktionen begrenzen kann. Voraussetzung dafür ist, dass die Wirkung von LSD1 und die Umsetzung von reaktiven Sauerstoffintermediaten im Zentrum einer HR-Läsion offenbar anders kontrolliert ist als in ihrem Randbereich am Übergang zum intakten Gewebe (RUSTÉRUCCI et al., 2001 sowie Referenzen darin).

(3) Der Echte Mehltau (*Blumeria graminis*) ist in der Lage, über ein Haustorium in einer einzelnen Epidermiszelle Nährstoffe aus den Zellen umliegender Mesophyllzellen zu ziehen („Green Island-Effect“). Der in resistenter (inkompatibler) Gerste identifizierte rezessive Locus *mlo* verleiht zellautonome Resistenz, die dies unterbindet. Charakterisiert als „Loss-of-Function“-Mutation des dominanten Wildtyp-Locus *Mlo*, eines Suppressors der Abwehr (BÜSCHGES et al., 1997) beinhaltet der Mechanismus eine im Vergleich zu kompatiblen *Mlo*-Pflanzen entscheidend beschleunigte Zellwandverstärkung dort, wo die Pflanze den Bohrstachel des Mehltaupilzes registriert (SCHULZE-LEFERT und VOGEL, 2000).

### 2.15.14 Systemische erworbene Resistenz

Im Fall erworbener systemischer Resistenz (SAR, „systemic acquired resistance“) verbessert ein zur Immunisierung analoger Vorgang („Priming“; vgl. KATZ et al., 1998) die Abwehrprädisposition der Pflanze. Durch eine Erstinfektion oder Elicitierung werden



Vorstufen von PR-Proteinen sowie Komponenten eines resistenzbezogenen Signaltransduktionssystems bereitgestellt, die der Pflanze bei einer Folgeinfektion verbesserte Widerstandskraft bieten.

Die salicylatabhängige Aktivierung von PR-1, PR-2 und PR-5 (RYALS et al., 1996) und die Aktivierung von Defensinen (PDF/PR-12; PENNINGCKX et al., 1996 u. 1998) in jasmonat-/ bzw. ethylenabhängiger Weise repräsentieren zwei Möglichkeiten der SAR-Regulation, wobei THOMMA et al. (2001) die Signaltransduktion systemischer Resistenz im Fall biotropher Pathogene als vorzugsweise salicylatabhängig, bei nekrotrophen Schaderregern eher jasmonatabhängig beschreiben.

Auch bei der SAR lassen sich HR-artige, nekrotische Läsionen des Gewebes, Anhäufung von ROS und Phytoalexinakkumulation beobachten (ALVAREZ et al., 1998), die hier jedoch systemisch ausgeprägt werden.

#### **2.15.15 Der Brückenschlag zwischen verschiedenen Modellen ist möglich**

Der pflanzlichen hypersensitiven Zelltodreaktion geht ein Anstieg von cytosolischem Calcium, z.B. in Gegenwart eines funktionellen RPM1-Genprodukts und des zugehörigen vRpm1-Avirulenz-Genprodukts voraus; dies wird als Voraussetzung zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ausschüttung an der Infektionsstelle interpretiert (GRANT *et al.*, 2000; BRODY, 1996), wobei auch das Redoxpotential bzw. pH-Milieu über die Modulation einer Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität eine Rolle spielt (SCHALLER und OECKING, 1999) und Salicylsäure als Messenger beteiligt ist (MUR *et al.*, 2000). Die *Avr9*- und *Cf-9*-abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen der Abwehrsignalkaskade zeigt bei Tabak, dass die Konzepte *R*-Gen-basierte Pathogenerkennung, Reaktion auf Verwundung, Elicitierbarkeit und systemische Resistenzantwort konvergieren (ROMEIS et al., 1999). Über Signaltransduktion besteht auch eine Verbindung zur flavininduzierten Resistenz (AVERÝANOV et al., 2000). Gemeinsame Promotormotive sind die Voraussetzung für eine vernetzte Regulation (DIXON et al., 2002).

#### **2.15.16 Globale Untersuchungsmethoden der Resistenz**

Es zeichnet sich auch ab, dass die an der Resistenz beteiligten Reaktionen Teil eines vielschichtigen Netzwerks sind und zahlreiche Berührungspunkte mit Primär- und Sekundärstoffwechsel existieren. Der Einsatz globaler Analysemethoden gilt daher als wichtige methodische Bereicherung bei der Untersuchung komplexer physiologischer Phänomene wie der Resistenz, um das Zusammenspiel pflanzlicher Stoffwechselnetzwerke besser zu verstehen und eventuelle „Bottle Neck“-Gene aufzuspüren.

SCHENK et al. (2000) legten eine Mikroarray-Studie des Expressionsmusters von ca. 2400 ESTs (mit Überrepräsentation putativ abwehrkorrelierter Sequenzen) nach Pilzinfektion bzw. Applikation von Salicylsäure (SA), Methyljasmonat (MeJA) und Ethylen vor. Die Studie vermittelte eine Vorstellung über parallele Genaktivierungen (korrigierte beispielsweise das Postulat eines Antagonismus von SA und MeJA), ohne jedoch die zeitliche Auflösung zu verfeinern.

Dieser Aufgabe widmeten sich SCHEIDELER et al. (2002) mit zeitlich gestaffelten Transkriptomstudien an *Arabidopsis thaliana* nach Pathogenelicitation. Ebenfalls über cDNA-Arrays konnten sie zeigen, dass innerhalb der ersten 10 Minuten zunächst ungefähr 650 Gene aktiviert werden und das Expressionsmuster leicht vom *steady state*-Zustand abweicht. Nach ca. sieben Stunden hat sich das Gesamtexpressionsmuster der Pflanze unter Beteiligung von mindestens 2000 Genen allerdings massiv verändert. Neben erwartungsgemäß betroffenen Stoffwechselwegen (Phenylpropanoid- und Ethylenstoffwechsel, Krebs-Zyklus, Pentosephosphatweg) scheinen auch bisher nicht mit der Abwehr in Verbindung gebrachte Zweige wie der Glyoxylat-Zyklus von der grundlegenden Umstrukturierung des Metabolismus bei biotischem Stress beteiligt zu sein.

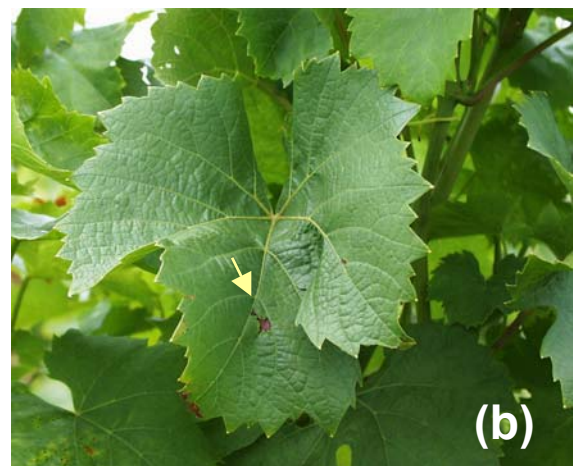
Nukleinsäure-Arrays präzisieren zwar in vielen Fällen den Kenntnisstand und wie in den angesprochenen Beispielen können sie der Problemlösung auch neue Impulse geben (etwa zuvor uncharakterisierten Proteinen eine putative Funktion zuzuerkennen), indem sie Raum für Neues und Unerwartetes lassen. Man muss jedoch bedenken, dass die Detektionsmöglichkeiten der Array-Techniken die Sensitivität von PCR-basierten Methoden nicht ohne weiteres erreichen und dass sich der Blick auf die Ebene von Transkripten verengt. Post-transkriptionale Regulation, Spleißvarianten etc. bleiben bei der Bewertung unberücksichtigt. Dies zeigt, dass es ab einem bestimmten Punkt Sinn macht, sequenz- und genombasiert zu arbeiten. Dabei dient die Korrelation mit kartierten molekularen Markern als notwendige Orientierungshilfe. Sie stellt auch den Übergang zur QTL-Analyse und damit zu einem übergeordneten informativen Rahmen für die Interpretation von Expressionsstudien und ihrer möglichen Relevanz für einen bestimmten quantitativen Effekt her – mit dem Vorteil, dass unterschiedliche Kategorien von Versuchsergebnissen gemeinsam mit einer großen Menge Freilanddaten bewertet und Korrelationen erkannt werden können.

## 2.16 Kenntnisstand zum Pilzresistenzverhalten der Weinrebe

Für die Ausprägung der Resistenz bei der Weinrebe ist kontrollierten Zelltodreaktionen eine besondere Bedeutung beizumessen. Dies belegen Freilandbeobachtungen unter natürlichen Bedingungen ebenso wie *in vitro*-Inokulationen (z.B. mit *Plasmopara viticola*).

### 2.16.1 Die Resistenzausprägung der Rebe im Freiland

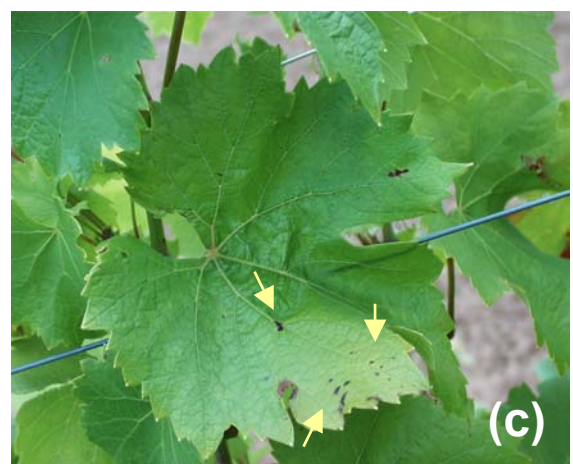
Im Gewebe anfälliger Freilandreben wie ‘Lemberger’ breitet sich *Plasmopara viticola* fast ungehindert aus, äußerlich erkennbar durch gelbliche, leicht transparente „Ölflecken“ als Zeichen des zugunsten des Pilzhyphenwachstums in Auflösung begriffenen Blattgewebeverbandes (vgl. Abb.2.5 (a) ). Ist dieses Stadium erreicht, wird sich der Gesamtzustand der befallenen Pflanze in absehbarer Weise mit Abnahme des photosynthetisch aktiven Laubanteils rapid verschlechtern.



**Abb. 2.5: (a) Plasmoparabefall, ‘Lemberger’ (Freilandpflanze).**

Das linke Blatt zeigt Ölflecken mit fast flächendeckender Ausbreitung. Das rechte Blatt im fortgeschrittenen Befallsstadium hat bereits große, in Ölflecken auslaufende Läsionen in der Nähe der Blattadern gebildet.

**(b), (c) ‘Regent’ (Freilandpflanze)** Aufnahmen vom gleichen Tag wie (a). Winzige scharf abgegrenzte Nekrosen (s. gelbe Pfeile) bei ‘Regent’ deuten auf Infektionsereignisse hin, beeinträchtigen die Vitalität der Pflanze jedoch nicht.

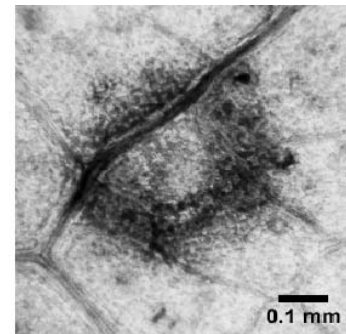


### 2.16.2 Reaktion auf Infektion mit *Plasmopara viticola* im Experiment

Eine Schlüsselrolle bei frühen Abwehrreaktionen spielen Redoxenzyme wie die Peroxidasen. So ist ringförmig um das Zentrum der Infektion bei resistenten Pflanzen rasch eine gesteigerte Peroxidaseaktivität (s. Abb. 2.6 ) und die Einlagerung polyphenolischer Verbindungen festzustellen, während diese histochemischen Veränderungen bei sensitiven Sorten ausbleiben (KORTEKAMP et al., 2003).

**Abb. 2.6: Peroxidaseaktivität an einer Infektionsstelle.**

Das an den *Plasmopara*-befallenen Bereich angrenzende nicht infizierte Blattgewebe zeigt ringförmig um die Infektionsstelle eine erhöhte Peroxidaseaktivität, nachweisbar durch kontrastive Benzidinfärbung. Zellen im Zentrum der Nekrose sterben schnell ab. Hier exemplarisch gezeigt an 'Gloire de Montpellier' (KORTEKAMP, 1999).



Die Ausprägungsvarianten der HR in Zusammenhang mit dem Resistenzgrad lassen sich wie folgt zusammenfassen (ebd.):

- Individuelle Maxima nach Fremderreger-Kontakt (*Plasmopara halstedii* der Sonnenblume) wurden schnell erreicht (< 1 Tag bei allen Testpflanzen).
- Sensitive Sorten ('Riesling') zeigten 12 Stunden nach *Plasmopara viticola*-Kontakt substomatäre Vesikel und volumenreiche Sekundärhyphen sowie ungebremsten Befall des Nachbargewebes.
- Bei Toleranz ('Phoenix', 'Orion') ist das Pilzwachstum verlangsamt und das Pathogen geschwächt, die Pflanze gewinnt Zeit für die Abwehr.
- Auch im Fall resistenter Sorten ('Regent', 'Seyval') wird die Sporangienkeimung in den meisten Fällen nicht vollständig verhindert. Primärhyphen beschränken sich hier jedoch auf die direkt infizierten Zellen, die schnell apoptotisch werden und absterben. Appressorien sind – falls vorhanden - klein oder deformiert.

Bezogen auf die cytosolische Peroxidase (ein induziertes Redoxenzym des Abwehrsystems, dem hier Reporterfunktion zukommt) erfordert ein resistenter Phänotyp **das schnelle Erreichen eines hohen Aktivitätsniveaus**. Im Fall von resistenten Ertragsorten, die sich in ihren Stoffwechselschwerpunkten zuchtbedingt von Wildarten wie 'Vitis Riparia' (stark erhöhter Peroxidasebasalaktivität und mit 80% sehr hohes Aktivitätsniveau fünf Tage nach Infektion) unterscheiden, scheint das Absinken auf ein

relativ **niedriges Endniveau** zusätzlich eine wichtige Rolle zu spielen; die Basalaktivität ist niedrig.

REPKA und FISCHEROVA (2001) zeigten, dass durch exogen applizierte Elicitoren (Methyljasmonat sowie Tunicamycin) bei der Sorte ‘Lemberger’ eine HR-artige Reaktion induziert werden kann. ‘Lemberger’ wird in der Regel allerdings zu denjenigen pilzanfälligen Sorten gezählt, bei denen eine effektive HR-Reaktion nicht sortentypisch ist. Nach Angaben der Autoren spielt im Fall von ‘Lemberger’ die Verbindung  $H_2O_2$  bei der dort beobachteten „HR“ keinerlei Rolle. Diese Beobachtungen lassen den von MITTLER et al. (1996) vermuteten und an Tabak bestätigten Dualismus von  $H_2O_2$ -abhängigen und unabhängigen Zelltodreaktionen bei der Abwehr anklingen (vgl. S. 30). Möglicherweise sind bei phänotypisch resistenten Rebsorten beide Wege relevant.

Dass HR und Resistenz eng miteinander verknüpft sind, gilt als gesichert (KORTEKAMP et al. 1997; SCHULZE-LEFERT und VOGEL, 2000), doch konnte experimentell bislang keine direkte und eindeutige Korrelation zwischen beiden Prozessen demonstriert werden (KOMBRINK und SCHMELZER, 2001). KIRALY et al. (2001) betonen, dass die HR als wirksame Konsequenz, nicht jedoch als Ursache der Resistenz an sich gesehen werden sollte. Sofern man Resistenz als balancierten Zustand zwischen Zelltod und Vitalität interpretiert, spielt das komplexe Rahmengeschehen um eine effektive hypersensitive Reaktion ebenfalls eine entscheidende Rolle.

Als Kernaussage lässt sich zur Bedeutung der HR bisher festhalten, dass die Fähigkeit zur raschen Bildung kleiner gut abgegrenzter Nekrosen unter Erhalt eines guten Allgemeinzustands im Fall der Rebe wichtige Faktoren für effektive lokale Abwehrreaktionen sind. Dies gilt insbesondere für die Sorte ‘Regent’, dem resistenten Kreuzungspartner der für diese Dissertation untersuchten Population. Sollte es möglich sein, Resistenzloci mit „Bottleneck“-Funktion in der Weinrebe zu identifizieren, wäre es deshalb durchaus denkbar, dass sie frühe Kontrollpunkte der Signaltransduktion auf dieser Ebene beeinflussen.

Die Ausgangsthese zu Beginn der Arbeit war dementsprechend, dass die Ausprägung der hypersensitiven Reaktion als wichtige Voraussetzung für die Pilzresistenz erachtet wird.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Pflanzen

##### 3.1.1 Der weibliche Elter: 'Regent'

'Regent' geht aus einer Kreuzung von ('Silvaner' x 'Müller-Thurgau') x 'Chambourcin' hervor. Sortenschutz für diese Neuzüchtung, die gute Qualitätseigenschaften und Pilzresistenz in sich vereint, besteht in Deutschland seit März 1994 und europaweit seit Oktober 1996.

Die Eigenschaften und Sortenmerkmale von 'Regent' sind nachfolgend nach dem Farbatlas der Rebsorten (AMBROSI et al., 1998) sowie der „Allgemeinen Sortenbeschreibung 'Regent' (Gf.67-198-3)“ des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof (1998) zitiert:

- ◆ Behaarung an den Blatthauptrippen der Unterseite.
- ◆ Traube mittelgroß, etwas lockerbeerig.
- ◆ Beeren klein bis mittelgroß, rund, blau, Saft leicht gefärbt.
- ◆ Bei Vollreife lösen sich die Beeren leicht vom Traubengerüst.
- ◆ Wein tiefrot, kräftig, gerbstoffbetont, auf unterschiedliche Weise ausbaubar (auch vollmundiger Rosé, auch Sekt), gewinnt durch Holzfaßausbau.
- ◆ Austrieb früh.
- ◆ Reife mittelfrüh.
- ◆ Wüchsigkeit mittelstark, geringe Geiztrieb Bildung.
- ◆ Sehr gute Winterhärte.
- ◆ Geeignet sind warme geschützte Lagen zur Vorbeugung von Verrieselung.
- ◆ Ertrag zwischen Spätburgunder und Portugieser; Mostgewicht um 80° Oe, Mostsäurewerte bei ca. 8 g/l.
- ◆ Reblausresistenz der Blätter hoch, Wurzel anfällig, erfordert Pfropfung.
- ◆ Resistenz gegen *Plasmopara viticola* hoch, gegen *Uncinula necator/Oidium tuckeri* gut.
- ◆ Toleranz gegenüber *Botrytis cinerea* hoch.

##### 3.1.2 Der männliche Elter: 'Lemberger' (Synonyme 'Limberger', 'Blaufränkisch')

Die Abstammung der Sorte 'Lemberger' ist noch in Aufklärung. Vermutlich handelt es sich um eine alte österreichische Sorte mit komplexen Ursprüngen, deren Wurzeln in den Balkan führen. Als Rotweinsorte ist 'Lemberger' zwischen 'Portugieser' und

‘Burgunder‘ eingeordnet (AMBROSI et al., 1998) und liefert ausgezeichnete Weinqualität. Bezogen auf Deutschland ist ‘Lemberger‘ hauptsächlich in Württemberg zu finden; Hauptanbaugebiet ist Österreich.

Wichtige Merkmale der Sorte ‘Lemberger‘ nach dem Farbatlas der Rebsorten (AMBROSI et al., 1998) sind:

- ◆ starke Wüchsigkeit
- ◆ früher Austrieb, daher maifrostempfindlich.
- ◆ Blatt nicht behaart
- ◆ Traube mittelgroß, geteilt, meist locker. Neigt zu Verrieselung.
- ◆ Beere mittelgroß, rund, dunkelblau, Schale fest.
- ◆ Relativ geringe *Botrytis cinerea* - Empfindlichkeit erlaubt späte Lese. Jedoch anfällig gegenüber *Plasmopara viticola* und *Uncinula necator/Oidium tuckeri*
- ◆ Markante, in der Jugend feinfruchtige, säurebetonte Weine mit langer Haltbarkeit.

### **3.1.3 Die Kreuzungspopulation ‘Regent’ x ‘Lemberger’**

Die F1-Population zur Markerentwicklung geht aus einer Kreuzung der mehrfach pilzresistenten Sorte ‘Regent’ mit der als anfällig eingestuften klassischen Sorte ‘Lemberger’ hervor.

Die Nachkommen unterscheiden sich phänotypisch stark. Eine Vorstellung dessen vermittelt allein schon die Traubenvariabilität in der Population (vgl. Abb. 3.1).

Die Pflanzen wurden in den Boniturjahren nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt.



**Abb. 3.1 Traubenvariabilität an Beispielen aus der Population ‘Regent‘ x ‘Lemberger‘**

Alle Aufnahmen vom 10. September 2000. Unterschiede in Reifezustand, Beerenfarbe, Beerengröße und Traubenform treten deutlich in Erscheinung.

Insbesondere die Resistenz gegenüber dem Erreger des Falschen Mehltaus, *Plasmopara viticola*, spaltet in der Filialgeneration deutlich auf. Von 153 Individuen liegen umfangreiche Feldboniturdaten aus einem Zeitraum von sechs Jahren vor. Die Erfassung erfolgte 1995, 1999, 2000 u. 2001 durch die Züchtungsabteilung des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof (EIBACH und Mitarbeiter). Klimatische Besonderheiten wie starker Pilzdruck, Hitzeperioden oder punktuelle, große Niederschlagsmengen der Erfassungsjahre fanden bei der Beurteilung der Ergebnisse Berücksichtigung.

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof und dem Institut National de Recherches Agronomiques (INRA) wurde im elsässischen Colmar für eine Auswahl von Stecklingen der Kreuzungspopulation unter Gewächshausbedingungen die Resistenz gegen *Plasmopara viticola* anhand von Blattscheibenassays getestet (WIEDEMANN-MERDINOGLU und Mitarbeiter), um die Aussagekraft der vorliegenden Studie durch die integrierte Betrachtung verschiedener Standorte und Erfassungsmethoden zu verbessern.



### 3.2 Bewertung agronomischer Eigenschaften im Freiland

Die Bonitur erfolgte unter Verzicht auf den Einsatz von Pflanzenschutz nach den allgemeinen Kriterien und mittels der vom Office International de la Vigne et du Vin (OIV) anerkannten [O-] und [U-]Deskriptoren (Überblick s. TAB. 3-1, für detailliertere Angaben zur Bonitur vgl. ‘*Descriptors for Grapevine*’, ©International Plant Genetic Resources Institute IPGRI, 1997; OIV, 1997 über <http://www.cgiar.org/ipgri/>).

TABELLE 3-1

#### Überblick zur Bonitur der Kreuzungspopulation ‘Regent’ x ‘Lemberger’ nach anerkannten OIV-Kriterien.

Die vergebenen Boniturnoten (EIBACH und Mitarbeiter) lieferten der QTL-Kartierung die Rohdatenbasis. Merkmale mit \* sind gemäß der ergänzten Erläuterungen modifiziert erfasst worden. Die Beerenhautfarbe wurde als qualitativer morphologischer Marker erfasst. Die Nekrosenbildung bei *Plasmopara*-Infektion wurde als separates Merkmal analysiert. Statt Infloreszenzen wurden Trauben pro Trieb bonitiert.

Merkmal, Deskriptor	Bewertung nach Richtlinien des OIV						
	1	3	5	7	9		
Triebwachstum [O-353]	sehr schwach	schwach	mittel	stark	sehr stark		
Axillartrieb Bildung [O-352]	sehr schwach	schwach	mittel	stark	sehr stark		
Beerenansatz in % [O-501]	sehr gering	gering	mittel	hoch	sehr hoch		
Trauben pro Trieb* [O-153: Infloreszenzen pro Trieb]	1 bis zu 1 Traube	2 1,1 bis 2 Trauben	3 2,1 bis 3 Trauben	4 mehr als 3 Trauben			
Beginn der Beerenreife [O-303]	1 sehr früh	3 früh	5 mittel	7 spät	9 sehr spät		
Trennung vom Beerenstiel [O-240] [U-51]	1 schwierig	2 leicht					
Beerenzahl [O-501]	1 sehr schwach	3 schwach	5 mittel	7 stark	9 sehr stark		
Beerengröße [O-220]	1 sehr klein	3 klein	5 mittel	7 groß	9 sehr groß		
Beerenhautfarbe* hier als morpholog. Merkmal erfasst	1 gelb-grün	2 rosa	3 rot	4 rot- grau	5 dunkelrot- violett	6 blau- schwarz	7 rot- schwarz
Traubengröße [U-39]	1 sehr klein	3 klein	5 mittel	7 groß	9 sehr groß		
Traubendichte [O-204] [U-40]	1 sehr locker	3 locker	5 mittel	7 dicht	9 sehr dicht		
% <i>Botrytis</i> -Befall zur Lese [O-459]	1 sehr gering	3 gering	5 mittel	7 hoch	9 sehr hoch		
<i>Plasmopara</i> -Befall Blatt [O-452]	1 sehr gering	3 gering	5 mittel	7 hoch	9 sehr hoch		
<i>Plasmopara</i> -Befall Blatt Größe der Nekrosen* [in O-452 enthalten]	1 sehr klein	3 klein	5 mittel	7 groß	9 sehr groß		
<i>Plasmopara</i> -Befall Beere [O-453]	1 sehr gering	3 gering	5 mittel	7 hoch	9 sehr hoch		
<i>Oidium</i> -Befall Blatt [O-455]	1 sehr gering	3 gering	5 mittel	7 hoch	9 sehr hoch		
<i>Oidium</i> -Befall Beere [O-456]	1 sehr gering	3 gering	5 mittel	7 hoch	9 sehr hoch		

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Präparation genomischer DNA im Midi-Maßstab aus der Rebe

Ausgangsmaterial für die Präparation genomischer DNA (THOMAS et al., 1993) waren triebspitzenständige junge Rebblätter, die im frühen Stadium der Vegetationsperiode direkt von den Einzelstöcken der Kreuzungspopulation abgesammelt wurden. Die vollständigen Blättchen wurden am Blattstiel abgeknipst und bis zur Aufbereitung in Tüten auf Eis in einer Kühlbox aufbewahrt. Die schonende Behandlung erhält die Qualität des Blattmaterials, da die Vakuolen unverletzt bleiben. Dies minimiert ein Austreten von phenolischen Substanzen, die rasch zu Verbräunung und Läsionen führen würden. Zur DNA-Präparation wurde wie folgt verfahren:

- ◆ Puffer A: 0,25 M NaCl  
0,2 M Tris-HCl; pH 8,0  
50 mM EDTA; pH 8,0  
0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2,5 % PVP 40 000
- ◆ Puffer B: 0,5 M NaCl  
0,2 M Tris-HCl; pH 8,0  
50 mM EDTA; pH 8,0  
2,5 % PVP 40 000  
3 % N-Laurylsarkosin  
20 % Ethanol
- ◆ 1 x TE: 10 mM Tris-HCl; pH 8,0  
1 mM EDTA
- ◆ RNase-Stammlösung (Maßstab: 1 ml; Konz. 10 mg/ml) :
  - ◆ 10 mg Ribonuclease A in 10 mM Natriumacetatpuffer; pH 5,2  
ca. 15 min kochen.
  - ◆ Abkühlen lassen, 1/10 Vol an 1 M Tris-HCl; pH 7,4 zugeben.
  - ◆ Mischen, aliquotieren, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.
- ◆ 2 g junge Blätter ohne Schädlingsbefall in flüssigem Stickstoff schockfrosteten, zu Pulver zermörsern und in Zentrifugenröhrchen überführen.
- ◆ Ohne die Proben auftauen zu lassen mit Puffer A versetzen, mit Vortex mischen.
- ◆ Bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 8000 rpm zentrifugieren (Sorvall RC-5B, Rotor SS34 ,10').
- ◆ Überstand abgießen. Pellets mit 5 ml Puffer B resuspendieren. Für 30 min in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Wasserbad inkubieren, gelegentlich vorsichtig (wegen der Rohkerne) umschwenken, da sich sonst ein zäher Bodensatz bildet.

- ◆ 25 ml (d.h. gleiches Volumen) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben, mit Vortex mischen und bei 4 °C und 14200 rpm in der Zentrifuge (Sorvall, s.o.) die Phasentrennung herbeiführen.
- ◆ Wässrige Oberphase mit einer weitlumigen Pasteurpipette in ein Sorvall-Röhrchen überführen.
- ◆ DNA-Lösung mit 0,54 Vol (= 2,7 ml) Isopropanol versetzen. Vorsichtig mischen und 10 min inkubieren.
- ◆ DNA bei 4°C und 14200 rpm durch Zentrifugieren pelletieren. Überstand verwerfen, trocknen lassen.
- ◆ DNA-Pellet mit 2 x 300 µl TE resuspendieren und in ein Eppendorfgefäß überführen.
- ◆ 3 µl einer RNase-Stammlösung zusetzen. 30 min bei 37°C inkubieren.
- ◆ Probe mit 0,5 Vol. (300 µl) Ammoniumacetat mischen. Proteine ausfallen lassen und mit Tischzentrifuge pelletieren, den Überstand in ein frisches Gefäß abdekantieren.
- ◆ Zugabe von 0,54 Vol. (ca. 550 µl) Isopropanol, 10 min auf Eis stellen, 20 min bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugieren. Überstand verwerfen,
- ◆ Pellet trocknen lassen und in 200 µl 1x TE resuspendieren.
- ◆ Die Lösung genomischer DNA wird im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Zur Beurteilung des Präparationsresultats wurde ein 0,8 %iges Agarose-Minigel (s.u.) mit 1 µl der Präparation im Mengenvergleich zu 0,1 und/oder 0,05 µg ungeschnittener λ-DNA 90 min bei 8 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

### **3.3.2 Normalisieren der Arbeitslösungen**

In Verdünnungsreihen mit TE-Puffer wurden über ein Agarosegel im Abgleich gegen einen DNA-Mengenstandard bekannter Konzentration (z.B. 25 und 50 ng ungeschnittene λ-DNA, Boehringer) gleichmäßig konzentrierte Arbeitslösungen genomischer DNA von 20 ng/µl für die PCR (vgl. S. 49) hergestellt, die bei 4°C aufbewahrt wurden.

### **3.3.3 DNA-Elektrophorese im horizontalen Agarosegel**

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA im Agarosegel, einer elektrisch neutralen Matrix, handelt es sich um eine Molekularsiebchromatographie im elektrischen Feld. Die Fragmente wandern aufgrund ihres negativ geladenen Phosphodiesterückgrats zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Fragmentlänge in der Gelmatrix unterschiedlich stark retiniert. Die Porengröße wird über den Prozentanteil der Agarose

festgelegt. Die Gelelektrophorese kann z.B. zur Qualitätsprüfung einer DNA-Präparation, zur Kontrolle einer enzymatischen Restriktion, zur Analyse eines PCR-Ansatzes oder zur Abschätzung der Konzentration von DNA in einer Probe dienen.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden 0,8 – 2,0-prozentige Gele benutzt. 0,5 x TBE wurde sowohl zur Bereitung der Gele als auch als Laufpuffer eingesetzt.

5 x TBE	◆ 54 g Tris-HCl
pH 8,3	◆ 27,5 g Borsäure
	◆ 20 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0
	◆ H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad 1000 ml

Die Proben wurden vor dem Auftrag mit ca. 0,2 Volumina Gelladepuffer versetzt. Das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau kann als Frontmarker dienen, da es in seiner Laufgeschwindigkeit kleinen DNA-Fragmenten von ca. 250 bp entspricht, während das hellere Xylen-Cyanol in der Region um 4 kb wandert (SAMBROOK et al., 1989).

Gelladepuffer	◆ 2,5 mg Bromphenolblau
	◆ 2,5 mg Xylen-Cyanol
	◆ 300 µl Glycerol
	◆ H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad 1 ml

Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE gelöst und vor dem Gießen des Gels unter Rühren bis auf ca. 60°C abgekühlt. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei einer Spannung zwischen 3 und 10 V/cm in einer geschlossenen Elektrophoresekammer (MWG Biotech, Ebersberg bzw. Biometra, Göttingen). Als Spannungsquelle diente ein Netzgerät (Power Pac 300; Biorad, München). Zur Detektion der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese einige Minuten in einer Ethidiumbromidfärbelösung mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml sachte geschüttelt. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch Schwenken des Gels in Wasser entfernt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen beiden DNA-Strängen und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht. Zur Auswertung wurden die Gele auf einen UV-Transilluminator (IL 350 M; Bachhofer, Reutlingen; Wellenlänge: 300 nm) mit angekoppeltem Kamerasystem (Polaroid) transferiert. Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert (Polaroidprint).

Ein Molekulargewichtsmarker mit Fragmenten bekannter Größe und Konzentration bzw. ein Mengenstandard dienten in der Regel als Referenz zur Bewertung der zu analysierenden DNA-Proben.

### 3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur selektiven primerdeterminierten Amplifizierung von DNA-Zielfragmenten. Der Reaktionsansatz enthält die Matrizen-DNA, problemspezifisch ausgewählte Oligonukleotidprimer, die vier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) als Grundbausteine sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase (üblicherweise Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) in einem geeigneten Reaktionspuffer. Drei zyklisch wiederholte Schritte charakterisieren den Verlauf der PCR:

- (1) Denaturierung: Trennung der Doppelstrang-DNA bei 90 - 95°C in Einzelstränge
- (2) „Primer-Annealing“: Die Oligonukleotidprimer lagern sich während des Absenkens der Temperatur auf das Niveau der individuellen Hybridisierungstemperatur an komplementäre Zielstellen in der denaturierten Matrize an.
- (3) Extension: Die DNA-Polymerase verlängert die Stränge in beiden Richtungen komplementär bei einer Einstellung, die der Idealtemperatur der verwendeten hitzestabilen Polymerase entspricht (72°C für die hier verwendete Taq-Polymerase von Boehringer/Roche, Mannheim bzw. Amplitaq Gold von PE Applied Biosystems, Foster City)

Die Anzahl der Zyklen liegt in der Regel zwischen 25 und 32. Beim letzten Schritt verlängert man die Zeit für die Polymerisation um mehrere Minuten, um alle Stränge vollständig zu synthetisieren. Schon mit dem zweiten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer zueinander entspricht. Der Anteil dieser Zielfragmente wächst annähernd exponentiell im Verlauf weiterer Zyklen. Das Erhitzen und Abkühlen regelt ein automatischer Thermocycler. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Thermocycler Hybaid Touch Down (MWG-Biotech, Ebersberg) und #9600 (PE Applied Biosystems) eingesetzt.

### 3.3.5 PCR-Varianten

■ **Touchdown-PCR** Diese PCR-Variante (DON et al., 1991) kam bei der Generierung von AFLP-Markern zum Einsatz. Bei jedem neuen Zyklus erniedrigt sich die Annealingtemperatur beginnend bei 60°C um diskrete Temperaturschritte, hier um 1°C. Unter zunächst hoher Stringenz der Primerbindung wird eine Population von Fragmenten amplifiziert, die in den nachfolgenden Zyklen die Basis für die exponentielle Reamplifikation bilden. Im Verlauf des Temperaturprofils nimmt in gegenläufiger Weise mit dem Anwachsen der Fragmentdichte in der Probe die Stringenz zugunsten der

Amplifikationsausbeute schrittweise ab. Das Touchdown-Protokoll wirkt sich ausgleichend bezüglich der begünstigten Amplifikation von Fragmenten eines bestimmten „Größenfensters“ aus, nivelliert also kompetitive Effekte längenbedingter Fragmentmobilität bei der PCR (Informationen des *AFLP Plant Mapping Kit Manual*, © 1996 The Perkin-Elmer Corporation).

■ **Multiplex-PCR** Als Methode der Durchsatzsteigerung bei der Markererzeugung wurde die sogenannte Multiplex-PCR getestet. Dazu kombiniert man mehrere Primerpaare im gleichen Reaktionsgefäß, erzeugt theoretisch also in einer gemeinsamen Reaktion (bzw. pro Zeiteinheit) ein Vielfaches an Markern (VEENSTRA-VAN DER WEELE et al., 1997).

### 3.3.6 Primer für die PCR

Für jede geplante Amplifizierung konstruiert man „forward -“ und „reverse -“ Primer möglichst so, dass sie eine ähnliche Hybridisierungs- oder Schmelztemperatur ( $T_m$ , mit „m“ für „Melting“) haben. Die  $T_m$  kann über folgende Formel (Faustregel) errechnet werden:

$$\text{Anzahl (A+T)} \cdot 2 [^\circ\text{C}] + \text{Anzahl (G+C)} \cdot 4 [^\circ\text{C}]$$

Die idealen Temperaturen liegen in der Praxis mitunter 3 - 12°C über der errechneten  $T_m$ , so dass im Einzelfall eine Optimierung notwendig sein kann.

Ca. 200 SSR-Primersequenzen des Vitis Microsatellite Consortium (VMC) standen dem Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof zum gegebenen Zeitpunkt zur Verfügung. Alle VMC-Primersequenzen werden Ende 2004 öffentlich verfügbar (Ríaz et al., 2004). Oligoprimer einschließlich SSR-Primern mit Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende wurden durch MWG (Ebersberg) in Auftragssynthese hergestellt. AFLP-Primer wurden als Teil des *AFLP Plant Mapping Kit* von PE Applied Biosystems erworben (Sequenzinformation: ZABEAU und VOS (1992), European Patent Application).

### 3.3.7 SSR-Analyse

#### 3.3.7.1 Spezifische Amplifikation von SSR-Loci

Empfehlenswert für die SSR-Analyse sind Thermocycler mit rascher Thermoanpassung und Deckelheizung wie z.B. das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Gerät 9600 von PE Applied Biosystems. Das hier verwendete PCR-Programm zur Darstellung von SSR-Markern entsprach einem angepassten Standardprotokoll:

95 °C 3 min  
 92°C 2 min }  
 T<sub>m</sub> 30 s } 32 x  
 72°C 30 s }  
 72°C –20 min

Die optimale Primeranlagerungstemperatur T<sub>m</sub> hängt außer vom GC-Gehalt der Oligonukleotide auch von der Passgenauigkeit der Primer auf die Testsorte ab. Sie wurde für jedes Primerpaar vor dem Parentalscreening gemäß  $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T) - 5$  °C ermittelt und im Einzelfall nachoptimiert.

### 3.3.7.2 Parentalscreening

Ein Parentalscreening an Stichproben der Kreuzungspopulation ‘Regent’ x ‘Lemberger’ diente der Auswahl solcher Primerpaare, die segregierende SSR-Marker erzeugen. Da die Primerentwicklung an anderen als den hier untersuchten Sorten (z.B. an ‘Cabernet Sauvignon’) durchgeführt wurde, war ein Parentalscreening außerdem auch als „Eignungsprüfung“ von Primerpaaren sinnvoll: In Testamplifikationen mit beiden Eltern sowie einem Subset von fünf Nachkommen wurden die grundsätzliche Amplifizierbarkeit, die Reproduzierbarkeit und die Eindeutigkeit des Resultats ermittelt. Das Screening wurde über silbergefärbte Polyacrylamidgele (je nach erwarteter Fragmentgröße 6% oder 8%) ausgewertet und über Fotokopien dokumentiert. Primer, die sich im Screening bewährten, d.h. Polymorphismen klar zutage treten ließen, wurden zur Analyse der Gesamtpopulation ausgewählt. Hierzu wurde in der Regel ein chemisch modifizierter Forward-Primer eingesetzt, so dass die PCR-Produkte am 5'-Ende mit einem ABI-kompatiblen Farbstoff fluoreszenzmarkiert vorlagen.

### 3.3.8 AFLP-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Plant AFLP Kit for medium and small sized Genomes* (PE Applied Biosystems, basierend auf einer Methode von ZABEAU und VOS, 1992) getestet und für die Analyse der Rebe als geeignet befunden. Die Beschaffenheit der Kit-Komponenten stützt sich laut Herstellerangaben auf Erfahrungen mit bereits charakterisierten Pflanzengenomen (Mais, Reis, Getreide, Tomate).

Der Einfachheit halber werden im Folgenden als „Eco-Primer“ von der *EcoRI*-Zielsequenz abgeleitete, als „Mse-Primer“ von der Erkennungssequenz des Enzyms *MseI* abgeleitete AFLP-Primer bezeichnet.

### 3.3.8.1 Vorbereitung der genomischen DNA für die AFLP-Analyse

Gemäß dem leicht modifizierten AFLP-Protokoll des *Plant AFLP Kit for medium and small sized Genomes* (© 1996 The Perkin-Elmer Corporation) wurde eine DNA-Menge von rund 500 ng pro Ansatz/Individuum eingesetzt, was ungefähr der DNA-Ausbeute aus 0,5 Gramm junger Rebenblätter entspricht. In einem Test mit *EcoRI*, *MseI* und beiden Enzymen in Kombination wurde die genomische DNA vorab auf problemlose Restringierbarkeit geprüft. Hierzu wurde ca. 1 µg DNA eingesetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde über ein 1,5 %iges Agarosegel analysiert.

### 3.3.8.2 Vorbereitung der Adaptoren

Der im *Plant AFLP Kit* enthaltene Adaptormix wurde 10 Minuten im Wasserbad aufgekocht und dann allmählich auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 3.3.8.3 Restriktions – Ligations - („R-L“-) Reaktion

Zwei Enzyme dienen bei dem verwendeten *Plant AFLP Kit* dazu, geeignete Restriktionsfragmente für die Folgeschritte zu produzieren: *EcoRI*, ein Enzym, das in einer durch sechs Basen definierten Region schneidet, als zweite Endonuklease wird *MseI* mit einer vier Basen umfassenden Erkennungsequenz eingesetzt. In einer kombinierten Reaktion ligieren doppelsträngige sticky end-Adaptoren von 25 bp Länge an die bei der Restriktion neu entstehenden Eco- und Mse-Sticky Ends. Dabei wird die Zielsequenz der Enzyme verändert, so dass erneutes Schneiden verhindert wird. In dieser Reaktion entstehen folgende Kategorien von Fragmenten: 3'Eco-Eco5' und 3'Eco-Mse5', 3'Mse-Eco5' und 3'Mse-Mse5'. Da lediglich die selektiven *Eco*-Primer an ihrem 5'-Ende fluoreszenzmarkiert sind, wird ausschließlich die Fraktion der 3'Mse-Eco5'-Fragmente von der CCD-Kamera des ABI Prism GA 310 detektiert.

### Ansetzen eines Enzym-Mastermix für die R-L-Reaktion

- ◆ 10 µl 10x T4 DNA-Ligasepuffer mit ATP
  - ◆ 10 µl 0,5 M NaCl
  - ◆ 5 µl 1 mg/ml BSA (verdünnt aus einer 10 mg/ml Stammlösung)
  - ◆ 100 U *MseI*
  - ◆ 500 U *EcoRI*
  - ◆ 100 U T4 DNA Ligase (Boehringer/Roche)
- 
- ◆ ad. 100 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest.                      Mischen und bis zur Verwendung auf Eis stellen.



**Puffer für die R-L-Reaktion: 10 x Ligasepuffer**

- ◆ 500 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- ◆ 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- ◆ 100 mM DTT
- ◆ 10 mM ATP
- ◆ 250 µg/ml Rinderserumalbumin, BSA

**Ansetzen der R-L-Reaktion**

In einem sterilen Eppendorfgefäß werden folgende Komponenten vereint:

- ◆ 500 ng genomische DNA in 5,5 µl sterilem destilliertem Wasser
- ◆ 1,0 µl 10 x T4 DNA Ligasepuffer mit ATP
- ◆ 1,0 µl 0,5M NaCl
- ◆ 0,5 µl 1,0 mg/ml BSA (verdünnt aus einer 10 mg/ml Stammlösung)
- ◆ 1,0 µl *Mse*I - Adaptorenpaar
- ◆ 1,0 µl *Eco*RI - Adaptorenpaar
- ◆ 1,0 µl Enzym-Mastermix

**1 x Ligasepuffer:**

- ◆ 50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
- ◆ 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- ◆ 10 mM DTT
- ◆ 1 mM ATP
- ◆ 25 µg/ml Rinderserumalbumin, BSA

Nach kurzem Mischen wird die Flüssigkeit mit einer Tischzentrifuge am Boden des Gefäßes gesammelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

**3.3.8.4 Präselektive Amplifikation**

Die Basenfolge der Adaptoren und die Restriktionsstelle, einschließlich der flankierenden Basen, bilden die Primerbindungssequenz der Präamplifikation. Der dem *Mse*I-Adaptor komplementäre Primer endet darüber hinausreichend mit einem 3′C. Während der nun folgenden PCR werden solche Fragmente angereichert, die die entsprechende Basenfolge einschließlich des überhängenden selektiven Nukleotids für die Bindung der Präamplifikationsprimer besitzen. In die Vertiefungen einer 96-Well-

Polycarbonat-Mikrotiterplatte wurden jeweils 4,0 µl der verdünnten R-L-DNA-Lösung, 1 µl des präselektiven Primermix aus dem Kit sowie 15,0 µl des AFLP Core Mix gegeben. Die Proben wurden mit folgendem nach Angaben von PE Applied Biosystems zitierten Programm (s. Tab. 3-2) amplifiziert:

TABELLE 3-2 Präselektive PCR, Thermocyclerprogramm

Hold		Cycle		Hold	Anzahl der Zyklen
72 °C	2 min	-	-	-	1
94 °C	1 s	56 °C	30 s	72 °C 2 min	20
60 °C	30 min	60 °C	30 s	-	1
4 °C	-	-	-	-	-

Zur Überprüfung des Verlaufs dieser PCR wurden 10 µl der Probe auf einem 1,5%igen Agarosegel bei 4 V /cm für 3 Stunden der Elektrophorese unterzogen (zu erwarten ist laut Herstellerangaben ein Schmier im Bereich 1000 bp ± 500 bp). Die übrigen 10 µl der Proben wurden in fest schließende Gefäße überführt, mit 190 µl TE<sub>0,1</sub> aufgefüllt und bei 5°C aufbewahrt.

### 3.3.8.5 Amplifikation der AFLP-Zielsequenzen

Die selektive Amplifikation der Zielsequenzen erfolgte im jeweils gleichen Thermoblock des Thermocyclers Hybaid Touch Down (MWG-Biotech, Ebersberg). In einem Gesamtvolumen von 20 µl waren enthalten:

- ◆ 3µl Pre-Amplification-Mix
- ◆ je 1 µl markierter Eco- und unmarkierter Mse-Primer
- ◆ 15µl Amplification-Core-Mix

---

Zusammensetzung des Amplification-Core-Mix:

- ◆ 10x PCR-Puffer
- ◆ dNTP
- ◆ DNA Taq-Polymerase Amplitaq Gold

In einer 96-Well-Polycarbonat-Mikrotiterplatte wurden (auf Eis) je 3µl Pre-Amplification-Mix vorgelegt. Zu einer auf die Anzahl geplanter Reaktionen abgestimmten Menge Amplification-Core-Mix wurden die Primer hinzugegeben, mittels

Vortex gemischt. Der Mix wurde mit einer Multikanalpipette in die Vertiefungen einer PCR-Mikrotiterplatte aliquotiert.

Die PCR-Parameter der selektiven Amplifikation sind in Tab. 3-3 zusammengestellt. Sie entsprachen einem Touchdown – Protokoll. Zwischen den Schritten des Annealing und der Extension ist ein Ramping von 2,0 eingefügt worden, das die Ausbeute verbesserte. Nach der PCR wurden 15 µl des Reaktionsgemisches in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei 5 °C gelagert. Die restlichen 5µl des Reaktionsgemisches wurden zur Überprüfung der PCR und zur Vermeidung einer kapillarschädigenden Überladung im Abi Prism GA 310 zunächst auf einem 2,0 % igen Agarosegel analysiert.

**TABELLE 3-3: Touchdown PCR-Programm zur spezifischen Amplifikation der AFLP-Fragmente**

Hold	Annealing	Hold	Anzahl der Zyklen
94°C 2 min	65 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	64 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	63 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	62 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	61 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	60 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	59 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	58 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	57 °C 30 s	72 °C 2 min	1
94°C 1 s	56 °C 30 s	72 °C 2 min	23
60°C 30 min	-	-	1
4°C forever	-	-	-

### 3.3.8.6 Parentalscreening zur Auswahl informativer AFLP-Primerkombinationen

In einem Startup-Modul des *AFLP Plant Mapping Kit* stellt die Firma PE Applied Biosystems eine Auswahl an Primern (64 mögliche Kombinationen) in Testmengen zur Verfügung.

Zum Zweck der Auswahl wurden mit verschiedenen Primerkombinationen (darunter zusätzlich auch Eco-Primer mit nur zwei selektiven Nukleotiden) Reaktionen mit beiden Eltern und Stichproben der Nachkommenschaft durchgeführt und die AFLP-Profile auf Polymorphismen untersucht. Die für die untersuchten Genotypen informativsten Primer-Sets (s. Tab. 3-4) wurden für die Analyse der Gesamtpopulation herangezogen.

TABELLE 3-4

## Selektive AFLP-Primer im Parentalscreening

Primer-Kombination, Code	EcoRI – Primer	MseI – Primer	Fluorescence-Tag
*1 (E32M59)	E-AAC	M-CTA	NED
*2 (E35M62)	E-ACA	M-CTT	FAM
*3 (E37M62)	E-ACG	M-CTT	JOE
*4 (ACM51)	E-AC	M-CAT	FAM
*5 (ACM47)	E-AC	M-CAA	FAM
*6 (ACM48)	E-AC	M-CAC	FAM
*7 (ACM60)	E-AC	M-CTC	FAM
*8 (ACM59)	E-AC	M-CTA	FAM
*9 (ACM49)	E-AC	M-CAG	FAM
*10 (AGM62)	E-AG	M-CTT	JOE
*11 (AAM59)	E-AA	M-CTA	JOE
*12 (AAM47)	E-AA	M-CAA	NED
*13 (AAM48)	E-AA	M-CAC	JOE
*14 (ATM60)	E-AT	M-CTC	NED
*15 (ATM61)	E-AT	M-CTG	NED
*16 (ATM51)	E-AT	M-CAT	NED
*17 (ATM62)	E-AT	M-CTT	NED
*18 (ATM48)	E-AT	M-CTT	NED
*19 (AGM47)	E-AG	M-CAA	JOE
*20 (AGM48)	E-AG	M-CAC	JOE

**Erläuterungen:**

Erste Spalte: in der Kartierung verwendeter Acronymcode (\*1-20; vgl. Markernomenklatur S. 92) , gefolgt von der publikationsüblichen Eco/Mse - basierten AFLP-Konsensnomenklatur in Klammern.

Zweite Spalte: Eco-Primer mit selektiven Nukleotiden.

Dritte Spalte: Mse-Primer mit selektiven Nukleotiden.

Vierte Spalte: Fluoreszenzfarbstoff aus dem ABI Prism GA 310 - kompatiblen AFLP-Farbstoffset zur Analyse über Filter A.

### 3.3.9 Kartierte Marker, die nicht im Rahmen der Dissertation entwickelt wurden

Der methodische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der SSR- und AFLP-Markerentwicklung und ihrer Kartierung. In der Arbeitsgruppe zusätzlich entwickelte RAPD-Marker sowie sequenzcharakterisierte Marker aus Bereichen funktioneller Gene sollten die Aussagekraft der resultierenden Karte noch steigern. Sequenzcharakterisierte Marker wurden über Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (“CAPS”; KONIECZNY und AUSUBEL, 1993) auf der Basis von Expressed Sequences Tags (EST; MCCOMBIE et al., 1992) oder durch die Verwendung von SCAR-Primern erzeugt (vgl. Tab. 3-5).

TABELLE 3-5

#### Sequenzbasierte Markerentwicklung für die Kartierung von 'Regent' x 'Lemberger'

Bezeichnung	Marker-Acronym	Klassifizierung	Referenz
UDF-Glucose-Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase	UFGT	Genspezifischer SCAR	Böhm und Zyprian Sparvoli et al., 1994
Glutamatdehydrogenase	GD	Genspezifischer SCAR	Böhm und Zyprian, Syntichaki et al., 1996
Grape Ripening Related Protein	Gr	Genspezifischer SCAR	Salakhutdinov und Zyprian
Alkoholdehydrogenase I	ADH	Genspezifischer SCAR	Böhm und Zyprian, Sarni-Manchado et al., 1996
Major Allergen Pru a1	Aller	EST-CAPS	Salakhutdinov und Zyprian
Dehydration induced protein	RD22	EST-CAPS	Salakhutdinov und Zyprian
Plasma membrane intrinsic Protein 1	Plasm	EST-CAPS	Salakhutdinov und Zyprian
Differential Display-Fragment, nach <i>Plasmopara</i> -Elicitierung	VR2	CAPS	Kortekamp und Zyprian

### 3.3.10 Kapillargelelektrophorese mit dem ABI Prism GA 310

#### 3.3.10.1 Probenvorbereitung für die Fragmentanalyse

Formamid wird als Träger- bzw. Lösungsmittel für Fragmentanalyseproben vom Hersteller empfohlen, alternativ dazu kann man auf bidestilliertes Wasser zurückgreifen. Beide Trägerflüssigkeiten wurden im Rahmen der Methodenetablierung getestet.

#### ■ Formamid als Lösungsmittel

Der Vorteil der Verwendung von Formamid als Matrix ist: Der denaturierte Zustand der Proben wird stabilisiert. Das Formamid muss vor der Probenvorbereitung immer auf einen pH-Wert von 7.0 geprüft werden. Abweichungen kommen durch Disproportionierung des Formamids besonders bei Raumtemperatur schnell zustande und führen zu unbrauchbaren Ergebnissen: Die Peakintensität kann unter die

Detektionsschwelle fallen, weil Formationen kompetitiv zu den DNA-Fragmenten injiziert werden. Bei Abweichung vom neutralen pH muss das Formamid mit einem Ionenaustauscher (Resin) vorbehandelt werden.

#### ■ Wasser als Lösungsmittel

Ein Nachteil ist die theoretische Begünstigung unvollständiger Denaturierung oder Heterodimerbildung. Bei der elektrokinetischen Injektion kann es laut Herstellerangaben schnell zur Überladung der Kapillare kommen. Die Peaks wirken dann plateau-artig abgeflacht, sie erscheinen manchmal trotz der Überladung als extrem niedrig oder verzerrt. Bei wiederholter Überladung kann die Kapillare Schaden nehmen. Die Verwendung des denaturierend wirkenden POP-4 (PE Applied Biosystems) als Gelmatrix gleicht die genannten Nachteile jedoch weitgehend aus.

### 3.3.10.2 Denaturierende Fragmentanalyse auf dem ABI Prism GA 310

#### ■ Parameter der denaturierenden Fragmentanalyse

Die Auflösung liegt bei Fragmentgrößen von bis zu 250 bp und 25 Minuten Laufzeit nach Herstellerangabe bei einer Base Genauigkeit.

Für die Fragmentanalyse im Rahmen dieser Arbeit wurden Kapillaren von 50 µm Durchmesser und 47 cm Länge mit POP-4 als Gelmatrix verwendet. Als Puffer wurde 1x GA mit EDTA eingesetzt (alle Komponenten von PE Applied Biosystems).

Die Probenzusammensetzung wich mitunter leicht von den Empfehlungen des Herstellers ab. Mit einer kleinen Auswahl von Proben wurde ein Testlauf zur Klärung folgender Punkte durchgeführt:

- (a) Ermittlung des günstigsten Mischungsverhältnisses in der Probe
- (b) Ermittlung der günstigsten Laufparameter (hauptsächlich der Injektionszeit)
- (c) Bewertung der Qualität von Multiplex-Ansätzen (gemeinsames Laden von zwei bzw. drei unterschiedlich markierten PCR-Ansätzen)

#### ■ Laden der Proben

Die Beschickung der Kapillare mittels elektrokinetischer Injektion ist abhängig vom elektrischen Impuls, Nettoteilchenladung und Partikelgröße bzw. relativer Mobilität. Dies betrifft allerdings auch in der Probe enthaltene Salzionen, die bevorzugt injiziert werden (McCord et al., 1993). Eine CCD-Kamera detektiert die durch Laserlicht angeregten fluoreszierenden Reportergruppen an den passierenden Fragmenten. Bei gegebenen Einstellungen unterscheiden sich die Fluoreszenzfarbstoffe in ihrem

Emissionsspektrum sowie leicht in ihrer Emissionsintensität („gelb“ etwas schwächer als „blau“ und „grün“). Die Produkte der selektiven Amplifikation können meist ohne weitere Aufreinigung im ABI Prism GA 310 analysiert werden.

Statt Oligopräzipitation und Entsalzungsschritten in der Probenvorbereitung wurden optimale Injektionsparameter und Probenzusammensetzung für jedes Reaktionsset in Testläufen mit fünf zufällig ausgewählten Proben ermittelt. Die für die Kapillarelektrophorese optimierten Probengemische enthielten 12-14 µl H<sub>2</sub>O<sub>double dest.</sub>, 0,2- 0,4 µl ROX- oder TAMRA-Größenstandard und 0,7 bis 2 µl PCR-Produkt in einem Gesamtvolumen von ca. 15 µl. Die Injektionszeit wurde auf 4 bis 8 Sekunden mit 5 Sekunden als Ausgangswert gesetzt.

Im Fall einer Multiplex-Beladung verursacht die große Zahl von enthaltenen Fragmenten u.U. ein erniedrigtes relatives Fluoreszenzsignal der Einzel-Peaks im Vergleich zu den beobachteten Intensitäten bei separatem Laden der Komponenten. Es kann auch zu einer leichten Distorsion des Profils kommen. Eine gemeinsame automatische Analyse von Multiplexdaten mit Einzellaufdaten kann daher in Abhängigkeit von der absoluten Lademenge problematisch sein, ein Effekt, der im Fall von Multilocusanalysen wie der AFLP eher zum Tragen kommt als etwa bei SSR-Analysen und bei der Methodenetablierung berücksichtigt wurde.

### 3.3.10.3 Verwendung der *Genescan*<sup>TM</sup> Analyse-Software

#### ■ Rohdatenerfassung und -wiedergabe

Die *Collection Software* ist Eingabe- Steuerungs- und Datenerfassungs-Tool des ABI Prism GA310 - Pakets *Genescan*<sup>TM</sup>. Ein *Sample-File* wird automatisch durch die *Collection Software* angelegt und entspricht der Aufzeichnung eines einzelnen Probelaufs (*Run*). Es enthält Rohdaten und die Ergebnisse der nach Voreinstellungen durchgeführten automatischen Analyse.

*Sample-Files* eines Testsets, die mit den gleichen Parametern analysiert wurden (beispielsweise alle Dateien einer über die Population vorgenommene Markeranalyse mit einem bestimmten Primerpaar), wurden jeweils in einem *Project* (der Analyseeinheit der *Genescan*<sup>TM</sup> - Software) zusammengestellt.

#### ■ Sichten und Fehlerbeseitigung in zusammengehörenden Datensets

Alle Proben einer logischen Analyseeinheit (beispielsweise die mit einem bestimmten Primerpaar erzeugten PCR-Produkte einer kompletten Population) können simultan oder einzeln in einem gemeinsamen Datensatz, dem *Project*, mit flexiblen Parametern

analysiert und editiert werden. Detektionsschwellenwerte werden individuell angepasst. In Einzelproben durch Verunreinigungen oder Distorsionsartefakte verursachte Fehlzusordnungen von Fragmentgrößen können schnell erkannt und nacheditiert werden.

#### ■ Abgleich des Größenstandards und Fertigstellung des Analyse

Die automatisierte Auswertung großer Mengen von Genotypen erfordert die verlässliche Zuordnung von Fragmentgrößen. Deshalb ist die Überprüfung (evtl. auch Editierung) des internen Größenstandards essentiell. Dazu wurden nach der Erfassung der Elektrophorese-Rohdaten die Spektralanteile des Standards (TAMRA- oder ROX) möglichst vieler Proben in der Chromatogrammansicht von *Genescan*<sup>TM</sup> übereinander projiziert (*Stacking*). Peak-Artefakte, denen durch die Software versehentlich Bedeutung beigemessen wurde, ließen sich auf diese Art leicht als „Ausreißer“ zurückverfolgen und konnten zur automatischen Erstellung der Eichgerade des Standards maskiert werden. Manuelle Nachbesserung ist meist nur in Einzelfällen nötig. Abweichende Größenzuordnung lässt sich oft schon durch die Erhöhung der Detektionsschwelle für TAMRA/ROX beheben, denn Fehlpeaks weisen in der Regel niedrigere Intensitäten als reguläre Peaks auf. Nach der Korrektur wurden die zusammengehörigen Rohdatensätze erneut mit *Genescan*<sup>TM</sup> analysiert. Ein fertiggestelltes *Project* bildet die importierbare Datenbasis für die auf *Genescan*<sup>TM</sup> aufbauende Programmkomponente *Genotyper*<sup>TM</sup>.

#### 3.3.10.4 Editieren von Daten in *Genotyper*<sup>TM</sup>

*Genotyper*<sup>TM</sup> baut auf *Genescan*<sup>TM</sup> als Datenquelle auf. Die Anwendung liefert tabellarische Fragmentinformation, die in Microsoft Excel importiert und als rechteckige binäre Datenmatrix weiter bearbeitet werden kann. Ausgangspunkt ist in der Regel ein analysiertes *Project*. *Genotyper*<sup>TM</sup> bietet verschiedene Möglichkeiten der Peaknormierung und -normalisierung wie z.B. die Ausrichtung an monomorphen Peaks oder die Normierung nach dem höchsten oder dem ersten Peak eines Laufs. Durch PCR-Variabilität oder die Gegenwart von injizierfähigen Störsubstanzen bedingte quantitative Unterschiede können so ausgeglichen werden.

#### 3.3.11 Denaturierende Polyacrylamid (PAA-) Gele

Die Fragmentanalyse über Polyacrylamidgele stellt eine Alternative zur Kapillargelelektrophorese dar. Die Polyacrylamidgelmatrix bildet ein feinmaschiges längs- und quervernetztes Molekularsieb, das es ermöglicht, Fragmente bis auf die Ebene



einzelner Basenpaare zu separieren. Aufgrund dieser Eigenschaft finden diese Gele beispielsweise auch zur Darstellung von Sanger-Sequenzreaktionen Anwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden silbergefärbte PAA-Gele zur Fragmentanalyse (SSR-Parentalscreening) und -isolierung (AFLP) eingesetzt. 6%ige Gele sind für den Fragmentbereich 500 – 200 bp geeignet, während 8%ige PAA-Gele für die Analyse kleinerer Fragmente vorteilhaft sind.

### 3.3.11.1 Vorbereitung der Glasplatten für die PAA-Gelelektrophorese

PAA-Gele werden zwischen zwei oberflächenbehandelte Glasplatten gegossen. Die Glasplatten werden gründlich mit 1% SDS und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gereinigt und mit einem Zellstofftuch trockengewischt. Die Gelträgerplatte wird - räumlich getrennt von der später vom fertigen Gel abzulösenden „Ohrenplatte“ - mit Bindsilan behandelt. Dazu werden 3  $\mu\text{l}$  Bindsilan, 15  $\mu\text{l}$  10%ige Essigsäure und 1 ml  $\text{Ethanol}_{\text{abs.}}$  gemischt, mit Zellstofftüchern auf der Platte verteilt und 5 Minuten antrocknen gelassen. Danach wischt man dreimal mit 70%igem Ethanol und abschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  über die Oberfläche. Überschüssiges Silan wird dabei vorsichtig wegpoliert. Auf die „Ohrenplatte“ wird 1 ml Repel-Silan verteilt, 10 Minuten antrocknen gelassen und der Überschuss mit Ethanol und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wegpoliert. Die durch 0,2-mm-Spacer getrennten Glasplatten werden aufeinander gelegt, mit Kreppband abgedichtet und mit Klammern fixiert (Empfehlungen: Promega).

### 3.3.11.2 Herstellen des Polyacrylamidgels

Die Gellösung (für die verwendeten Platten: 70 ml) wird nach folgendem Protokoll (Promega, Madison, Wisc. USA) hergestellt und bis zur Polymerisation auf Eis gehalten:

- ◆ 29 g Harnstoff ultrapur (entsprechend 7 M Endkonzentration, d.h. gesättigt)
- ◆ 14 ml 5x TBE-Puffer
- ◆ 10,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 30%ig, p.A.)
- ◆  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  ad 70 ml

Sobald alle Komponenten gelöst sind, wird mit einer Wasserstrahlpumpe ein Vakuum erzeugt, das die Lösung durch einen Glastrichter mit Faltenfilter in eine Nutschflasche treibt. Unter Beibehaltung des Vakuums wird die Lösung einige Minuten lang unter leichtem Schwenken evakuiert, bis keine Gasblasen mehr aufsteigen. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von 280  $\mu\text{l}$  APS, einem Radikalstarter (als Stammlösung mit 1 g pro 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ) und 56  $\mu\text{l}$  TEMED als Katalysator initiiert; die Kettenreaktion wird

durch Luftabschluss begünstigt. Demnach wird das Gel zügig mit einer Plastikspritze zwischen die vorbereiteten Glasplatten gefüllt. Ein Haifischzahnkamm wird anschließend mit der glatten Seite ca. 5 mm tief in die Gelmasse gesteckt. Die vollständige Polymerisation erfordert etwa 30–60 Minuten. Das Klebeband wird entfernt, bevor man das Gel in die Vertikalelektrophoresekammer montiert.

### 3.3.11.3 Vertikale PAA-Gelelektrophorese und Färbung

Der obere Puffertank wird mit 1 x TBE, die untere Kammer mit einem Teil 3 M Natriumacetat und zwei Teilen 1 x TBE befüllt. So kann sich während des Elektrophoreselaufs ein Puffergradient aufbauen, der Trennleistung und Bandenschärfe verbessert. Der Kamm wird entfernt und die von Puffer bedeckte Gelfront mit einer Spritze von Harnstoff freigespült. Einige  $\mu\text{l}$  Farbmarker-Ladepuffer FBX werden gleichmäßig in den Spalt zwischen den Glasplatten pipettiert und zeigen in einem Vorlauf von ca. 10 min (1,5 kV/ 60W) durch eine ebenmäßig wandernde Farbfront, ob die Polymerisation gleichmäßig verlaufen ist.

- FBX ◆ 9,5 ml Formamid
- ◆ 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- ◆ 100  $\mu\text{l}$  1 N NaOH
- ◆ 50 mg Bromphenolblau
- ◆ 50 mg Xylencyanol                      als 1-ml-Aliquots bei 4°C lagern

Während des Vorlaufs werden die Proben sowie der Größenmarker vorbereitet: Der Anteil des formamidhaltigen Ladepuffers soll im doppelten Verhältnis zum Anteil der wässrigen PCR-Probe stehen, um ein gutes Absinken der Probe in die Geltasche zu ermöglichen. Das Fassungsvermögen einer Tasche beträgt maximal 4,5  $\mu\text{l}$  (Kamm mit 68 großen Taschen) bzw. 2,5  $\mu\text{l}$  (Kamm mit 100 kleinen Taschen; Zubehör von Promega). Nach dem Vorlauf wird die Tasche erneut mit Puffer gespült und der leicht mit Vaseline eingefettete Kamm so eingesetzt, dass die Zähne die Geloberfläche tangieren. Die Proben werden im Thermocycler 3 Minuten bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgeschreckt, zwischen die Zähne des Haifischzahnkammes pipettiert und bei 2,5 kV (konstant) und 60 Watt für 2–3½ Stunden der Elektrophorese unterzogen. Danach trennt man die Glasplatten z.B. mittels einer Rasierklinge und gibt die Trägerplatte mit dem darauf haftenden Gel in die vorbereitete Fixierlösung.

- Fixierlösung:
- ◆ 1800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
  - ◆ 200 ml Eisessig

Dort kann es entweder über Nacht verbleiben oder ca. 20 Minuten (bis zum Herauslösen des Farbmarkers) auf einem Schüttler geschwenkt werden. Die Fixierlösung wird abdekantiert und aufgehoben. Durch drei dreiminütige Schüttelbäder mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> werden Harnstoff und Essigsäure ausgewaschen. Das Gel wird 30 min in der Silberfärbelösung geschwenkt und zum Entfernen des Silberüberschusses kurz in Wasser getaucht. Die im Gel immobilisierte DNA retiniert das Silber und kann daher sichtbar gemacht werden.

- Silberlösung
- ◆ 2 g Silbernitrat AgNO<sub>3</sub>
  - ◆ 3 l Formaldehyd (37 %ig)
  - ◆ in 2 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen

Im vorgekühlten Entwickler-Schüttelbad erwartet man das Erscheinen der Banden, um dann die Reaktion bei Erreichen des Optimums durch Zugabe der aufbewahrten Fixierlösung zu stoppen.

- Entwicklerlösung
- ◆ 60 g Natriumcarbonat Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 2 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, vorkühlen.
  - ◆ 400 µl Natriumthiosulfat Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (10 mg/ml)
  - ◆ 3 ml Formaldehyd

Natriumthiosulfat und Formaldehyd sind unmittelbar vor Gebrauch in die gekühlte Natriumcarbonatlösung zu geben. Natriumthiosulfat dient bei diesem photographischen Entwicklungsprozess dazu, nach dem Entwickeln restliche Silberionen aus der Lösung zu entfernen, da Ag<sup>+</sup>-Ionen sich mit Thiosulfationen zu einem Komplex mit sehr hohen Komplexbildungskonstanten verbinden. Das Gel verbleibt einige Minuten in Wasser, wird dann mit Klarsichtfolie abgedeckt oder trocknen gelassen und fotokopiert bzw. mit einer Kamera dokumentiert. Nach der Verwendung können Gelreste von den Glasplatten mit 1 N Natronlauge entfernt werden.

### 3.3.12 Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus einer Gelmatrix

#### ■ Elution von DNA-Banden aus silbergefärbten PAA-Gelen

Anwendungszweck war, DNA-Fragmente für die Direkt-Sequenzierung verfügbar zu machen. Eine Auswahl der gleichen PCR-Proben, die zuvor bereits zur Erfassung des

Fingerprints über Kapillargelelektrophorese erfasst und bei 5°C eingelagert worden waren, wurden zur Bandenelution benutzt. Auf diese Weise ist man über das Fragmentprofil jeder Probe informiert, so dass man die für den Gellauf individuell günstigste Menge abschätzen kann. Man kann auch gezielt Proben solcher Individuen für die Elution wählen, bei deren Analyse die PCR-Reaktion ein besonders starkes, klares Fingerprintmuster ergeben hat. Das Profilmuster in der direkten Umgebung der interessierenden Bande sollte bei einer geplanten Bandenisolation möglichst übersichtlich und die Bande klar zu identifizieren sein.

Die interessierenden Banden werden aus dem vom Färbeprozess noch feuchten Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, vorsichtig von der Glasplatte abgehoben, in vorbereitete Gefäße mit 20 µl TE (vgl. S. 46) überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 230 µl Elutionspuffer werden die Proben 30 Minuten im Wasserbad gekocht. Sind sie auf Raumtemperatur abgekühlt, isoliert man mit einer sterilen Pipettenspitze die Gelstücke aus der Lösung.

Elutionspuffer	◆ 0,5 M NH <sub>4</sub> Ac	
	◆ 10 mM MgAc <sub>2</sub>	
	◆ 1 mM EDTA; pH 8,0	
	◆ 0,1% SDS	Es schließt sich eine Ethanol-fällung an.

### ■ Elution von DNA aus Agarosegelen

Diese Methode wurde zur Präparation der Ausgangsfragmente für das PCR-Walking (vgl. S. 70f) benötigt. DNA-Zielfragmente wurden nach der Elektrophorese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in 250 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Proben wurden 15 min im Wasserbad gekocht. Es schloss sich eine Ethanol-fällung an.

#### 3.3.13 Standard-Ethanol-fällung

Die Ethanol-fällung ist eine Methode, um DNA aus einer wässrigen Lösung zu gewinnen. Das Grundprinzip ist die Verminderung ihrer Löslichkeit durch Ansäuern, lokalen Wasserentzug und plötzliche Kälte in Gegenwart eines chaotropen Salzes.

- ◆ Zutropfen von 1/10 Vol. eiskaltem 3 M Natriumacetat; pH 5,2
- ◆ langsame Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol<sub>absolut</sub>
- ◆ durch Umwenden des Gefäßes verteilen
- ◆ 30 min in Eis stellen

Anschließend wird die ausgefallene DNA durch Zentrifugieren bei maximaler Umdrehungszahl 20 Minuten pelletiert. Nach Abdekantieren des Überstands wird das Pellet getrocknet und schließlich in 20 µl 1x TE (vgl. S. 46) gelöst. Zum Überprüfen der Bandenisolation und zum Anreichern des Zielfragments schließt sich eine spezifische PCR mit den Parametern der Ursprungsreaktion an, die die Bande reproduziert und verstärkt.

### 3.3.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten nach dem Prinzip des Cycle-Sequencing wurde über eine Kettenabbruchreaktion (SANGER, 1977) mittels fluoreszenzmarkierter „Dye-Terminator“-Nukleotide im PCR-Mix nach Angaben des Herstellers durchgeführt („ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit“, PE Applied Biosystems). Auf diese Weise aufbereitete AFLP- und Walking-Fragmente wurden dann über das automatische Kapillarelektrophoresesystem ABI Prism GA 3100 analysiert.

DNA-Fragmente wurden im Rahmen dieser Dissertation nach einem Vorschlag von BALZERGUE et al. (2001) direkt, d.h. ohne vorheriges Klonieren in einen Trägervektor, der Reaktion unterzogen. Als Sequenzierprimer für isolierte AFLP-Fragmente diente der unmarkierte *MseI*-Primer der ursprünglichen PCR-Reaktion, die den Marker erzeugt hat. PCR-Walking-Produkte wurden über die AP-Primer bzw. die genspezifischen Primer sequenziert (vgl. Schema S. 70).

Um Templates in ausreichender Menge für die Sequenzreaktion herzustellen, wurden über Adsorptionssäulchen (QIAquick PCR Purification Kit Spin columns, Qiagen, Hilden) gereinigte PCR-Produkte aus einer Reamplifikation isolierter Fragmente eingesetzt. Pro Sequenzierungsansatz wurden ca. 250 ng doppelsträngige DNA, 10 pmol Primer sowie 2 µl Reaktionsmix vereinigt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> zu 10 µl ergänzt.

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Ansätze auf ein Volumen von 100 µl gebracht und nach Standardprotokoll mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 25 µl TSR-Puffer aufgenommen, 2 min bei 90°C denaturiert und über den ABI Prism GA 3100 nach Empfehlungen von PE Applied Biosystems analysiert und ausgewertet.

Die bereinigten Sequenzen wurden über öffentliche Datenbanken durch Homologieanalyse abgeglichen.

### **3.3.15 Southern Blot - Hybridisierung**

Der genomische Southern Blot sowie die Variante des Dot Blot kamen bei der Untersuchung einer QTL-korrelierten AFLP-Markersequenz zur Anwendung.

#### **3.3.15.1 Grundprinzip des Southern Blot**

Der Southern Blot, eine von SOUTHERN (1975) entwickelte DNA-Transfer- und Fixierungstechnik, ermöglicht den Nachweis einer bestimmten bekannten oder als Isolat vorhandenen DNA-Sequenz in einer immobilisierten DNA-Probe. Eine markierte DNA-Sonde lagert sich dabei an ihre komplementäre Zielsequenz in der zu testenden Probe (Hybridisierung). Das Signal wird nach stringenten Waschschrritten durch Schwärzung eines Films detektiert. Heute nutzt man dabei häufig eine antikörpergebundene Lichtreaktion an Stelle des radioaktiven Nachweises.

Genomische bzw. komplexe DNA wird i.d.R. zunächst mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten (dies erlaubt verfeinerte Aussagen über Häufigkeit der Zielsequenz im Genom oder Ursprungsort des Signals). Nach der Auftrennung über ein Agarosegel erreicht man die Immobilisierung der DNA durch ihren Transfer aus dem Gel auf eine DNA-affine Membran (Nitrocellulose oder Nylon, Boehringer/Roche, Mannheim). Auf diese Weise „geblottete“ DNA kann mehrfach mittels Sondenhybridisierung untersucht werden.

#### **3.3.15.2 Dot Blot**

Eine vereinfachte Variante ist der „Dot Blot“, bei dem man auf die Restriktion verzichtet. Im Vordergrund steht hier die rasche Aussage über das grundsätzliche Vorhandensein einer Zielsequenz im Genom. Gleiche Volumina normalisierter DNA-Testlösungen werden als Tropfen direkt auf die Membran pipettiert. Nach dem Trocknen ergeben sich „Dots“, also Flecken (z.B. mit ein bis wenigen  $\mu\text{g}$  DNA). Man verfährt zur Detektion wie mit einer geblotteten Membran.

#### **3.3.15.3 Herstellen eine Digoxigenin-markierten Sonde für die Hybridisierung**

Das DIG-System ist eine sensitive Alternativmethode zur radioaktiven Markierung von Sonden-DNA. Der eingesetzte DIG-DNA-Labeling Kit (Boehringer/Roche, Mannheim) enthält in einem Hexa-Nukleotidmix als modifiziertes Nukleotid Digoxigenin-11-dUTP, das über PCR ins Zielfragment integriert wird.

Ein PCR-Ansatz für die DIG-Markierung beinhaltet folgende Komponenten:

◆ Matrizen-Fragment	50 ng
◆ Primer	je 10 pM
◆ DIG-Hexanukleotidmix	200 µM
◆ Tris-HCl	10 mM
◆ MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,5 mM
◆ KCl	50 mM
◆ Taq-Polymerase (Boehringer)	1 U

ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Das PCR-Programm zur DIG-Markierung entspricht einer regulären PCR-Reaktion. Die Konzentration der markierten Sonde wird nach der DIG-PCR über ein 1,5%iges Agarosegel im Vergleich zu einem Mengenstandard abgeschätzt. Die fertige Sonde kann bei -20°C gelagert werden.

#### 3.3.15.4 Blotvorbereitungen

##### ■ Restriktion und Gelelektrophorese genomischer DNA

Ca. 10 µg genomische DNA werden mit 50 – 80 U eines nach Fragestellung ausgewählten Restriktionsenzym in passendem Puffer in einem Endvolumen von 200 µl bei 37°C über Nacht geschnitten. Die Probe wird über ein 1% iges Agarosegel elektrophoretisch bei ca. 4 V/cm drei Stunden lang aufgetrennt.

##### ■ Gelvorbereitung

Das Gel wird für den DNA-Transfer folgendermaßen vorbehandelt:

- ◆ 20 min in Depurinierungslösung schwenken

Depurinierungslösung: 0,25 N HCl

- ◆ kurz spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

- ◆ 30 min in Denaturierungslösung schwenken

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH

- ◆ kurz spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

- ◆ zweimal 15 min in Neutralisierungslösung schwenken

Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; 0,001 M EDTA; pH 7,2

#### 3.3.15.5 Durchführung des Southern Blot

Die zu analysierende DNA-Probe wird zu diesem Zweck von einem Agarosegel über Nacht auf eine geladene Nylon- oder Nitrocellulosemembran passender Größe überführt

(„geblottet“). Eine simple Möglichkeit dazu beruht auf einfacher Saugwirkung, hervorgerufen durch die Passage eines Hochsalzpuffers durch Gel, Membran und darauf aufgeschichtete Stapel von passend zugeschnittenem Whatman 3MM Filterpapier und Zellstofftüchern.

◆ Transfer-Hochsalzpuffer:

20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Tri-Natriumcitrat x 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,0)

◆ Membran: im beschriebenen Versuch aus Nylon (Boehringer/Roche, Mannheim)

Nach dem Blot wird die Membran in 2xSSC gewaschen. Durch zweistündiges Backen bei 80°C wird die DNA kovalent an die Membran gebunden („Crosslinking“).

### 3.3.15.6 Sondenhybridisierung

Die Sondenhybridisierung wird mit DIG Easy Hyb-Lösung (Boehringer/Roche, Mannheim) nach Empfehlungen des beiliegenden Protokolls durchgeführt. Unter stringenten Bedingungen lagert sich die einzelsträngige Sonde spezifisch an eine oder mehrere potentielle komplementäre Zielstellen der membrangebundenen DNA an.

Die im Folgenden aufgeführten Wasch- und Reaktionsschritte werden in einem Hybridisierungssofen (Techne HB-1, ThermoFisher, Wertheim) mit rotierenden Glasröhren durchgeführt.

- ◆ Prähybridisierung: bei ermittelter Hybridisierungstemperatur in DIG Easy-Hyb (20 ml/100cm<sup>2</sup>) für 3 Stunden
- ◆ Vorbereiten der DIG-Sonde: 10 min aufkochen, auf Eis abschrecken, mit 3,5 ml DIG-Easy Hyb /100 cm<sup>2</sup> Membranfläche mischen. Nach Abgießen der Prähybridisierungslösung Sonde direkt zugeben.
- ◆ Hybridisierung über Nacht bei 39°C
- ◆ Zur Sondenüberschussentfernung zweimal 15 min bei Raumtemperatur mit jeweils 100 ml 2xSSC/0,1% SDS waschen, anschließend folgt die „stringente“ Waschung bei 68°C mit 0,5xSSC/0,1% SDS für zweimal 15 min.

### 3.3.15.7 Detektion

In einer peroxidasekatalysierten Redoxreaktion wird bei Zugabe der Reagenzkomponente „CDP-Star“ (Boehringer/Roche, Mannheim) Energie in Form von Lichtblitzen freigesetzt, die auf Röntgenfilm dokumentiert werden. Schwärzung bezeichnet die Lage des Zielfragments auf der Membran. Der Detektion gehen Waschen und Blocking voraus:



- ◆ Waschpuffer            0,1 M Maleinsäure  
pH 7,5                    0,15 M NaCl  
                              ohne bzw. mit 0,3 % Tween 20
- ◆ Blockingpuffer        Waschpuffer mit 1% Blocking-Reagenz
- ◆ Detektionspuffer    0,1 M Tris-HCl  
pH 9,5                    0,1 M NaCl
- ◆ 2x 15 min in Waschpuffer ohne Tween 20 schwenken.
- ◆ 45 min in Blocking-Puffer inkubieren (Absättigen der Membran mit unspezifischem proteinhaltigem Medium, hier Blocking Reagenz (Boehringer)).
- ◆ Nach Zugabe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern in Konjugation an alkalische Phosphatase binden diese im Verlauf der folgenden halben Stunde an ihr Digoxigenin-Gegenstück der hybridisierten Sonde.
- ◆ 2 x 15 min in Waschpuffer mit Tween 20 schwenken.
- ◆ 5 min in 20 ml/100 cm<sup>2</sup> Detektionspuffer äquilibrieren.
- ◆ Membran in Folie einschweißen, 2,5 ml CDP Star-Verdünnung zugeben, 5 min inkubieren.
- ◆ Membran abtropfen lassen und neu einschweißen.
- ◆ Detektion der Lichtreaktionsereignisse auf Röntgenfilm (Lumifilm Chemiluminescent Detection Film) in lichtdichten Kassetten (MS Laborgeräte, Heidelberg).

Die Expositionsdauer lag je nach Signalstärke zwischen 30 min und 15 Stunden. Der Röntgenfilm wurde bis zum Erscheinen geschwärzter Signale in Entwicklerlösung geschwenkt (ca. 10 min), dann nach kurzem Wasserbad in Fixierlösung gegeben und nach erneutem Wasserbad getrocknet und ausgewertet (Entwickler und Fixierlösung: Kodak; über Sigma, Steinheim).

### 3.3.16 PCR-Walking

#### 3.3.16.1 Grundprinzip

Mittels PCR-Walking kann man Fragmente über die Grenzen ihrer bekannten Sequenz hinaus erweitern. Zufallsfragmente aus einer genomischen Bibliothek werden durch geeignete Primer an einer ihrer beiden Flanken in dem Fragment, dem das Interesse gilt, „verankert“; die zweite „Border“ führt über eine anligierte Adaptorsequenz zu einer Erweiterung des bekannten Bereichs. Ob die Adaptorsequenz „upstream“ oder „downstream“ liegt, unterliegt Gesichtspunkten der Statistik. Die Größe des neu

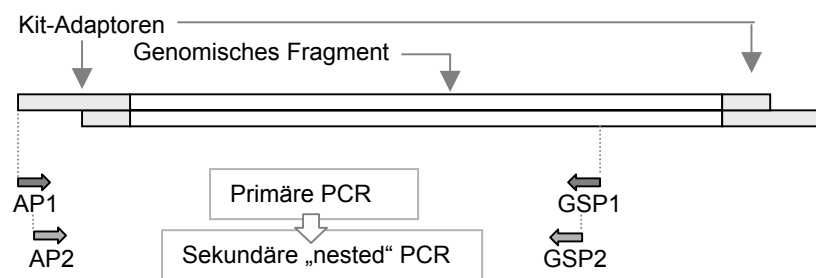
hinzugewonnenen Abschnitts mit Sequenzinformation ist dabei von der Entfernung der Adaptorbindung zum Ausgangsfragmentabschnitt abhängig. Die Auswahl geeigneter fragmentverankerter Primer erlaubt es, in beiden Richtungen aus dem Fragment „heraus zu lesen“. Durch sukzessive Anwendung des Walking-Prinzips (jeweils basierend auf den Endprodukten des vorangegangenen Walking-Schritts) können zusammen mit Contiganalysen beträchtliche Strecken der Fragmentumgebung erschlossen werden.

### 3.3.16.2 PCR-Walking mit dem GenomeWalker™ Kit

Ein GenomeWalker™ Kit der Firma Clontech (Palo Alto, Kalifornien) kam im Rahmen dieser Arbeit für die beidseitige Erweiterung bekannter Fragmentsequenzen zum Einsatz. Der Kit ist geeignet für die Arbeit mit nicht klonierten genomischen Sequenzen<sup>8</sup>. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden gemäß GenomeWalker™ Kit Protocol PT1116-2 durchgeführt. Aus genomischer DNA wurden Fragmentbibliotheken durch Restriktion mit *EcoRV* bzw. *DraI* hergestellt. Die Methode des Walking verläuft basierend darauf in drei Hauptschritten:

- 1) Ligation asymmetrischer Adaptoren an Fragmente der genomischen Bibliotheken
- 2) Primäre PCR
- 3) Sekundäre oder „nested“ PCR

In nachfolgendem Schema (s. Abb. 3.2) ist die Vorgehensweise beim PCR-Walking gemäß der Anleitung der Fa. Clontech (GenomeWalker™ Kit User Manual PT1116-1, 1999) im Überblick dargestellt. Die Benennung der beteiligten Komponenten wurde nach den Angaben des Herstellers übernommen.



**Abbildung 3.2 Schema des PCR-Walking.**

Der Adaptorprimer AP1 passt auf den Adaptor; AP2 (der „innere“ Adaptorprimer) überlappt mit AP1 und reicht weiter in die Sequenz hinein. GSP1 ist „äußerer“ genspezifischer Primer, GSP2 ist überlappender, „innerer“ genspezifischer Primer. In Graustufen abgehoben: an das Fragment ligierte Kit-Adaptoren und Walking-Primer (als Pfeile schematisiert).

<sup>8</sup> Siebert, P.D.; Chen, S. and Kellogg, D.E. (1995): The Human GenomeWalker DNA Walking Kit: A new method for walking in uncloned genomic DNA. *Clontechiques X(II)*: 1-3

Dabei ist einer der Primer (AP1 bzw. AP2) dem Adaptor angepasst, der zweite Primer (GSP1 bzw. GSP2; GSP steht für gen-spezifischer Primer) passt auf ein Stück des Zielfragments, dessen Sequenz erweitert werden soll. Sowohl die Asymmetrie der Adaptoren mit ihrem intern durch eine Amino-Schutzgruppe geblockten 3'-Ende als auch die zusätzliche Suppression-PCR-Strategie (mit Ausbildung einer „panhandle“-oder „Bratpfannenstruktur“ zwischen dem Adaptor und seinem komplementären 3'-Amplifikationsartefakt) verhindern eine DNA-Amplifikation, die auf Fragmente mit beidseitig ligierten Adaptoren und zwei AP1-Primer zurückgehen könnte.

Zwei aufeinanderfolgende Schritte mit ineinander geschachtelten Primersequenzen („nested PCR“-Methodik) erhöhen die Spezifität der Reaktionsfolge und damit der Endprodukte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Walking-Fragmente in beiden Richtungen verlängert (im obigen Schema der Abb. 3.2 nicht dargestellt), dementsprechend wurde an der zweiten Fragmentborder ein weiteres nested-Primer-Paar eingesetzt (GSP3 und GSP4).

Primäre PCR:

94°C	2 s	} 7 Zyklen
72°C	3 min	
94°C	2 s	} 32 Zyklen
67°C	3 min	
67°C	4 min	

Sekundäre PCR:

94°C	2 s	} 5 Zyklen
72°C	3 min	
94°C	2 s	} 20 Zyklen
67°C	3 min	
67°C	4 min	

(Programme gemäß Fa. Clontech, GenomeWalker™ Kit User Manual PT1116-1, 1999, S. 27; optimiert für Thermocycler #9600, PE Applied Biosystems)

### 3.3.16.3 Analyse der Walking-Ausgangsfragmente

Nach einer Auftrennung über ein Agarosegel werden geeignete Banden als Gelblöckchen ausgeschnitten und die DNA zurückgewonnen (vgl. S. 63). Anschließend kommt ein auf Effizienz optimiertes Protokoll von BALZERGUE et al. (2001) zum Einsatz, das prinzipiell an die Arbeitsschritte des GenomeWalker™-Kit anknüpft, statt des aufwendigeren Wegs über die Subklonierung in *E. coli* im Vorfeld der Sequenzierung jedoch mit den isolierten Walkingfragmenten als Templates den bekannten Sequenzbereich beidseitig durch eine direkte Cycle-Sequencing-Reaktion erweitert. Der innere Adaptorprimer (AP2) und die fragmentspezifischen inneren Primer (GSP2 und GSP4) kommen dabei als Sequenzprimer zum Einsatz. Durch Kombination mehrerer solcher „upstream“ und „downstream“ erweiterten Fragmentstrecken mit überlappenden Bereichen ergibt sich – vergleichbar einer Contiganalyse – ein erweitertes Bild des untersuchten Genomabschnitts.

### 3.4 Vorgehensweise bei Markererfassung und Kartierung

#### 3.4.1 Tabellarische Markererfassung und Erstellen einer Verrechnungsmatrix

Die Verrechnungsmatrix stellt die Datensätze für die Kartierungssoftware-Pakete MAPMAKER/EXP3.0 und JoinMap®3.0 (in unterschiedlicher Codierung, s. u. ) zur Verfügung.

Es handelt sich um binäre rechteckige Tabellen, (üblicherweise in MS Excel), die zur Genotypisierung nach folgendem Schema (s. Abb. 3.3) aufgebaut sind:

	Markercode	Individuen der Kreuzungspopulation						Reg	Lem
	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	
RAPD-Daten									
AFLP-Daten									
SSR-Daten									
CAPS/EST-Daten									
	⋮								
Bonitur-Daten, Merkmalscode									

**Abbildung 3.3** Schema einer Markermatrix-Tabelle, die als Datenbasis für Kartierungssoftware dient.

Die Tabelle wird in Microsoft Excel erstellt und in JoinMap®3.0 importiert bzw. für die MAPMAKER/EXP3.0-Analyse über einen Editor in MS-DOS überführt. Individuen der Kreuzungspopulation sind über Standortnummern designiert. Reg und Lem bezeichnet die Kreuzungseltern, deren Genotypen bezüglich der Markerloci ebenfalls in der Matrix erfasst werden. Feldeinträge sind in programmabhängigen Codes vorgenommen, die im folgenden Abschnitt erläutert sind. Boniturdaten sind direkt als diskrete Zahlenwerte nach OIV-Kriterien (vgl. Tab. 3-1) eingetragen.

Die Individuen der Kreuzungspopulation bilden mit ihrer Kennung (beispielsweise der Zucht- oder Standortnummer) horizontal in fester Reihenfolge angeordnet den Tabellenkopf. In der darunter liegenden Spalte befindet sich die gesammelte Markerinformation, wobei jede Zeile einem bestimmten Marker vorbehalten ist. Die letzten beiden Spalten entfallen auf die Parentaltypen.

### 3.4.2 Mendelgenetik und Verteilungsfälle

Die nachfolgenden Beispiele illustrieren die typischen Mendel'schen Verteilungsfälle und machen gleichzeitig die der Markerkartierung inhärente Logik transparent.

#### ■ Beispiel 1

Die Markerbande liegt doppelt-heterozygot in beiden Kreuzungseltern vor:

Elter1 x Elter2     **a/b x a/b**

Für die Nachkommenschaft ergeben sich die möglichen Genotypen

**a/a : a/b : b/a : b/b** im Zahlenverhältnis **1:1:1:1**,

wobei a/a, a/b und b/a im Fall der Codominanz *unterscheidbar*, im Fall der Dominanz jedoch *nicht unterscheidbar* sind, so dass für die Verteilung „Bande vorhanden : Bande fehlt“ dann das Zahlenverhältnis **3:1** zutrifft.

#### ■ Beispiel 2

Das Markerfragment rührt von einem Elter her<sup>9</sup> und liegt dort in einer einzigen Kopie vor<sup>10</sup>.

Elter1 x Elter2     **n/b x n/n**

Für die Nachkommenschaft ergeben sich die möglichen Genotypen

**n/n : b/n** („Bande vorhanden : Bande fehlt“) im Verhältnis **1:1**

#### ■ Beispiel 3

Das Markerfragment rührt von beiden Eltern her, und zwar homozygot bei Elter 1 und heterozygot bei Elter2.

Elter1 x Elter2     **a/b x a/a**

**a/a : b/a** („Bande b vorhanden : Bande b fehlt“) im Verhältnis **1:1**

Dieser letzte Fall kann formal als Variante des vorher geschilderten Beispiel 2 betrachtet werden.

Bei der AFLP, einer „anonymen“ Multilocusanalyse, ist eine allelische Assoziation zwischen verschiedenen Fragmenten *a priori* nicht möglich. Die Analyse über ein ABI Prism GA 310-Kapillarelektrophoresegerät mit Fluoreszenzdetektion erlaubt in vielen Fällen sogar eine bedingt quantitative Aussage: Das Vorkommen eines bestimmten

<sup>9</sup> Von einem Parentalscreening rückschließend.

<sup>10</sup> Dies ist der Fall, wenn Segregation auftritt.

Fragments b in der Nachkommenschaft kann nach einfacher oder doppelter Intensität klassifiziert werden. So kommt man zu einer „quasi-codominanten“ Betrachtung; quasi-codominant deshalb, weil das zu b homologe Allel als Fragment unbekannt bleibt und gemäß der Logik lediglich durch das „Nicht-Vorhandensein einer zweiten Kopie von b“, repräsentiert wird (im oben geschilderten Beispiel 2 dann „n“ entsprechend). Zur Beschreibung dieses Falls hat man das Konzept des sogenannten „Dummy-Locus“ aufgegriffen (wie z.B. bei der die MAPMAKER/EXP3.0-Erfassung), wodurch ein „virtuelles“ Allel an einem Locus analog zu einem vorhandenen Allel als simples Merkmal kartiert werden kann. Sollte sich nach der Markerkartierung zeigen, dass ein solcher Dummy-Locus mit einem realen Fragment cosegregiert, kann es dem „echten“ Allel entsprechen.

### 3.4.3 Verrechnung der Markerinformation durch JoinMap®3.0 und MAPMAKER/EXP3.0

Die Kartierungsprogramme JoinMap®3.0 mit MapQTL®4.0 sowie MAPMAKER/EXP3.0 wurden für die Kopplungsanalyse und für die anschließende Korrelation mit Freilandbonituren eingesetzt.

#### 3.4.3.1 Genotypen-Codierung für die Verrechnung in JoinMap®3.0

Das Datenformat für JoinMap®3.0 ist in Anlehnung an den jeweiligen Segregationstyp aus (Elter1 x Elter2) mit mindestens zwei, maximal vier verschiedenen Allelen in diversen Kombinationen zu wählen. Mögliche Datenfeldeinträge sind zutreffende Allelkombinationen nach dem in Tab. 3-6 dargestellten Schema. Es können auch Codominanzbeziehungen zwischen unterschiedlichen Markerbandenkombinationen der Filialgeneration in allelischem Verhältnis zueinander abgebildet werden. Anzugeben ist auch der Populationstyp. Im Fall der Rebe trifft CP („Cross Pollinator“) zu: die Testpopulation entstammt einer Kreuzung heterogen homo-/ heterozygoter diploider Eltern.

**TABELLE 3-6 Segregationstypen, Darstellung in JoinMap-Codierung**

<b>Segregationstypen</b>	<b>Beschreibung</b>
<ab x aa>	2 Allele, segregierender Locus von Elter1
<aa x ab>	2 Allele, segregierender Locus von Elter2
<ab x ab>	2 Allele, Eltern doppelt heterozygot
<ab x ac>	3 Allele, davon ein gemeinsames
<ab x cd>	4 Allele charakterisieren vier parentale Chromosomen

### 3.4.3.2 Genotypen-Codierung für die Verrechnung in MAPMAKER/EXP3.0

Mapmaker (hier in der Version MAPMAKER/EXP3.0 eingesetzt) ist ein bewährtes Kartierungsprogramm, das mit digitalisierten (1/0) - Daten die beiden Fälle „Vorhandensein einer Markerbande“ beziehungsweise „Fehlen einer Markerbande“ für jedes Individuum des Testsets erfasst.

Die Mapmaker-Codierung von Markerbanden bzw. Genotypen lässt sich entsprechend den bereits erläuterten Modellen der Mendelgenetik in folgender Weise darstellen (Großbuchstaben kennzeichnen Dominanz und bedeuten in der Regel „Bande vorhanden“):

◆ formaler Populationstyp F2:	Ab x Ab: AA/2Ab/bb	(3:1)
◆ oder formales Backcross:	Ab x bb: Ab/bb	(1:1), wobei
Bande vorhanden	Bande fehlt	Ausfälle/nicht feststellbar
Feldeintrag <b>1</b>	Feldeintrag <b>0</b>	Feldeintrag <b>—</b>

### 3.4.3.3 Stringenter Test auf Mendel'sche Segregation ( $\chi^2$ -Test)

Mit dem  $\chi^2$ -Test lässt sich prüfen, inwieweit eine empirische Verteilung mit einer Modellverteilung übereinstimmt. So lässt sich zeigen, ob das in der Nachkommenschaft beobachtete Genotypen-Zahlenverhältnis - bezogen auf einen Locus - einer Verteilung im Sinne freier Mendel'scher Segregation entspricht, denn die Platzierung von Markern ohne auffällige Segregationsdistorsion ist sinnvoll, um eine Annäherung an physikalische Locusabstände zu erreichen. Marker, die Segregationsdistorsion aufweisen, können hingegen Aufschluss über Fragestellungen geben, die Besonderheiten der Genomarchitektur betreffen. Beispiele wären Rekombinations-Hotspots, repetitive Segmente etc.

Der  $\chi^2$ -Test ist zur Vorbereitung der Rohdaten für die Kopplungsanalyse in JoinMap®3.0 integriert. Für MAPMAKER/EXP3.0 führte ein Visual Basic - Makro (R. WIND, 2000) ausgehend von einer Markermatrix in Excel-Tabellenformat zeilenweise  $\chi^2$ -Tests auf 1:1 oder 3:1-Verteilung der jeweiligen Markerbande durch.

Bei Unterschreiten des Tabellenwertes 3,84 („Goodness of Fit“ mit 0,05% Fehlerwahrscheinlichkeit und n=2 Freiheitsgraden) sortiert das Makro die Markerdaten in vier verschiedene Tabellen ein: 1:1-spaltende Marker beider Eltern kombiniert, 1:1-spaltende Marker des weiblichen Elters, 1:1-spaltende Marker des männlichen Elters und

3:1-spaltende Marker beider Eltern, die in diesem Fall heterozygot bezüglich dieses Fragments waren.

#### **3.4.3.4 Erzeugung der MAPMAKER/EXP3.0-Quelldatenformate**

Ein weiteres Visual Basic Makro (R. WIND, 2000) bereitete diese getrennten Tabellen für separate MAPMAKER/EXP3.0-Verrechnungen vor, indem es sie in MS DOS - Text als \*.raw -Dateien formatiert. In der Befehlszeile eines Editors wurden die Verrechnungsart (im vorliegenden Fall „backcross“), Anzahl der erfassten Boniturmerkmale sowie der Codierungsschlüssel (hier digitale 1/0 – Daten, vgl. Abschnitt 3.4.3.2) ergänzt.

#### **3.4.3.5 Rahmenkriterien und Kartierung**

Die Koinzidenz von Markerbanden bestimmter Genotypen in den Individuen der Kreuzungspopulation wird von beiden Softwarepaketen in Form von Rekombinationsfrequenzen und schließlich Kopplungsgruppen ausgedrückt. Dabei ist der Begriff der Kopplung zunächst noch formal als  $\geq 50\%$  Wahrscheinlichkeit für gemeinsame Vererbung aufzufassen. Kriterien für die Abgrenzung von Kopplungsgruppen waren LOD 8 (letzterer Wert ist um fünf Größenordnungen stringenter als der übliche Grenzwert von LOD 2 (LANDER und BOTSTEIN, 1989)). Die Maximaldistanz von 40 cM (bzw. Rekombinationsfrequenz 0,4) zwischen zwei Markern wurde zur Unterschreitung bzw. klaren Vermeidung des Grenzfalls 50% Kopplungswahrscheinlichkeit gewählt. Für die weitere Analyse in JoinMap®3.0 einschließlich der relativen Markerplatzierung im Rahmen der Mehrpunktanalyse wurden die Default-Werte beibehalten (Mapping threshold LOD 1,0; Jump Threshold 5,0).

Die Programmfunktionen von MAPMAKER/EXP3.0 wurden als einzelne DOS-Befehle eingegeben oder als Batch-Datei geladen, die die Schritte der Zweipunkt-, der Mehrpunkt- und der Framework-Analyse in einem Template-Programm vereinigt.

#### **3.4.3.6 Umsetzung und Darstellung der Kartierungsergebnisse**

Die Resultate der Verrechnung wurden als Rohdatentabellen dokumentiert sowie in graphischer Umsetzung als lineare Kopplungsgruppen in MS Powerpoint dargestellt. Es wurden getrennte Karten der Eltern sowie Projektionskarten aus der Markerinformation beider Kreuzungseltern unter Verwendung der Kosambifunktion erstellt. Die Ergebnisse aus den Analysen mit JoinMap®3.0 und MAPMAKER/EXP3.0 wurden einem Vergleich unterzogen. Die Mapmaker-Karte diente dabei der Kontrolle bzw. zur Bestätigung der



mit JoinMap®3.0 erhaltenen Ergebnisse. Eine putative Fusionskarte ergab sich durch Homologisierung, d.h. aus Assoziationen zwischen codominanten Ankermarkern unterschiedlicher Kopplungsgruppen und dem Alignment doppelt heterozygoter Marker.

### 3.5 QTL-Analyse und Darstellung kartierter quantitativer Merkmale

Die QTL-Analyse wurde basierend auf den mit JoinMap®3.0 erstellten separaten Kopplungskarten der Eltern in MapQTL® 4.0 (VAN OOIJEN et al., 2000) über die Option der Intervallkartierung vorgenommen. Phänotypische Daten verschiedener Jahre wurden separat voneinander analysiert. QTL, die bei einem LOD-Score  $\geq 3$  (VAN OOIJEN et al., 2000) für Datensätze aus drei oder vier Erfassungsjahren wiederholt zu identifizieren waren, wurden als konsistent erachtet. Speziell JoinMap®3.0 und MapQTL® 4.0 bieten verschiedenen Anforderungen angepasste Möglichkeiten der Datenausgabe, doch wurden die Kartierungsdaten zur Bearbeitung und späteren Einbettung in MS Office-Formate zusätzlich in MS Excel und MS Powerpoint überführt.

### 3.6 Sequenzanalyse mit Bioinformatik - Tools

Basierend auf den Kartierungsarbeiten wurden molekulare Marker in enger Kopplung zu quantitativen Effekten isoliert, angereichert und für DNA-basierte Folgeuntersuchungen herangezogen, deren Ziel eine Sequenzcharakterisierung der entsprechenden Genomregion war.

#### 3.6.1 BLAST (Basic local alignment search tool, ALTSCHUL et al., 1990, 1997)

Die Sequenzen der isolierten AFLP-Fragmente wurden mit den beiden BLAST-Modulen BLASTN (Datenbankabgleich auf Nukleotidebene) und BLASTX (Translation der Nukleotidsequenz und anschließender Abgleich mit Proteindatenbanken wie SwissProt) analysiert. Diese Tools finden Homologien zu annotierten „offenen Leserahmen“ (ORF, Open Reading Frames) und putativen Proteinen. Einige verwendeten Varianten von BLAST sind bereits in der Suchanfrage Alignment-basiert (blast2 Sequences<sup>11</sup>) oder auf besondere Datenbanken spezifiziert (z.B. NASC Insert Blast Server<sup>12</sup>, Wu-BLAST<sup>13</sup>).

Statistische Vergleichsgröße in BLAST ist der E-Wert einer Sequenz. Er steht für die zu erwartende Anzahl von Sequenzen in einer zufälligen Datenbank gleicher Größe, die den Motiven ebenso gut entsprechen würde, wie die Suchsequenz und ist gleich dem

---

<sup>11</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>

<sup>12</sup> <http://nasc.nott.ac.uk/blast.html>

<sup>13</sup> Wu-BLAST 2.0; Gish, W.; 1996-2000; <http://blast.wustl.edu>

Produkt aus den kombinierten p-Werten der Sequenz und der Gesamtzahl aller Sequenzen in der Datenbank. Der p-Wert seinerseits ist definiert als Wahrscheinlichkeit, dass eine Zufallssequenz derselben Länge eine gleich gute oder bessere Übereinstimmung zwischen Suchsequenz und Treffer erzielt. Im Vergleich der besten Treffer aus den Alignmentstudien und unter Zuhilfenahme vollständiger Genbanksequenzen ist es möglich, Querverweise zu weiteren Datenbanken und damit weitere Informationen zu sammeln. Eine Auswahl nützlicher Internetseiten und öffentlich verfügbarer interaktiver Datenbanken, die größtenteils über Hypertext-Indices (GI, AC, TC u.s.w.) miteinander vernetzt sind, ist in Tab. 3-7 wiedergegeben:

**TABELLE 3-7 Übersicht 2004 öffentlich verfügbarer Datenbanken für Genom- und Proteomanalysen**

- **Pubmed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/entrez/query.fcgi>), Literaturdatenbank mit Querverweisen zu zahlreichen weiteren Datenbanken.
- **TIGR** (<http://www.tigr.org>), mit **Arabidopsis Gene Index AGI** (09/2002) und **Vitis vinifera Gene Index VvGI** (02/2003) exprimierter Sequenzen, mit vielfältigen Recherchemöglichkeiten über standardisierte Indexierung (insbesondere TC „Tentative Contig“).
- **GENBANK** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>): Indexierung von Gensequenzen über Ursprung (Accession number, AC) und Benennung (Gene identifier, GI).
- **SALK library of Arabidopsis thaliana tDNA insertion lines** (ALONSO et al., 2001).
- **NASC Insert Sequence blast server** ([nasc.nott.ac.uk/insertwatch/insertDatabase.html](http://nasc.nott.ac.uk/insertwatch/insertDatabase.html))  
Mit Verbindung zur SALK-T-DNA-Insert-Datenbank. Bietet auf der Basis des sequenzierten Arabidopsisgenoms Informationen über Loci und ihre Umgebung sowie über bekannte Insertionslinien, mit Literaturverweisen zu Pubmed. Klärt Fragen wie: Besteht Homologie über codierende Bereiche hinaus?
- **PFAM** (Datenbank konservierter Proteindomänen, <http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>);  
Orthologalignment und Clusteranalyse.  
Auch über den EXPASY Server ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) mit dem Tool PROSITE recherchierbar.
- **SWISSPROT** (Proteindatenbank)
- **TRANSFAC** (Transkriptionsfaktoren, DNA-bindende Proteine und ihre Zielmotive)
- **EMBL** (annotierte Sequenzen aus Genomprojekten) und **TREMBL** (Teilmenge von EMBL, nur exprimierte Sequenzen)
- **Riken Arabidopsis research encyclopedia**, Plant Functional Genomics Research Group GSC RIKEN.  
[http://rarge.gsc.riken.go.jp/cdna/cdna\\_search/cdna](http://rarge.gsc.riken.go.jp/cdna/cdna_search/cdna). Die Enzyklopädie bedient sich folgender Datenbank:
- **PLACE DB**: Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database (HIGO et al., 1999). Nucleic Acids Res, 27, 297-300. Cis-Elemente sind analog zu GENBANK-Einträgen indexiert mit Angaben zum Ursprung (Cis accession number) und Benennung (Cis identifier).

Die parallel zu Sequenzerweiterungen verfolgte Auswertung solcher Quellen fügt sich zu dem Entwurf eines Gesamtbilds, das Anstöße für weitere Untersuchungen geben kann.

### **3.6.2 Motivalignments mit MAST 3.0 1.1.1 („Motif Alignment Search Tool“)**

Mit diesem Programmpaket (TIMOTHY et al, 2001; <http://meme.sdsc.edu/meme/website>; Feb. 03) mit MEME und BLOCKS (BAILEY und GRIBSKOV 2001, 1998; BAILEY und ELKAN 1994) als integrierten Komponenten kann man Sequenzen gruppenweise vergleichen und gemeinsame oder wiederkehrende Motive finden. Die Komponente MEME, die in dieser Arbeit zur Analyse isolierter und sequenzierter Marker zum Einsatz kam, ermöglicht auch, Varianten eines Motivs zu identifizieren. Das Programm ermittelt eine Konsensus-Sequenz der Wiederholungsmotive.

Die Basis für alle Berechnungen in MAST/MEME ist eine positionsabhängige Scoring-Matrix des repetitiven Motivs. Der p-Wert (vgl. S. 78) dient als resultierende Kenngröße dieser Abschätzungsmethode. Ein paarweises Motivalignment aller wiederholten Sequenzmotive belegt dabei, dass keine signifikanten Ähnlichkeiten (Korrelation > 0,6) zwischen den Motiven untereinander bestehen. Die aufgelisteten Resultate entsprechen schließlich den Kriterien, nicht zu überlappen und einen p-Wert < 0,0001 aufzuweisen.

Die Programme können beispielsweise nützlich sein, wenn man eine Sequenz auf Retroelements Signaturen, LTRs usw. überprüfen möchte, die leicht variieren oder noch nicht beschrieben sind. Darüber hinaus ist es möglich, ein Wiederholungsmotiv mit bereits in Datenbanken registrierten Elementen zu vergleichen. Kenntnis über repetitive Motive kann Schwierigkeiten bei der späteren SCAR-Entwicklung vermeiden helfen.

### **3.6.3 Motivsuche mit NSITE**

Das Programm NSITE (SHAHMURADOV und SOLOVYEV, 2002; <http://genomic.sanger.ac.uk>; Feb. 2003) ermöglicht ausgehend von DNA-Sequenzinformation eine statistisch abgesicherte Motivsuche. Untersucht wird auf regulatorische Boxen, konservierte und gensymptomatische Sequenzen, um Information über die Natur der getroffenen genomischen Bereiche zu erhalten, auch wenn sie keine Segmente mit offenem Leseraster enthalten.

Der Abgleich wird mit einer eigenen Datenbank (NSITE DB) und zusätzlich mit TRANSFAC (DNA-bindende Proteine mit ihren Zielsequenzen, Transkriptionsfaktoren, Promotorbereiche etc.) durchgeführt.

### **3.6.4 Vorhersage von Genstrukturen über GenScan**

Das Programm GenScan (BURGE, 1998; <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>; Feb. 03) prognostiziert mit Hilfe verschiedener Algorithmen putative Genstrukturen.

Hauptanwendung des Programms ist - ausgehend von einer genomischen Sequenz - die Vorhersage und Modellierung einer cDNA und gegebenenfalls eines codierten Peptids. Mit diesen editierten Sequenzen kann man dann weitere Analysen betreiben. GenScan wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse einer PCR-Walking-Sequenz eingesetzt.

### **3.6.5 SplicePredictor**

Dieses Programm (BRENDDEL et al., 1998; <http://bioinformatics.iastate.edu/cgi-bin/sp.cgi>; Feb. 2003) findet Splice-Zielmotive unter Berücksichtigung der Signifikanz und der Zielorganismengruppe (Tier, höhere Pflanze, Alge, Hefe, Bakterien). Wahlweise werden alle/mögliche/wahrscheinliche/sichere Splicestellen in einer codierenden Nukleotidsequenz unter Angabe statistischer Kenngrößen berechnet.

### **3.6.6 Topologische Analysen an abgeleiteten Proteinsequenzen**

Neu synthetisierte Proteine besitzen Signalsequenzen am N-Terminus, am C-Terminus oder auch peptidintern, die ihren Bestimmungsort in der Zelle determinieren. Eine solche Information ist Teil der funktionellen Charakterisierung hypothetischer Proteine.

Wichtiger als die exakte Aminosäuresequenz der Targeting-Region sind jedoch für die Bestimmung des tatsächlichen Zielkompartiments die Anordnung lipophiler Abschnitte und Ladungen (KOOLMAN und RÖHM, 1994: S. 214).

#### **3.6.6.1 Targeting-Vorhersage über PSORT**

PSORT (NAKAI und KANEHISA, 1991; <http://psort.nibb.ac.jp/form.html>; Feb. 2003) gleicht eine Aminosäuresequenz systematisch mit einer umfangreichen Liste von Signalpeptidstrukturen und anderen konservierten Motiven des Proteintargeting ab und untersucht physikalische Eigenschaften. Das Ergebnis ist eine statistisch signifikante Aussage über die Natur des codierten Proteins (Existenz vorausgesetzt). Es wird u.a. eine grobe Klassifizierung vorgenommen und zusammen mit Signalpeptiden über Topologie- und Entropieberechnungen prognostiziert, für welchem Ort der Zelle das hypothetische Protein mit quantifizierter Wahrscheinlichkeit bestimmt ist.

#### **3.6.6.2 Vorhersage von Sekundärstrukturen auf Proteinebene**

Folgende Programme wurden im Rahmen dieser Arbeit bei der Auswertung der Fragmentsequenzinformation benutzt, um unter Berechnung energetischer Minima die Ausprägung von Sekundärstrukturen in hypothetischen Proteinen vorherzusagen:

- HMMTop-Server, Programm HMMTop (TUSNÁDY und SIMON, 2001 und 1998). zur Identifizierung von Transmembranhelices.
- Expasy-Server, Programm COILS (LUPAS et al., 1991) zur Identifizierung von Coiled Coils.

Die Analyse über den HMMTop-Server kontrolliert und verfeinert die Analyseergebnisse von PSORT für hypothetische Proteine mit Transmembranhelices durch Angaben zur Lage von Domänen relativ zueinander und bezüglich der Membran. COILS testet, ob übergeordnete, helikale Strukturen begünstigt werden, die funktionelle Relevanz besitzen.

### **3.6.7 Bioinformatikprogramme und Vorgehensweise bei der Analyse im Überblick**

Alle zur Fragmentanalyse eingesetzten Bioinformatikprogramme sind in Tab. 3-8 im Überblick angeordnet, um die schrittweise Vorgehensweise zu verdeutlichen und die jeweiligen Zwischenergebnisse in einen größeren Zusammenhang zu stellen.

TABELLE 3-8: Überblick zur Datenbank- und bioinformatischen Analyse der AFLP-Sequenzen

**Schritt 1: Untersuchungen anhand der AFLP-Sequenzen**

	<b>Tool</b>	<b>Format</b>	<b>Aussage</b>
1]	BLASTN	Nukleotidsequenz	Homologien zu Genombereichen?
2]	BLASTX	Nukleotidsequenz	Homologien zu exprimierten Proteinen?
3]	TBLASTN	Nukleotidsequenz (zur Suche translatiert)	Homologien zu hypothetischen Proteinen?
4]	NSITE	Nukleotidsequenz	Motivsuche: Zielstellen für DNA-bindende Faktoren, Promotorsegmente, kurze Sequenzhomologien zu Proteinen?
5]	MEME/MAST/BLOCKS		Motivalignment: Auffinden von Wiederholungsmotiven
6]	HMMTOP	Aminosäuresequenz	Topologiealignment Identifizierung von Transmembranhelices
7]	COILS	Aminosäuresequenz	Auffinden von Coiled Coils

**Zwischenfazit/Prognose:** Steht die Sequenz im Zusammenhang mit bekannten Motiven? **ja / nein**

**nein:** Direkte Entwicklung von SCAR-Markern ausgehend von der Sequenz.

**ja:** PCR-Walking zur Erweiterung des bekannten Bereichs um die AFLP-Sequenz.

**Schritt 2 (nach Chromosome-Walking): Analysen anhand der Walking-Sequenzen**

	<b>Tool</b>	<b>Format</b>	<b>Aussage</b>
8]	Wu-BLAST	Nukleotidsequenz oder Aminosäuresequenz	doppeltes Alignment Homologie zu exprimierten Sequenzen aus <i>Vitis vinifera</i> und globale Homologien
9]	SplicePredictor	Nukleotidsequenz	Aussagen über Splicing Sites ermöglicht Ableitung alternativer Splicing-Varianten
10]	NCBI-Orf-finder	Nukleotidsequenz	Identifizierung von Offenen Leserahmen (Orfs)
11]	GenScan	Nukleotidsequenz	Identifizierung von Genstrukturen, (Intron-Exon-Junctions), Proteinvorhersage, cDNA-Vorhersage
12]	PSORT	Aminosäuresequenz	Vorhersage der Lokalisierung des Proteins nach Analyse von Signalpeptiden, AS-Gehalt, Polarität etc.; Identifizierung von Transmembranhelices
13]	HMMTop	Aminosäuresequenz	Topologiealignment Identifizierung von Transmembranhelices Lage von Domänen bezügl. der Membran

**4 ERGEBNISSE**

**4.1 Auswertung von Felddaten**

**4.1.1 Jahreszeitliche Besonderheiten des Klimas im Untersuchungszeitraum**

Die in Tabelle 4-1 zusammengestellten Klimadaten beziehen sich jeweils auf die Vegetationsperiode (April bis September, 6 Monate). Sie stammen von der Wetterstation 9f auf dem Gelände des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen.

**TABELLE 4-1: Klimadaten der Wetterstation 9f, Geilweilerhof**

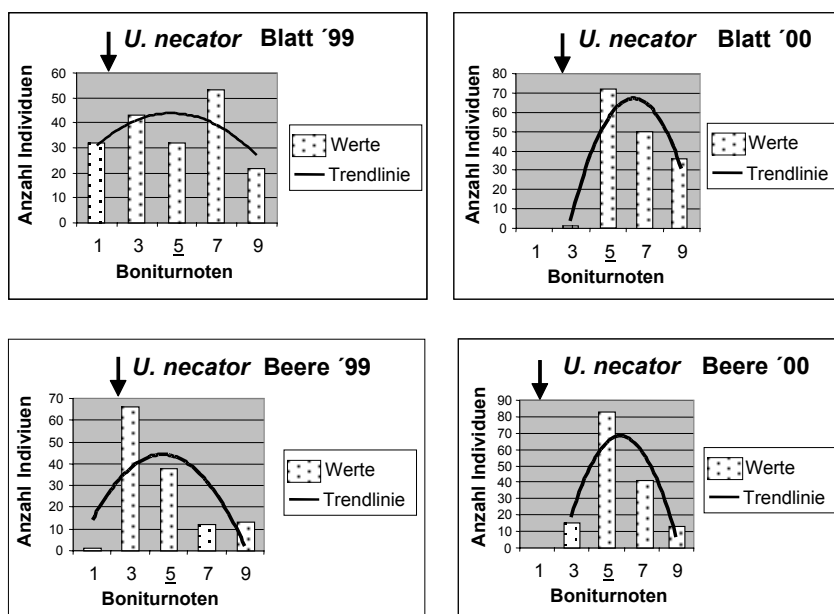
Gezeigt sind Mittelwerte aus dreißigjährigen Zeitintervallen seit 1961 (oberhalb der gestrichelten Linie) sowie darunter die Werte der Boniturjahre der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger'. (Daten zur Verfügung gestellt von M. KLENERT, 2002).

	Ø Temp. (°C) 2m ü. Boden	Σ Niederschläge (mm)	Σ Sonne (h)	Bemerkungen
Ø 1961 – 90	14,9	381	1178	Tendenz zu wärmer und trockener zeichnet sich ab
Ø 1971 – 00	15,2	336	1192	
Ø 1995	15,6	504	1129	ca. 20. 06. bis Ende August überdurchschnittl. warm, Gewitter mit 69 mm Regen Ende Juli, September kühl u. nass, Oktober warm und trocken.
Ø 1999	16,5	366	1218	i bis Sept. überdurchschnittl. warm. Intensive Strahlung und ausgespr. Trockenperiode von Mitte August bis Mitte September. „Sonnenbrand“.
Ø 2000	16,0	455	1196	April bis Mitte Mai überdurchschnittl. warm, ebenso erstes u. zweites Junidrittel. Juli hingegen kühl u. nass. August bis Oktober meist überdurchschnittl. warm. Starker Pilzdruck u. starker Befall.
Ø 2001	15,5	323	1191	Mai warm und trocken, Ende Juni bis Ende August überdurchschnittl. Temp.; September kühl u. nass, Oktober mild u. trocken.

Unterschiede in den Merkmalsausprägungen und Ergebnissen einzelner Boniturjahre können durch Schwankungen der Umweltbedingungen im Vergleich mehrerer Vegetationsperioden bedingt sein.

### 4.1.2 Merkmalskonstanz und Variation in den Bonituren

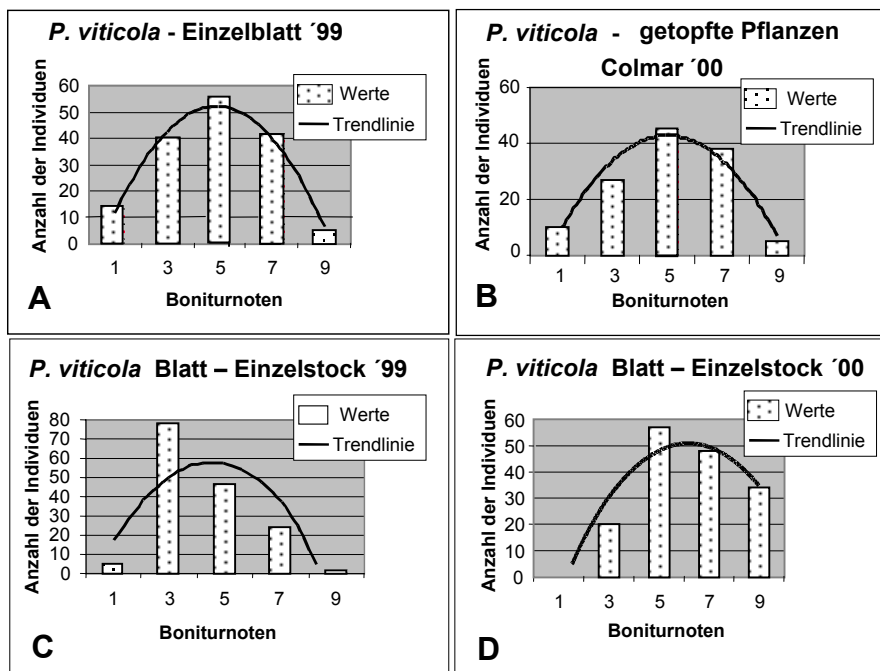
Die in der Kreuzungspopulation erfassten Resistenzeigenschaften weisen in den verschiedenen Erfassungsjahren ähnliche Merkmalsbandbreite auf. Die Abbildungen 4.1 und 4.2 illustrieren die in der Regel gute Merkmalskonstanz der Pilzresistenz, zeigen jedoch auch, dass sich jahresspezifische Besonderheiten leicht auf die Boniturdaten und daraus abgeleitete Kurvenverläufe auswirken können. Bei den gezeigten Darstellungen der Resistenzeigenschaften gegen *Uncinula necator* (Abb. 4.1) und *Plasmopara viticola* (Abb. 4.2) erklärt sich die Einteilung in Merkmalsklassen durch die üblichen neun OIV-Kategorien der Boniturbenotung; reale Übergänge sind kontinuierlich und werden durch die rechnerisch ermittelte eingezeichnete Trendlinie symbolisiert.



**Abb. 4.1 Bonitur weinbaulich interessanter Merkmale am Beispiel quantitativer Resistenz gegen Echten Mehltau (*Uncinula necator* / *Oidium tuckeri*)**

Pfeile markieren den Mittelwert aus Daten von drei Einzelstöcken des resistenten Elters 'Regent' als Vergleichsgröße. Rohdatenerfassung: EIBACH et al. (Weitere Erläuterungen s. Text.)





**Abb. 4.2 A – D. Bonitur weinbaulich interessanter Merkmale am Beispiel der *Plasmopara viticola* - Resistenz-Erfassung, Methoden im Vergleich.**

Die Bonituren zeigen in der Tendenz gute Übereinstimmung. Vergleichsgrößen des resistenten Elters 'Regent' bewegen sich um Werte von 1 – 2 (EIBACH, pers. Mitt. ). Rohdatenerfassung: EIBACH et al.; Standort Colmar: WIEDEMANN-MERDINOGLU et al.. (Weitere Erläuterungen s. Text.)

Das Maximum der Kreuzungspopulation liegt bezüglich beider Schaderreger bei Boniturnote 5, also im Zentrum der Boniturskala. Parallelen sind anhand der Balkendiagramme zwischen verschiedenen Pflanzenorganen erkennbar (in Abb. 4.1 exemplarisch gezeigt für die *Uncinula necator*-Bonitur).

Anhand der Balkendiagramme lassen sich auch Erfassungsvarianten vergleichen. So zeichnete sich im Fall der *Plasmopara viticola*-Resistenz gute Übereinstimmung der Bonituren zwischen Einzelblatt, Einzelstock und Blattscheibentests (vgl. Abb. 4-2 A, B und C), zwischen verschiedenen Jahrgängen (C und D) und zwischen verschiedenen Umwelten oder Standorten (Siebeldingen - A und Colmar - B) ab.

Zu ergänzen ist, dass die Mittelwerte des Jahres 2000 mit Boniturnote 6 leicht in Richtung schlechterer Werte verschoben sind. Erklärbar ist diese Tendenz durch den starken Pilzdruck in diesem Jahr in der Region Südliche Weinstraße. Bei den Vergleichsdaten für die *Plasmopara viticola*-Resistenz der Gewächshauspflanzen in Colmar, die dem außergewöhnlichen Pilzdruck nicht ausgesetzt waren, sondern kontrolliert über Blattscheibentests evaluiert wurden, machte sich im Jahr 2000 auch keine Verschiebung populationstypischer Mittelwerte bemerkbar (vgl. Abb. 4.2 B).

## 4.2 Markerentwicklung und molekularbiologische Genotypisierung

### 4.2.1 SSR-Genotypisierung

#### 4.2.1.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die PCR-Parameter zur SSR-Genotypisierung entsprachen den drei Schritten eines Standardprotokolls. Das Temperaturprofil war in der Regel der kritischste Punkt der PCR-Optimierung. Deshalb wurde mit einer Standardkonzentration von 0,15 mM MgCl<sub>2</sub> gearbeitet, sofern in der Literatur im Rahmen optimierter Protokolle keine andere Konzentration empfohlen war (wie z.B. 0,1 bzw. 0,2 mM in BOWERS et al. (1996) für bestimmte VVMD-Primerpaare).

Die Annealingtemperatur wurde zunächst als Schmelztemperatur  $T_m$  errechnet und dann empirisch nachoptimiert. Meistens erwies sich eine Annealingtemperatur zwischen 45 und 55 °C als geeignet. Oft liegt diese Temperatur bis zu 10 °C unter dem errechneten Wert für  $T_m$ . Häufig führte die Verlangsamung der Aufheizphase zwischen Primeranlagerung und Extension durch die „Ramp“-Funktion des Thermocyclers zu einer verbesserten Bandenintensität.

Unspezifische Poly-A-Addition erschwert gelegentlich die Identifizierung von SSR-Allelen, die sich in ihrer Größe nur wenig unterscheiden. Es konnte die Auswertung vereinfachen, wenn das Gleichgewicht der Anteile heterogener Poly-A-Fragmente zugunsten der verlängerten Fragmente verschoben wurde, indem der letzte Extensionsschritt auf 20 Minuten ausgedehnt wurde.

In seltenen Fällen führte die PCR mit fluoreszenzmarkierten SSR-Primern (z.B. VVMD27) aus ungeklärtem Grund zu atypischen, monomorph in Erscheinung tretenden Peak-Artefakten. Bei wiederholt problematischen Reaktionen wurde auf die Erfassung über Fluoreszenzmarkierung und Kapillarelektrophorese verzichtet; Fingerprints wurden dann ohne Reportergruppe über Polyacrylamidgele erfasst.

#### 4.2.1.2 Durchsatzsteigerung durch „Multiplex“- Methoden kann problematisch sein

Multiplex-PCR wurde als Möglichkeit zur beschleunigten Datengeneration getestet. Die Nachteile überwogen angesichts schlechter Reproduzierbarkeit und beträchtlichen Optimierungsbedarfs an jedem Testset jedoch bei weitem die Vorteile der an sich zeitsparenden Vorgehensweise. Der Aufwand wäre hier nur durch einen späteren routinemäßigen Einsatz der optimierten Reaktionsparameter gerechtfertigt, wie es etwa in der forensischen Diagnostik der Fall ist (vgl. VEENSTRA-VANDER WEELE et al. 1997).

In der Praxis des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof sind jedoch Analysen an vielen verschiedenen Sorten mit wechselnden Primerkombinationen und damit neuen Gegebenheiten der Regelfall. Auf Multiplex-PCR wurde aus diesen Gründen verzichtet.

Anschließend an die separate PCR konnten jedoch zwischen zwei und sechs SSR-Ansätze für die Kapillargelelektrophorese über den ABI Prism GA 310 „gepoolt“ werden. Bei den Kombinationen für die „Multiplex-Beladung“ wurde darauf geachtet, Ansätze aus Fragmentgemischen unterschiedlicher Größe zu kombinieren, um die Auftrennbarkeit zu unterstützen und die Erfassung der Allele zu vereinfachen.

#### **4.2.1.3 Verwendbarkeit der SSR-Primer für ‘Regent’ x ‘Lemberger’ im Parentalscreening**

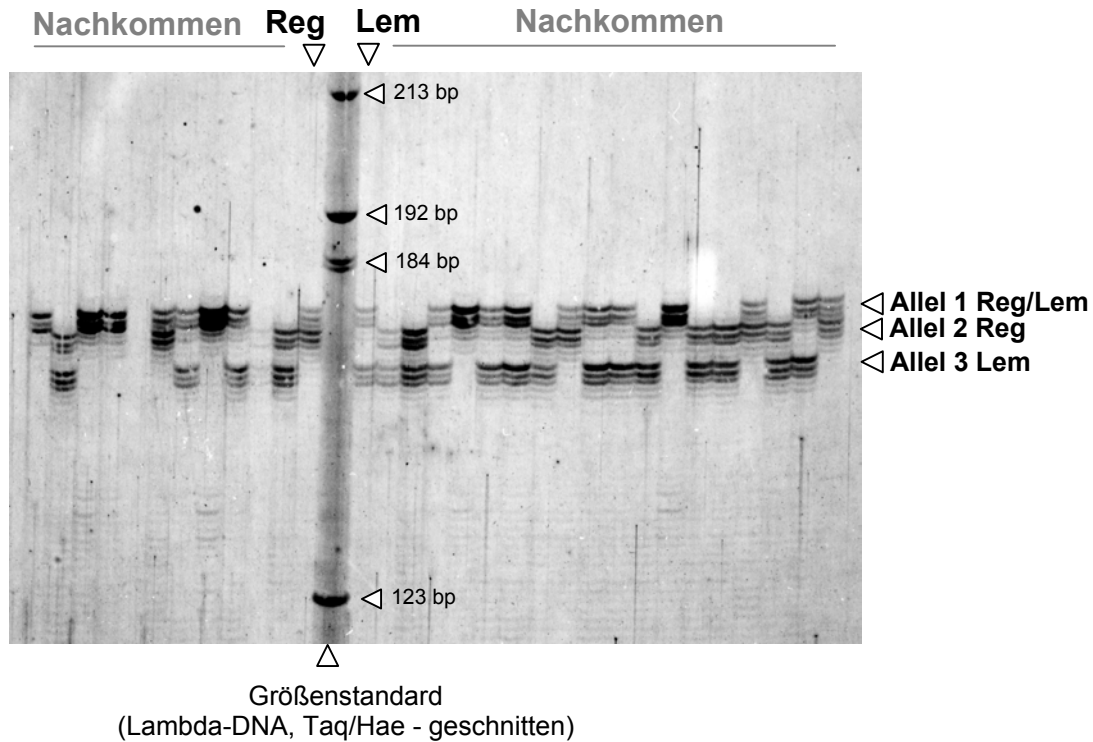
Die Primerpaare wurden nach einem Parentalscreening, einer Testamplifikation an einigen Stichproben von Individuen der Nachkommenschaft und - bei Bedarf - einer Optimierungsreihe (vgl. Tab. 4-2) je nach Qualität des Bandenmusters in das Analyseset aufgenommen oder bei Problemen (unklares Muster, inkonsistente Amplifikate, potentielle Mehrfachbindung der Primer etc.) aus der Genotypisierung von ‘Regent’ x ‘Lemberger’ ausgeschlossen.

Tabelle 4-2 bietet eine Übersicht über die Vorgehensweise bei der Reaktionsoptimierung.

TABELLE 4-2  
 Optimierung und Troubleshooting bei der Auswahl von SSR- Primern für ein 'Regent' x 'Lemberger'-spezifisches Testset

Problem	Kommentar	Optimierung
Fingerprint sehr verschwommen	Sortenabhängiger Effekt	MgCl <sub>2</sub> – Konzentration schrittweise erhöhen.
Kein Amplifikationsprodukt / scheinbares Null-Allel	Sortenabhängiger Effekt. Die Wahrscheinlichkeit für echte Null-Allele ist im Fall der SSRs äußerst gering. Schließt man sonstige PCR-Artefakte aus, so handelt es sich bei den „Nullallelen“ mit großer Wahrscheinlichkeit um Mutationen in den SSR-flankierenden Primerbindungs-bereichen und damit erschwerter Primerbindung.	In Schritten von 4°C die T <sub>m</sub> senken. Die MgCl <sub>2</sub> -Konz. auf 0,1 mM erniedrigen.
Scheinbar monomorpher Genotyp an ursprünglich polymorph gescreentem Locus	Tritt hin und wieder mit fluoreszenzmarkierten SSR-Primern auf, ist als Artefakt zu werten. Erkennbar als ungewöhnlich regelmäßiger, breiter Einzelpeak, monomorph in <i>allen</i> Proben. (Stabilisierung von unspezifischer Bindung durch Fluorezenztag? Primerkonglomerat?)	In Schritten von 4°C die T <sub>m</sub> senken. Die MgCl <sub>2</sub> -Konz. auf 0,1 mM erniedrigen.
Verschiedene Multibanding-Effekte:		
Unspezifische Primerbindung	Sortenabhängig	Temperatur in 4 °C-Schritten erhöhen [MgCl <sub>2</sub> ] auf 0,2 bis 0,25 mM erhöhen.
„Stotterbanden“	Auslöser: die Polymerase verliert kurz beim Ablesen den Kontakt zum Matrizenstrang und überspringt eine Repeat-Einheit. Der Effekt ist auch die natürliche Quelle der Hypervariabilität an Mikrosatellitenloci. Folge: zwei oder mehr Populationen von Fragmenten pro Locus, von denen der vorausgehende meist stärker amplifiziert ist als das verkürzte Produkt (Schattenbandeneffekt). Manche SSR-Reaktionen neigen besonders stark zu Stottereffekten, andere Primerpaare zeigen nie ein solches Bild.	Reaktion wiederholen (Stotter ist manchmal zufallsbedingt, tritt stärker in Augenschein, wenn die „Strand-Slippage“ in einem frühen Zyklus der PCR passiert) Eventuell in 2 °C - Schritten die Annealingtemperatur erniedrigen, damit die Primer und die Polymerase besser haften.
Poly-A-Addition	PCR-Artefakt, bewirkt von der Taq-Polymerase	20 min/72°C am Ende der PCR vereinheitlicht das Bild
Zweiter Locus/ Multilocusamplifikation	Sortenabhängig	Temperatur variieren. Bei schlechter Reproduzierbarkeit Primer aus dem Analyseset ausschließen

Nach erfolgreichem Parentalscreening schloss sich die Analyse der gesamten Kreuzungspopulation mit dem betreffenden Primerpaar an. Nachfolgend ist am Beispiel des Primerpaars VMC8f10 ein typisches Genotyping über ein silbergefärbtes 6%iges Polyacrylamidgel dargestellt (s. Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3** SSR-Analyse über silbergefärbte Polyacrylamidgele, hier stellvertretend dargestellt am Beispiel VMC8f10. Die Nachkommen zeigen alle Kombinationen der elterlichen Allele („Reg“ für ‘Regent‘ und „Lem“ für ‘Lemberger‘): 1/1, 1/2, 2/3 und 1/3 bezüglich dieses Locus.

#### 4.2.2 Etablierung der AFLP-Markererfassung

Im Verlauf der AFLP-Etablierung wurden zur Entwicklung einer robusten Routinemethode einige Modifikationen des Protokolls von VOS und ZABEAU (1995), der Anleitung des „AFLP Plant Mapping Kit“-Handbuchs sowie den Empfehlungen für die Probenvorbereitung und Datenerfassung im ABI Prism GA 310 (PE Applied Biosystems) vorgenommen, die in die Erläuterungen der folgenden Abschnitte einfließen.

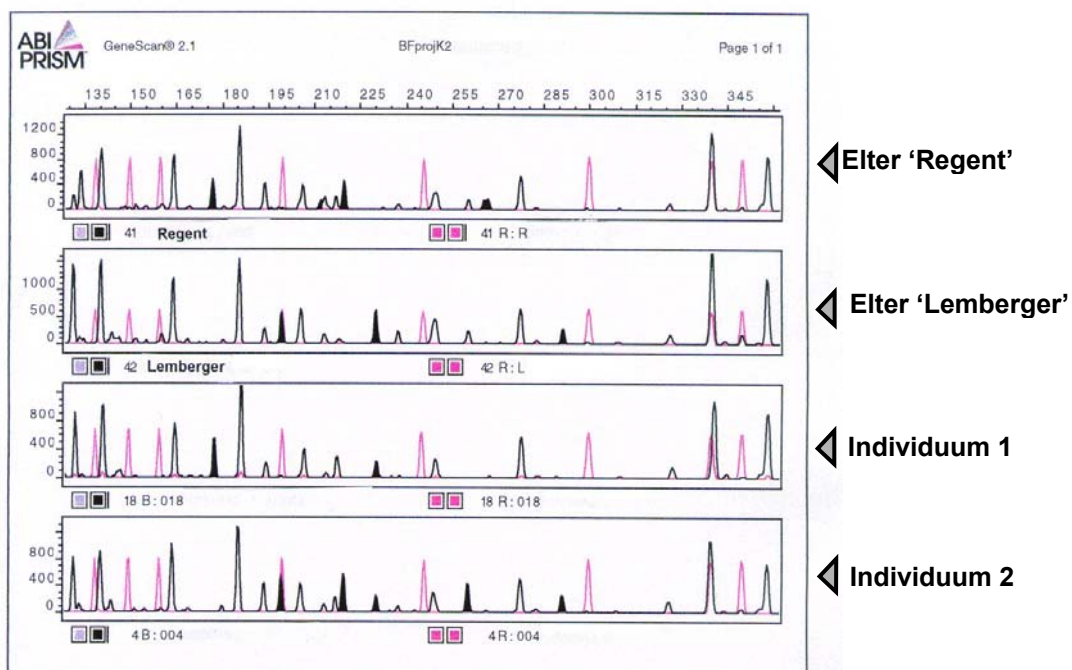
##### 4.2.2.1 Probenvorbereitung und Analyseläufe im ABI Prism GA 310

In der Praxis war die Verwendung von Wasser als Trägerflüssigkeit unproblematischer als Formamid, besonders im Fall der AFLP. Über Agarosegele wurde die Konzentration der PCR-Produkte vor dem Pipettieren der Probe abgeschätzt, um die Zusammensetzung für den Fragmentanalyseauf auf ihre Qualität abzustimmen. Selektive AFLP-

Amplifikate wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgereinigt und gefällt. Stichprobenläufe über den ABI Prism GA 310 mit verschiedenfarbig markierten Proben beeinflussten je nach resultierender Probenintensität der Komponenten die Entscheidung für oder gegen Multiplex-Beladung des Kapillarelektrophoresegeräts. Eine Rolle spielte dabei die Qualität des PCR-Amplifikationsprodukts (z.B. die Amplifikat-Ausbeute, oder der individuelle Gehalt kleiner, geladener Partikel wie Salze und Oligonukleotidüberschuss in den Proben). Die Ergebnisse waren in der Regel sehr gut reproduzierbar. Eigene Erfahrungswerte konnten die Herstellerangabe einer Trennleistung bis zu einem Basenpaar Größendifferenz mit Polymer POP-4 (PE Applied Biosystems) bestätigen.

#### 4.2.2.2 AFLP-Primerauswahl für die Charakterisierung der Kreuzungspopulation

Die Auswahl richtete sich danach, möglichst klare polymorphe Fragmentprofile mit zahlreichen Peaks bei guter Auflösung zu erzielen. Gut geeignet ist beispielsweise Primerkombination \*2 (E35M62) mit E-ACA und M-CTT. Ein Ausschnittfenster aus Probeläufen mit 'Regent', 'Lemberger' und zwei Stichprobenindividuen der Kreuzungspopulation mit dieser Primerkombination ist in Abb. 4.4 dargestellt.



**Abb. 4.4 AFLP-Analyse mittels Kapillarelektrophorese (ABI Prism GA 310, PE Applied Biosystems).**

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Fingerprintanalyse mit der Primerkombination \*2 (schwarzes Peakprofil) im *Genescan*<sup>TM</sup>-Darstellungsmodus eines Projektfensters. Die y-Achse gibt die relative Fluoreszenzintensität an, die x-Achse repräsentiert die Fragmentgröße in bp. Für die automatische Erstellung der Eichkurve herangezogene Peaks des internen Größenstandards ROX500 sind rot dargestellt. Genauigkeit, Reproduzierbarkeit sowie Konstanz der relativen Peakintensitäten sind aus dieser unmodifizierten Repräsentation von Analysedaten ersichtlich.

Tab. 4-3 zeigt die Primerkombinationen, die nach dem Parentalscreening für eine weitere Genotypisierung der Kartierungspopulation eingesetzt wurden.

**TABELLE 4-3**  
**Liste selektiver AFLP-Primer**

<b>Primer-Kombination, Code</b>	<b><i>Eco</i>RI – Primer</b>	<b><i>Mse</i>I – Primer</b>	<b>Fluorescence-Tag (Abi-Dyeset A)</b>	<b>Anzahl polymorpher Fragmente</b>
<b>*1 (E32M59)</b>	E-AAC	M-CTA	NED	26 (10)
<b>*2 (E35M62)</b>	E-ACA	M-CTT	FAM	24 (10)
<b>*3 (E37M62)</b>	E-ACG	M-CTT	JOE	13 (8)
<b>*4 (ACM51)</b>	E-AC	M-CAT	FAM	24 (15)
<b>*5 (ACM47)</b>	E-AC	M-CAA	FAM	14 (4)
<b>*6 (ACM48)</b>	E-AC	M-CAC	FAM	31 (18)
<b>*7 (ACM60)</b>	E-AC	M-CTC	FAM	26 (8)
<b>*8 (ACM59)</b>	E-AC	M-CTA	FAM	25 (10)
<b>*9 (ACM49)</b>	E-AC	M-CAG	FAM	31 (18)
<b>*10 (AGM62)</b>	E-AG	M-CTT	JOE	10 (4)
<b>*11 (AAM59)</b>	E-AA	M-CTA	JOE	26 (12)
<b>*13 (AAM48)</b>	E-AA	M-CAC	JOE	64 (28)
<b>*14 (ATM60)</b>	E-AT	M-CTC	NED	41 (18)
<b>*15 (ATM61)</b>	E-AT	M-CTG	NED	21 (7)
<b>*16 (ATM51)</b>	E-AT	M-CAT	NED	18 (2)
<b>*17 (ATM62)</b>	E-AT	M-CTT	NED	19 (8)
<b>*18 (ATM48)</b>	E-AT	M-CTT	NED	12 (5)
<b>*19 (AGM47)</b>	E-AG	M-CAA	JOE	6 (3)
<b>*20 (AGM48)</b>	E-AG	M-CAC	JOE	17 (11)

Erste Spalte: in der Kartierung verwendeter Acronymcode (\*1-20; vgl. Markernomenklatur S. 92), gefolgt von der publikationsüblichen *Eco*/*Mse*-basierten AFLP-Konsensnomenklatur in Klammern; zweite Spalte: *Eco*-Primer mit selektiven Nukleotiden; dritte Spalte: *Mse*-Primer mit selektiven Nukleotiden; vierte Spalte: Fluoreszenzfarbstoff aus dem ABI Prism-kompatiblen AFLP-Farbstoffset für Filterset A; fünfte Spalte: Anzahl polymorpher Fragmente für die angegebene Primerkombination, in Klammern: Anzahl der Fragmente, die nach Validierung über  $\chi^2$  Test mit statistischer Signifikanz und 0,05 % Irrtumswahrscheinlichkeit gemäß Mendel'scher Verteilung segregieren.

### 4.2.3 Markernomenklatur

Die Markernomenklatur richtete sich nach praktischen Erwägungen wie guter Übersichtlichkeit und Aussagekraft der Markerkarte, bequemer Datenverwaltung etc.. Der Code für die Nomenklatur sollte bei hohem Wiedererkennungswert alle nötigen Informationen enthalten und dabei möglichst kurz und prägnant bleiben.

Zur Benennung der **AFLP-Marker** wurden nach der Genotypisierung der Eltern die in Tab. 4-3 als Platzhalter gesetzten Sternchen („\*“) durch Großbuchstaben ersetzt, die den Status des Markers bezüglich seiner Herkunft symbolisieren. Entsprechend bezeichnet R von ‘Regent’, L von ‘Lemberger’ und RL von beiden Eltern vererbte Marker. Im Nomenklatursystem ist nach den Großbuchstaben der Primer-Code (entsprechend Tab. 4-3) angegeben, gefolgt von der Fragmentgröße des Markers in Basenpaaren. Beide Zahlen sind durch einen Punkt getrennt.<sup>14</sup> Beispiel: RL17.367 ist ein 367-bp-Marker, der von ‘Regent’ und ‘Lemberger’ vererbt wird und mit der Primerkombination 17 (Eco-AT/Mse-CTT) erzielt wurde. Eine „0“ nach R oder L bezeichnet, dass der Locus als heterozygotes „Dummy-Nullallel“ des entsprechenden Elters kartiert wurde. Das heißt, wenn in der Population eine Markerbande alternativ mit einfacher (+/0) oder doppelter Intensität (++) auftrat, wurde die „fehlende Kopie“ formal als Allel des (+/0) - Elters betrachtet und so kartiert. Im Fall der Cokartierung eines Dummy-Allels mit einer realen Markerbande kann das tatsächliche Allel identifiziert worden sein, was dann durch Sequenzvergleich zu belegen wäre. Beispiel: R017.250 entspricht einer fehlenden Kopie eines 250-bp-Fragments, das mit Primerkombination 17 produziert wurde und dessen Intensitätsunterschiede auf einen Polymorphismus des Elters ‘Regent’ zurückgehen. R0- und L0-Marker wurden nur über Fluoreszenzdetektion im Rahmen der statistisch abgesicherten ABI Prism-Analyse erfasst, denn Polyacrylamidgele erlauben eine solch verfeinerte Auswertung in der Regel nicht.

**SSR-Marker** behalten in der Nomenklatur ihre VMC- oder sonstige Kurzbezeichnung bei, die in der Erfassungsmatrix durch ‘R’, ‘L’ oder ‘RL’ ergänzt ist.

Sonstige Markerbezeichnungen erklären sich folgendermaßen: **RAPD-Marker** wurden durch ‘R’, ‘L’ oder ‘RL’, gefolgt vom Kennbuchstaben des Primerkits (Operon oder Roth), gefolgt von der Größe des Fragments in Basenpaaren charakterisiert. Beispiel: RA1500 bezeichnet einen von ‘Regent’ vererbten RAPD-Marker, der mit Kit A als 1500-bp-Fragment entdeckt wurde. **CAPS-Fragmentnamen** basieren auf einem Acronym des vertretenen Gens.



### 4.3 Ergebnisse der Kartierung

#### 4.3.1 Charakterisierung der erhaltenen Karten

Nach Kopplungsanalyse mit dem Programm JoinMap®3.0 und einem ergänzenden Vergleich mit MAPMAKER/EXP3.0 (vgl. S. 100f) wurden in einer Segregationsanalyse an 153 Individuen unter Verwendung der Kosambi-Funktion und des Double-Pseudotestcross-Ansatzes ausgehend von einer Datenbasis aus 920 Markern genetische Karten beider Eltern mit guter durchschnittlicher Auflösung erstellt (vgl. Tab. 4-4 und 4-5).

**TABELLE 4-4**  
**Überblick molekularer Markertypen der ‘Regent’ x ‘Lemberger’-Kartierung**

Markertypen	Anzahl Markerfragmente			
	R	L	RL	Σ
	(von beiden Eltern)			
SSR (Simple Sequence Repeat)	66	59	65	190
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	182	162	103	447
RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	139	79	50	268
CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)	7	1	7	15
gesamt	394	301	225	920

R – ‘Regent’-Marker; L – ‘Lemberger’- Marker, ‘RL’ bei beiden Eltern vorkommende Marker  
 Σ - Summe der drei Klassen

#### ■ JoinMap®3.0: separat erzeugte Karten je eines Elters

Bei LOD 8.0 konnten 43% der ‘Regent’-Marker und 31% aller erfassten ‘Lemberger’-Marker in JoinMap®3.0 zu einer gesicherten Rahmenkarte („Framework“ oder „Core“) für die spätere QTL-Analyse angeordnet werden (vgl. Tab. 4-5 und Abb. 4.5 (a) – (c)).

**TABELLE 4-5**  
**Eigenschaften der mit JoinMap®3.0 erstellten genetischen Karten für beide Kreuzungseltern**

	‘Regent’	‘Lemberger’	kartiert bei beiden Eltern
Kartierte Marker	265	164	62
davon AFLP	109	76	15
davon SSR	44	41	26
Anzahl primärer Kopplungsgruppen	20	24	
Durchschnittliche Kartenauflösung	4,8 cM	7 cM	
Abgedeckter Genombereich	1277,3 cM	1157,7 cM	

<sup>14</sup> Trennungszeichen wie Punkte, Striche etc. in Markerbezeichnungen sind in den Rohdatenformaten von Mapmaker und Joinmap nicht zulässig und fehlen daher in direkt erstellten Darstellungen.

20 primäre (d.h. errechnete) Kopplungsgruppen mit mehr als zwei Markern wurden über JoinMap®3.0 für den weiblichen Elter 'Regent' erzielt; die 'Lemberger'-Karte umfasst unter Verwendung der gleichen Parameter 24 Kopplungsgruppen mit mehr als zwei Markern.

Für benachbarte Marker ergibt sich eine durchschnittliche Auflösung von 4,8 cM für 'Regent' und 7 cM für 'Lemberger'. Auffällig geclustertes Auftreten bestimmter Markertypen ist nicht festzustellen.

Die Eigenschaft „Beerenhautfarbe“ wurde als qualitatives, morphologisches Merkmal auf 'Lemberger'-Gruppe 13 lokalisiert.

#### ■ **Abgleich der separat erzeugte Karten je eines Elters über MAPMAKER/EXP3.0**

Um die MAPMAKER/EXP3.0-Ergebnisse den JoinMap®3.0-Kartierungskriterien anzupassen, wurde ebenfalls eine Signifikanzschwelle von LOD 8 angelegt, auch wenn dieser Wert für die Verrechnung mit MAPMAKER/EXP3.0 systembedingt nicht optimal ist (durch LOD 8 in der Mehrpunktanalyse und durch die Erzeugung je zwei getrennter homologer Chromosomen statt eines Projektionschromosoms wie bei JoinMap®3.0 entfallen weniger Marker auf eine Kopplungsgruppe, dadurch werden die resultierenden Gruppen relativ klein).

Unter Verwendung von MAPMAKER/EXP3.0 wurden für den weiblichen Elter '**Regent**' in 18 Kopplungsgruppen (mit mehr als zwei Markern) 112 Marker angeordnet, dies entspricht 42 % der mit JoinMap®3.0 kartierten Marker. Für 17 dieser Gruppen war ein Abgleich mit JoinMap®3.0 möglich.

Im Fall des männlichen Elters '**Lemberger**' wurden in neun Kopplungsgruppen (mit mehr als zwei Markern) 36 Marker angeordnet. Dies entspricht 22% der mit JoinMap®3.0 für 'Lemberger' kartierten Marker. Alle diese Gruppen lassen sich einer Joinmap-Gruppe zuordnen.

#### **4.3.2 Kopplungsgruppendefinitionen, IGGP-Abgleich und Harmonisierung**

Notwendige Voraussetzung für vergleichende Studien an verschiedenen Populationen und auch für die Harmonisierung von Kartierungsarbeiten im internationalen Rahmen ist die Platzierung von Ankermarkern. Dabei handelt es sich z.B. um SSR-Marker, die auch

wesentlicher Bestandteil des „Frameworks“ der ‘Regent’- und ‘Lemberger’-Karten sind. Sie bilden die Basis für die Homologisierung zwischen ‘Regent’ und ‘Lemberger’, deren Ergebnis in den Übersichtsdarstellungen der Kopplungskarten (Abb. 4.5 (a) – (c) gezeigt und mit „IGGP“-Kopplungsgruppen-Bezeichnungen ergänzt sind. Dadurch wird der Zusammenhang zu 20 Kopplungsgruppen einer SSR-Karte für ‘Riesling’ x ‘Cabernet Sauvignon’ (RÍAZ und MEREDITH; publiziert in RÍAZ et al., 2004) hergestellt. Diese Karte ist 2002 in internationaler Übereinkunft im Rahmen des International Grape Genome Program (IGGP; <http://www.vitaceae.org>) als Referenzkarte und gemeinsame Nomenklaturbasis zur Vergleichbarkeit laufender und künftiger Kartierungsprojekte vereinbart und von den Autoren freundlicherweise bereits vor der Publikation zur Verfügung gestellt worden.

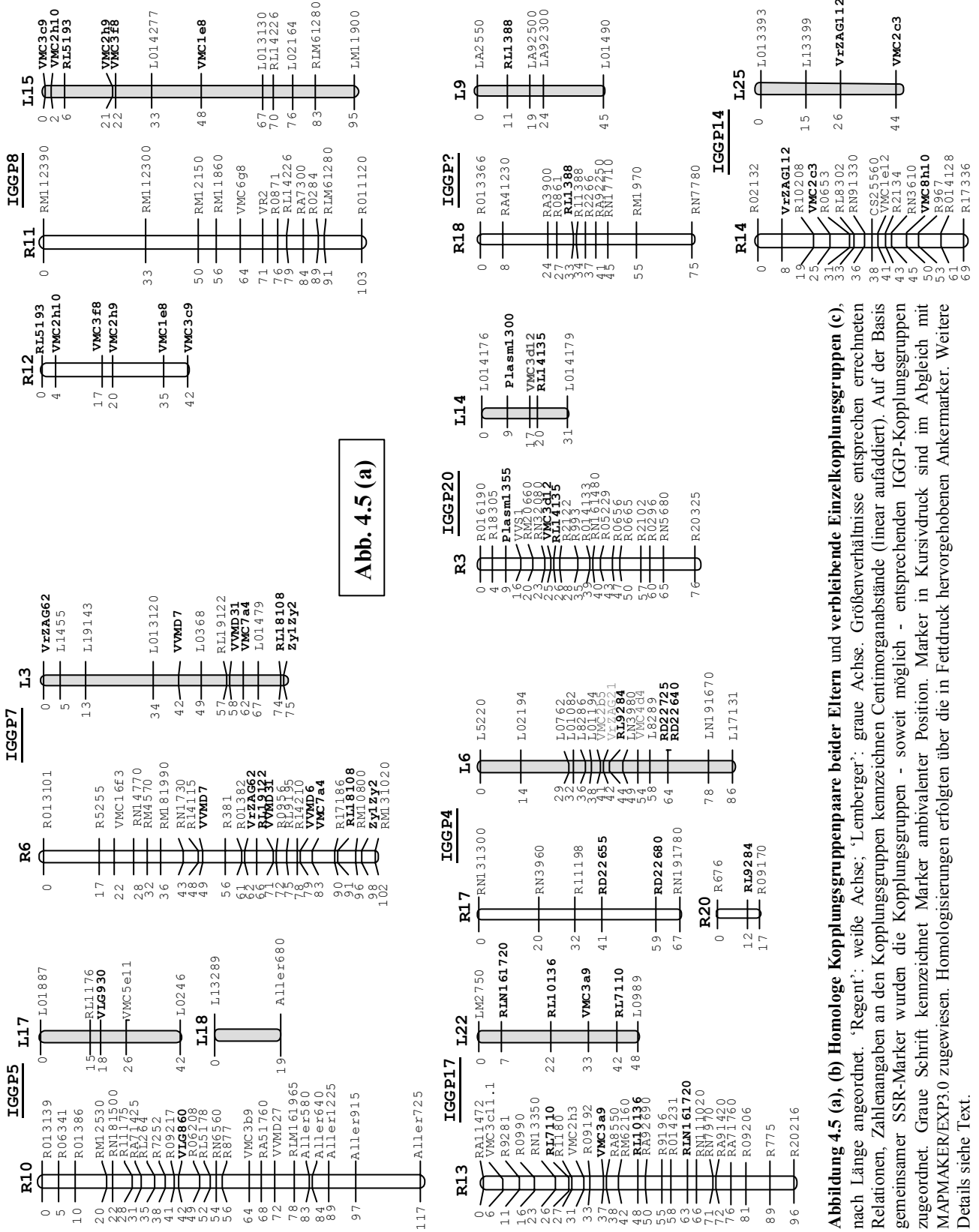
15 homologe ‘Regent’/‘Lemberger’ - Chromosomeneinheiten konnten mittels codominanter Markerinformation (SSR, CAPS, und Marker, die bei beiden Eltern vorkommen) in JoinMap®3.0 identifiziert werden. Abb. 4.5 (a) und (b) zeigen die Kopplungsgruppen in entsprechender paar- bzw. gruppenweiser Anordnung.

Die Homologisierung reduzierte die Anzahl apparenter ‘Regent’-Gruppen auf 17 (mit zwei verbleibenden ‘Single-Gruppen’) und die Zahl der ‘Lemberger’-Gruppen auf 21 mit sechs bisher ungepaarten Gruppen (vgl. Abb. 4.5 (c).

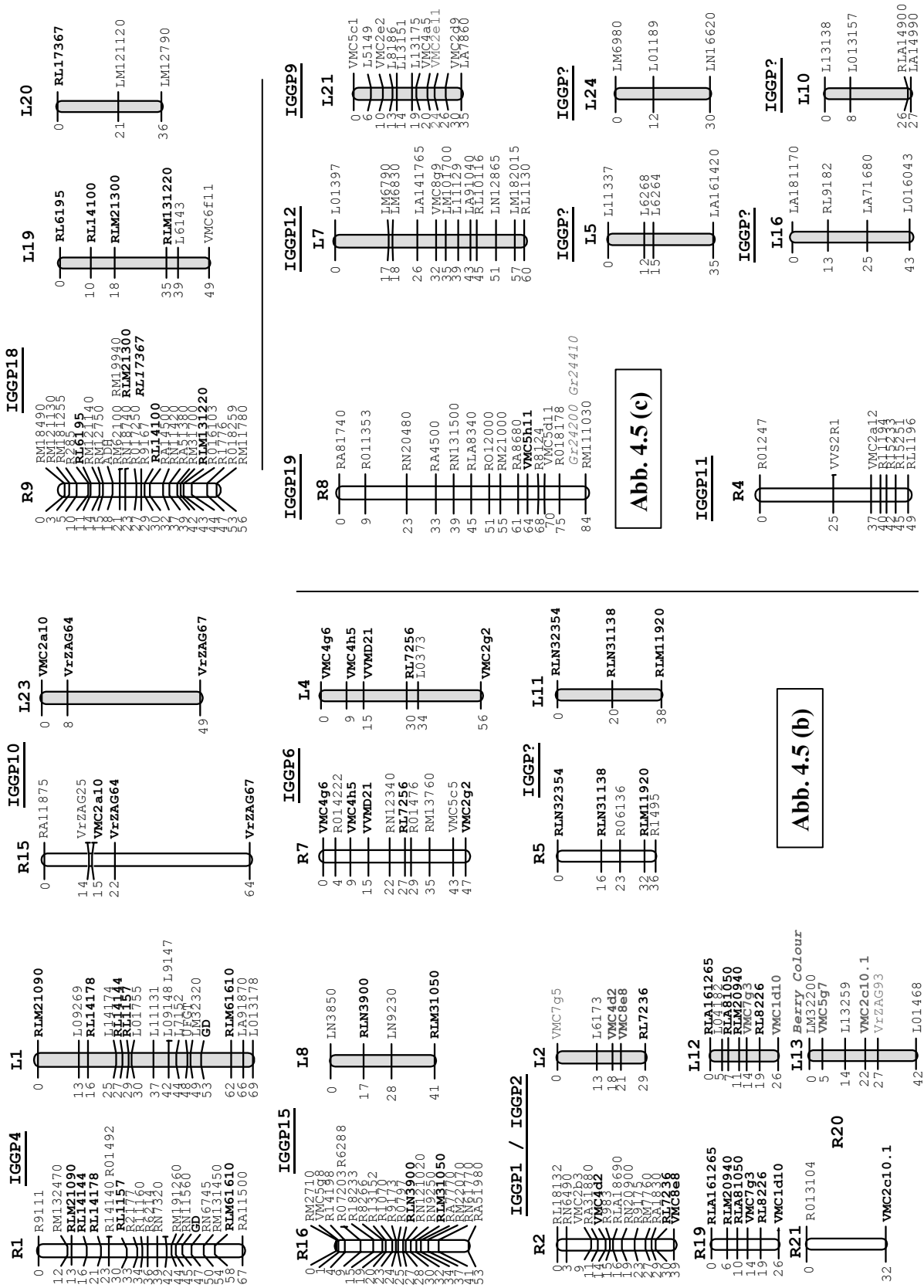
Rückschließend von gemeinsam platzierten SSR-Loci wurde eine weitgehende Übereinstimmung der ‘Regent’- und der ‘Lemberger’-Karte der vorliegenden Untersuchung mit den 20 Kopplungsgruppen der IGGP-Referenzkarte festgestellt.

In Ermangelung gemeinsamer Ankermarker waren zwei homologisierte Gruppen bisher keinem der IGGP-Chromosomen zuzuordnen.

Die Ergebnisse der ‘Regent’ x ‘Lemberger’ - Kartierung erlauben das Fusionieren der IGGP- Kopplungsgruppen 1 und 2; damit ergibt sich in dieser Referenzkarte die für die Weinrebe letztlich cytologisch diagnostizierte Anzahl von 19 Kopplungsgruppen entsprechend der realen Chromosomenzahl von *Vitis vinifera* (HUSFELD, 1932; OLMO 1937; in SHETTY, 1959).



**Abbildung 4.5 (a), (b) Homologe Kopplungsgruppenpaare beider Eltern und verbleibende Einzelkopplungsgruppen (c), nach Länge angeordnet. 'Regent': weiße Achse; 'Lemberger': graue Achse. Größenverhältnisse entsprechen errechneten Relationen, Zahlenangaben an den Kopplungsgruppen kennzeichnen Centimorganabstände (linear aufaddiert). Auf der Basis gemeinsamer SSR-Marker wurden die Kopplungsgruppen - soweit möglich - entsprechenden IGGP-Kopplungsgruppen zugeordnet. Graue Schrift kennzeichnet Marker ambivalenter Position. Marker in Kursivdruck sind im Abgleich mit MAPMAKER/EXP3.0 zugewiesen. Homologisierungen erfolgten über die in Fettdruck hervorgehobenen Ankermarker. Weitere Details siehe Text.**



### 4.3.3 Integrierte Kopplungsgruppen

■ **Mit JoinMap®3.0 erzeugte kombinierte Karte mit Markerdaten beider Eltern**  
Zwölf integrierte Kopplungsgruppen mit Markern beider Eltern (bezeichnet mit Int; vgl. Abb. 4.6 ) ergeben sich, wenn man 'Regent'- und 'Lemberger'-Marker gemeinsam zu einer Konsenskarte verrechnet. Diese Karte enthält dann etwa die Hälfte aller Marker, die in den separaten Karten kartiert wurden.

■ **Mit MAPMAKER/EXP3.0 erzeugte kombinierte Karte mit Markerdaten beider Eltern**

185 Marker wurden in einer integrierten Konsenskarte für 'Regent' und 'Lemberger' mit MAPMAKER/EXP3.0 kartiert. Dabei ergaben sich ohne Berücksichtigung von Fusionierungen 45 Kopplungsgruppen (nicht dargestellt, vgl. aber Erläuterungen S. 100ff). Die Anzahl der Marker, die in dieser Karte platziert werden konnten, entspricht 88% der in den 12 integrierten Kopplungsgruppen mit JoinMap®3.0 angeordneten Marker.

Zu 44 dieser 45 Kopplungsgruppen findet man ein passendes Gegenstück in den separaten Joinmapkarten für 'Regent' und für 'Lemberger'. 23 Gruppen lassen sich mit einer der zwölf integrierten Joinmap-Kopplungsgruppen abgleichen. Dieser Abgleich betont die deutlichen Parallelen zwischen den Ergebnissen beider Programme.

### 4.3.4 Wechselnde Markerpositionierung („Dreher“) im Vergleich der separaten mit den integrierten Karten

■ **JoinMap®3.0**

Einzelne Marker wechseln in den verschiedenen Kartenvarianten ihre Position. Besonders stark ist im Fall der JoinMap®3.0-Verrechnung die Gruppe Int5 (R6/L3) von Rearrangements betroffen. Hier polarisiert sich die Verteilung der Marker zudem, sodass sich etwa in der Mitte der Gruppe Int5 eine „Symmetrieachse“ ergibt.

Im Schnitt ergeben sich beim Abgleich der separaten mit der integrierten Konsenskarte im Fall von JoinMap®3.0 ein bis zwei Dreher in der Markerabfolge pro Kopplungsgruppe.

■ **MAPMAKER/EXP3.0**

Das gleiche Verhältnis an Umgruppierungen zeigen die Kopplungsgruppen der einzeln und kombiniert erstellten MAPMAKER/EXP3.0-Karten im Vergleich.

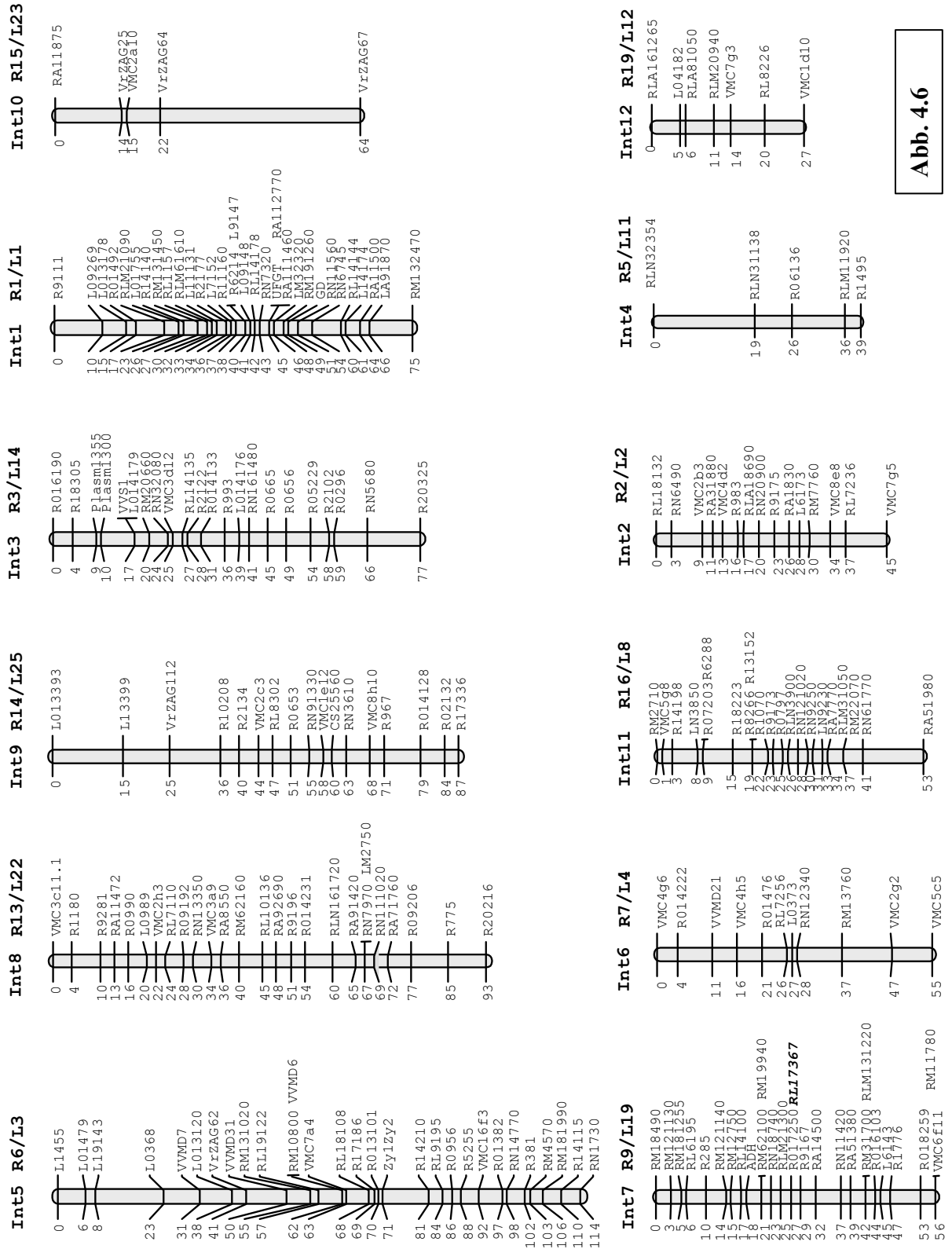


Abb. 4.6

Abb. 4.6 Integrierte Kopplungsgruppen einer kombinierten Verrechnung der Markerinformation beider Eltern mit JoinMap@3.0.

Zwischenfazit: Die integrierten Karten beider Programmvarianten sind geeignet, um möglichst viele Marker gemeinsamen Kopplungsgruppen zuzuordnen. Dadurch treten Homologien zwischen Kopplungsgruppen deutlicher hervor und es ergeben sich weitere Fusionierungen. Die Information zur Markerabfolge kann im Vergleich zu den einzeln erstellten Karten lokal etwas beeinträchtigt sein; stabile Chromosomenbereiche lassen sich durch konstante Markerpositionen in den integrierten Karten noch zusätzlich bestätigen.

### 4.3.5 Informationsgewinn durch die Berücksichtigung von MAPMAKER/EXP3.0

#### 1) Durch MAPMAKER/EXP3.0 ergänzend kartierte Marker

Unter Verwendung unveränderter Kartierungsparameter (d.h. LOD 8 und maximaler Abstand  $\leq 40$  cM zwischen zwei Markern) ermöglichte die Verrechnung in MAPMAKER/EXP3.0 die Eingliederung von drei weiteren Fragmenten: Der **AFLP-Marker RL17.367** wurde einem bereits relativ dicht mit Markern besetzten Bereich von 'Regent'-Gruppe R9 zugeordnet; darüber hinaus wurden auf Gruppe R10 die CAPS-Fragmente **Gr3860 und Gr3750** am gleichen Locus in Nachbarschaft zu VMC3b9 kartiert. Sie stehen für ein Protein, das bei der Beerenreife exprimiert wird (spezifiziert als Grape ripening related protein, vgl. Tab. 3-5).

#### 2) Durch MAPMAKER/EXP3.0 neu hinzugekommene Kopplungsgruppen

Eine zusätzliche Kopplungsgruppe wurde durch MAPMAKER/EXP3.0 für 'Regent' identifiziert (Abb. 4.7). Damit ergeben sich unter Berücksichtigung der Fusionierungen 18 Kopplungsgruppen.

**Abb. 4.7 Zusätzliche Kopplungsgruppe MM R26** aus der Verrechnung mit MAPMAKER/EXP3.0, in keiner Joinmapkarte existiert ein Gegenstück.

MM R26	
Marker	Distanz
R14199	23.9 cM
RN171400	25.6 cM
RO1670	-----
	49.5 cM

Eine zusätzliche Kopplungsgruppe (MM Int29) wurde aus der kombinierten Verrechnung von Markern beider Eltern zu einer integrierten Karte in MAPMAKER/EXP3.0 erhalten (s. Abb. 4.8). Diese Gruppe lässt sich durch den Ankermarker VVMD28 der IGGP-Gruppe 3 zuordnen.

MM Int29	
Marker	Distanz
M62020	23.5 cM
R8206	12.8 cM
A21930	15.6 cM
VVMD28	-----
	51.9 cM



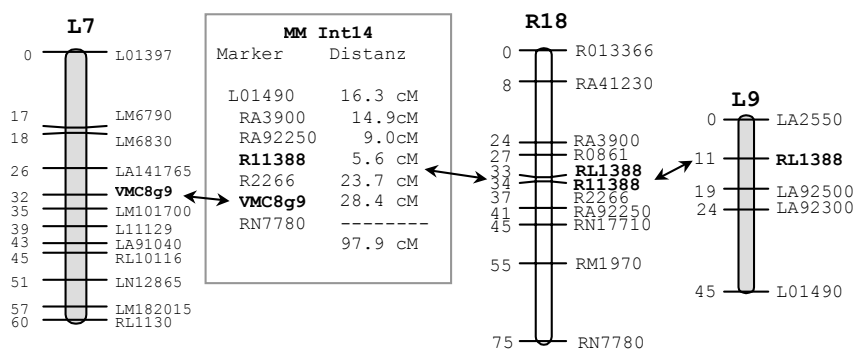
**3) Bestätigung stabiler Bereiche und Identifizierung „dynamischer“ Bereiche:  
„Dreher“ im Vergleich der separaten Mapmaker- und JoinMap-Karten**

Zwischen den getrennt berechneten Karten beider Eltern im Vergleich MAPMAKER/EXP3.0 – JoinMap®3.0 ergeben sich einige Positionswechsel: Für ‘Lemberger‘ treten insgesamt 5 „Dreher“ auf (entsprechend 3% der JoinMap®3.0-Karte). Die ‘Regent‘-Karten aus MAPMAKER/EXP3.0 und JoinMap®3.0 zeigen im Vergleich miteinander 25 „Dreher“, dies entspricht 9% der Joinmap-Karte für ‘Regent‘. Es ist zu erwarten, dass die Quote der „Dreher“ mit zunehmender Markeranzahl bzw. unter Auslassung problematischer Marker sinkt (RÍAZ et al., 2004).

Insgesamt hat sich beim Stand der Untersuchungen für ca. 94% der genetischen Karte die Markerabfolge im Vergleich verschiedener Kartierungsvarianten stabil gezeigt.

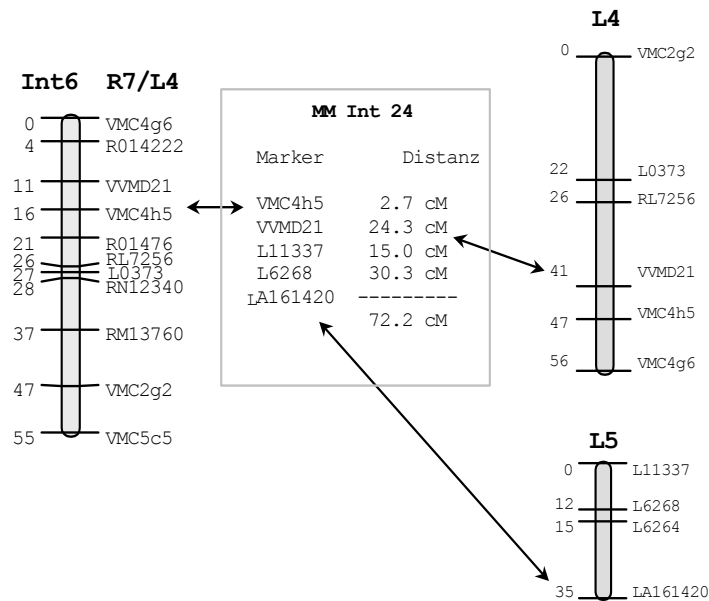
**4) Mapmakerergebnisse erlauben die Fusionierung einiger Kopplungsgruppen der JoinMap®3.0-Karten:**

- MM Int14 fusioniert die JoinMap-Gruppen L7, L9 und R18. Dadurch wird eine bislang ungepaarte ‘Lemberger‘-Gruppe homologisiert. Über den auf L7 kartierten SSR-Marker VMC 8g9 lassen sich die Kopplungsgruppen R18 und L9, die zuvor mangels Ankermarker nicht mit der IGGP-Referenzkarte abgeglichen werden konnten, jetzt IGGP12 zuordnen.



**Abb. 4.9 Fusionierung von L7 und L9 durch Abgleich mit MM Int14.**

- MM Int24 bringt die JoinMap-Gruppe L5 über die beiden zusätzlich kartierten SSR-Marker VMC4h5 und VVMD21 in Beziehung mit JoinMap Int6, d.h. die Single-Gruppe L5 fusioniert mit L4, kann dadurch mit R7 homologisiert und IGGP6 zugeordnet werden (vgl. Abb. 4.10).



**Abb. 4.10 Fusionierung von L4 und L5 durch Abgleich mit MM Int24 und JoinMap Int6**

Zusammenfassend ergeben sich nach dem Vergleich der vorgestellten Kartentypen unter Berücksichtigung aller Ergänzungen, Fusionierungen und Homologisierungen für ‘Lemberger‘ 19 und für ‘Regent‘ 18 Kopplungsgruppen mit drei oder mehr Markern. Die fehlende 19. Gruppe des weiblichen Elters könnte durch MMInt29/IGGP3 repräsentiert sein.

#### 4.4 Ergebnisse der QTL-Analyse weinbaulicher Eigenschaften

Die Korrelationen zwischen kartierten molekularen Markern und Feldboniturwerten sind durch QTL-Intervallkartierung ermittelt worden. So konnten für eine Reihe untersuchter Merkmale an ‘Regent’ x ‘Lemberger’ quantitative Effekte mit hoher Konsistenz über die Jahre des Erfassungszeitraumes hinweg identifiziert werden. Mehrere dieser QTL sind klar definiert, beidseitig markerflankiert und repräsentieren kartierte Regionen überdurchschnittlicher Markerdichte.

Einen Überblick über die QTL-Analyse, deren Erörterung sich nun anschließt, vermittelt Tabelle 4-6. Die darin erfassten QTL beziehen sich auf den weiblichen Elter ‘Regent’, der für die untersuchten Resistenzmerkmale als apparenter Hauptdonor angesehen werden kann. In der Tabelle wird deutlich, welche QTL auf gemeinsame Kopplungsgruppen entfallen.

**Tabelle 4-6. Reproduzierbare QTL-Effekte aus der Intervallkartierung im Überblick.** Die Ergebnisse basieren auf einer LOD8-Karte von 'Regent'. Spalten entsprechen den QTL-tragenden Kopplungsgruppen, hier angeordnet nach Grösse in cM (keine Fusionierungen). Die Spaltenköpfe enthalten die automatisierte Joinmap-Benennung sowie die IGGP-Bezeichnung. Gezeigte QTL-Effekte sind durch ihre jeweils erreichten LOD-Score-Spitzenwerte repräsentiert und beruhen auf der wiederholten Erhebung von Feldbonituren. Die signifikantesten Effekte sind fettgedruckt. Zusätzlich sind Major QTL gerahmt dargestellt. Die beiden Zahlen unterhalb der LOD-Maxima entsprechen der Anzahl konsistent gewerteter QTL-Effekte bezogen auf die Gesamtzahl der Erfassungsjahre (durch Schrägstrich getrennt).

Joinmap Default-Nr.	KG19	KG20	KG5	KG2	KG7	KG4	KG9	KG15	KG1	KG14	KG18	KG3	KG8	KG13	KG6	KG12	KG11	KG10
Größe (in cM)	26	32	36	39	47	49	53	56	64	67	69	75	84	96	102	42	103	117
IGGP-Nomenklatur	2	2	?	1	6	11	15	18	10	16	14	12	19	17	7	8	8	5
Plasmopara <sup>R</sup> , Blatt	14 4/4			5 2/4				20 3/4				4 3/4	5 3/4				4 2/4	3 3/4
Plasmopara <sup>R</sup> , Beere	7 5/5		11 3/5	7 2/5	7 2/5		11 2/5	17 5/5	12 3/5	7 2/5	15 4/5	15 3/5		15 3/5	16 5/5			7 3/5
Plasmopara <sup>R</sup> Nekrosenbildung				4 2/3				16 2/3				4 2/3	4 2/3					
Oidium <sup>R</sup> , Blatt		7 3/3				6 2/3	22 3/3			4 2/3	6 2/3	6 2/3	7 2/3	4 2/3			5 2/3	
Oidium <sup>R</sup> , Beere							16 3/3				4 2/3	5 2/3						
Botrytis <sup>T</sup> , Beere	7 2/2			7 1/2			10 2/2	3 1/2			3 1/2	8 2/2	6 1/2	8 1/2				7 1/2
Beginn Beerenreife		46 3/4	16 2/4	4 2/4					38 4/4			45 3/4	44 3/4	2 2/4	43 4/4	35 4/4	41 4/4	8 2/4
Beerenzahl pro Traube		80 2/3					78 2/3				9 3/3	90 2/3	11 3/3	75 3/3	75 3/3	83 3/3	85 2/3	
Beerengröße	22 3/4		6 2/4				24 2/4		6 3/4		17 2/4	19 3/4	20 3/4		27 4/4		19 2/4	
Beerensatz	17 3/3	29 2/3								20 2/3						25 2/3		
Trauben pro Trieb				2 2/4	2 2/4					3 2/4		15 2/3				65 3/4		
Traubengröße				3 3/3														
Traubensatz																		
Triebwuchs								3 3/4							2.5 2/2			
Axillartriebbildung	9 2/4			31 2/4				4 2/4	56 3/4		38 2/4	16 4/4	34 3/4	29 2/4				7 2/4

Die numerischen Daten repräsentieren LOD-Spitzenwerte des jeweils betrachteten QTL. Darunter ist die Anzahl konsistenter Datensätze in Relation zur Gesamtanzahl erfasster Datensätze (entsprechend den Boniturjahren) angegeben. Beide Kenngrößen in Kombination können als Maß für die Signifikanz eines gegebenen QTL herangezogen werden. Alle in der Tabelle aufgeführten QTL-Korrelationen weisen mittlere bis vollständige Konsistenz und signifikante LOD-Werte auf.

Detailliertere Zusammenhänge werden aus der differenzierten Betrachtung von QTL-Profilen und ihrer Überlagerungen ersichtlich (vgl. Abbildungen 4.12 – 4.18, S. 107ff). Effekte zu Resistenz und Reife sind in diesen Diagrammen zusammen mit darüber hinaus zu beobachtenden phänotypischen und habitusbezogenen quantitativ variierenden Merkmalen dargestellt, die in der gleichen chromosomalen Region kartiert sind.

Für die Abbildungen 4.12 – 4.18 wurden Datensätze mit typischer Repräsentation des quantitativen Effekts ausgewählt und übereinander projiziert. Die durch kartierte Marker definierte Kopplungsgruppe bildet in direkter Relation zu den entsprechenden QTL-Profilen eine zweite Centimorgan-Achse.

Die Rohdaten sind aus MapQTL®4.0 exportiert und mit MS Excel-Software editiert worden.

#### 4.4.1 In der Kreuzungspopulation festgestellte quantitative Major QTL-Effekte

Sehr deutliche QTL-Effekte konnten für Resistenz gegen *Plasmopara viticola* ( $Plv^R$ ) und *Uncinula necator/Oidium tuckeri* ( $Un^R$ ) beobachtet werden.

Jeweils separate Major-QTL-Regionen für jedes der beiden Resistenzphänomene auf verschiedenen Chromosomen und fehlende Korrelation (vgl. FISCHER et al., 2004) sprechen für ihre weitgehend unabhängige Vererbung. Mittlere cM-Markerabstände in den beschriebenen QTL-Regionen liegen im Bereich von 1,5 cM und darunter.

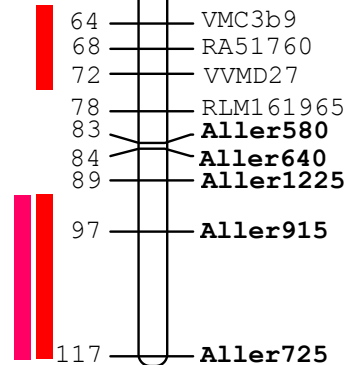
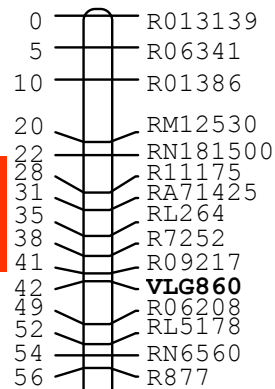
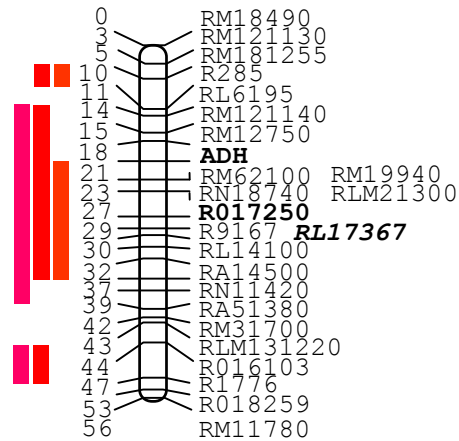
Zwei „*Plasmopara*-Gruppen“ mit Major-QTL (‘Regent‘-Gruppen R9 und R10, vgl. Abb. 4.11 A) in Form von starken, konsistenten Korrelationen zu Resistenz an Blatt, Beere und Nekrosenformation sowie eine „*Uncinula*-Gruppe“ (‘Regent‘-Gruppe R16; vgl. Abb. 4.11 B) mit *Uncinula*-Resistenz an Blatt und Beere sind charakterisierbar.

*Botrytis*-Toleranz der Beere tritt auf den Gruppen R3, R6 und R19 sowie in ihrer stärksten Ausprägung auf R16, der „*Uncinula*-Gruppe“, auf.

Weitere deutliche QTL-Effekte sind für Eigenschaften mit Relevanz für die Reife (Veraison, Beerengröße sowie Beerenertrag, ausgedrückt als Anzahl der Einzelbeeren pro Traube) festzustellen. Hier sind die Gruppen R1, R6 und R11 mit Major QTL für den Beginn der Beerenreife hervorzuheben (vgl. Abb. 4.11 C).

- $Piv^R$  Beere: LOD23
- $Piv^R$  Blatt: LOD28
- $Piv^R$  Nokr. : LOD16

## R9



- $Piv^R$  Beere: LOD16
- $Piv^R$  Blatt: LOD8
- $Piv^R$  Nokr. : LOD4

Abbildung 4.11 A. – C. Major QTL – Bereiche der Resistenz und der Veraison. Farbige Balken kennzeichnen die Lage der QTL auf der Kopplungsgruppe. Für fettgedruckte Marker liegen Informationen über Identität und/oder Basenfolge vor. Maximale LOD-Werte sind angegeben.

**A. *Plasmopara viticola*-Resistenz.** Major QTL ( $Piv^R$ ) der Blätter, der Beeren sowie der Nekrosenformation bzw. der Kompetenz zur hypersensitiven Reaktion entfallen auf ‘Regent’-Kopplungsgruppen 9 und 10. Die Fotos zeigen Beispiele der Merkmalsausprägung (links: Resistenz bei ‘Regent’, rechts: Pilzsensitivität bei ‘Lemberger’)

**B. Resistenz gegen *Uncinula necator/Oidium tuckeri*.** Major QTL ( $Un^R$ ) an Blatt und Beere treten auf Kopplungsgruppe R16 auf. (Fotos: links Resistenz bei ‘Regent’, rechts: Pilzsensitivität bei ‘Lemberger’)

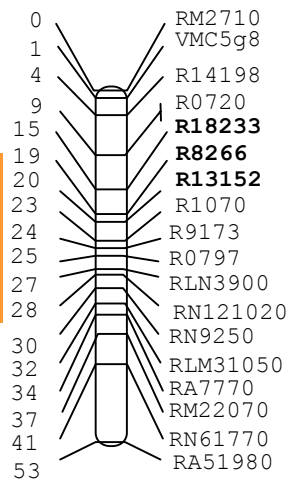
**C. Beginn der Beerenreife.** Major QTL sind auf den drei Kopplungsgruppen R1, R6 und R11 lokalisiert. Die Fotos zeigen an zwei Beispielen aus der Kreuzungspopulation sowie an ‘Regent’ (rechts) die variierende Merkmalsausprägung.



**Un<sup>R</sup> Blatt: LOD23**



# R16

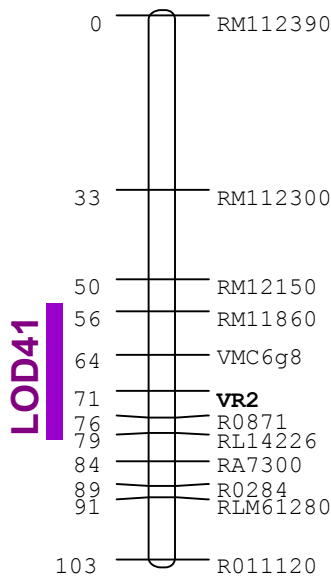


**Un<sup>R</sup> Beere: LOD17**

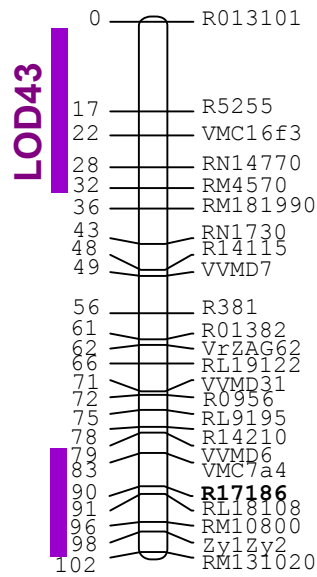


Abbildung 4.11 B

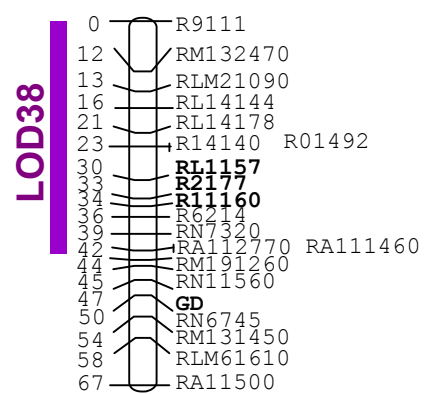
# R11



# R6



# R1



**Beginn der Beerenreife/  
Veraison**



Abbildung 4.11 C

#### 4.4.2 Genauere Betrachtung signifikanter QTL – Effekte

##### 4.4.2.1 Koppungsgruppen mit Resistenz-QTL

###### ■ ‘Regent‘-Kopplungsgruppe R9: Resistenz gegen *Plasmopara viticola*

Der „Major-QTL“ für die Resistenz gegen *Plasmopara viticola* ( $Plv^R$ ) auf ‘Regent‘-Gruppe R9 erstreckt sich über rund 45 cM (s. Abb. 4.12) und erklärt ca. 56% der Variation von  $Plv^R$  (Blatt) im Bereich der Marker RA14100 und RL14.500, für  $Plv^R$  (Beere) ca. 70% bei RL14.100, 57% bei RA14500 und bis zu 73% bei RLM131220. Ca. 42% der Variationsbandbreite von  $Plv^R$  (Nekrosenformation) ist erklärbar durch die QTL-Positionen RA14500 und RL14100.

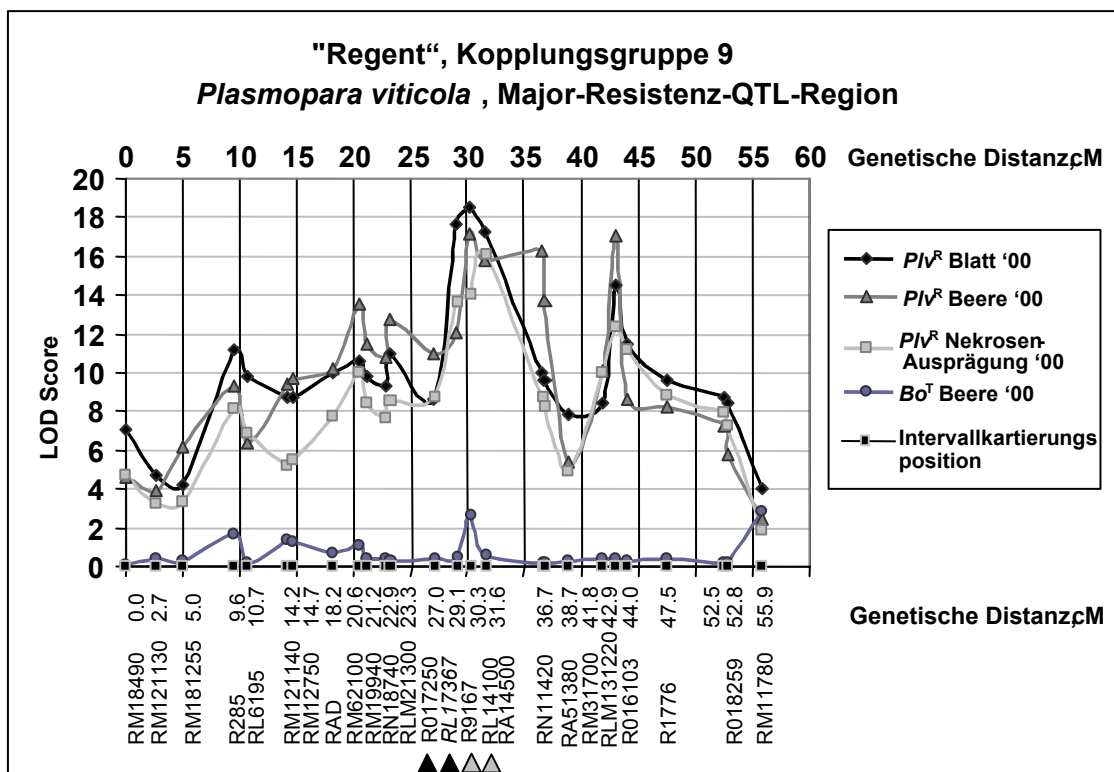


Abbildung 4.12 Major QTL-Region von ‘Regent‘ R9 für Resistenz gegen *Plasmopara viticola* als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.

Molekulare Marker bilden die Kopplungsgruppe als zweite cM-Achse unter den übereinander projizierten LOD-Score - Kurven für die Merkmale *Plasmopara*-Resistenz ( $Plv^R$ ) an Blatt, Beere und Nekrosenausprägung sowie Botrystoleranz ( $Bo^T$ ) der Beere aus Werten des Jahres 2000 ab. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Markerfragmente wurden isoliert (grau und schwarz) und nach Sequenzierung analysiert (schwarz).

Auf dieser Kopplungsgruppe scheinen sich praktisch entlang des gesamten Chromosoms verteilte Faktoren zu befinden, die sich positiv auf die Widerstandsfähigkeit einer pilzbefallenen Pflanze auswirken.

Insbesondere die Resistenz des Blatts steht offenbar in Zusammenhang mit der Befähigung zur effizienten Nekrotisierung und Isolierung infizierter Bereiche. Gewebespezifität spielt für die hier lokalisierte QTL-Effekte möglicherweise keine Rolle.

Die LOD-Werte für die einzeln erfassten Resistenzeigenschaften von Beere, Blatt sowie der abwehrbezogenen Nekrosenformation erreichen ähnliches Niveau (meist um LOD 15-20, Spitzenwert LOD 28) bei weitgehend analogem Kurvenverlauf für  $Plv^R$  Beere –  $Plv^R$  Blatt und  $Plv^R$  Beere – Nekrosenformation, bzw. parallelem Verlauf für  $Plv^R$  Blatt - Nekrosenformation.

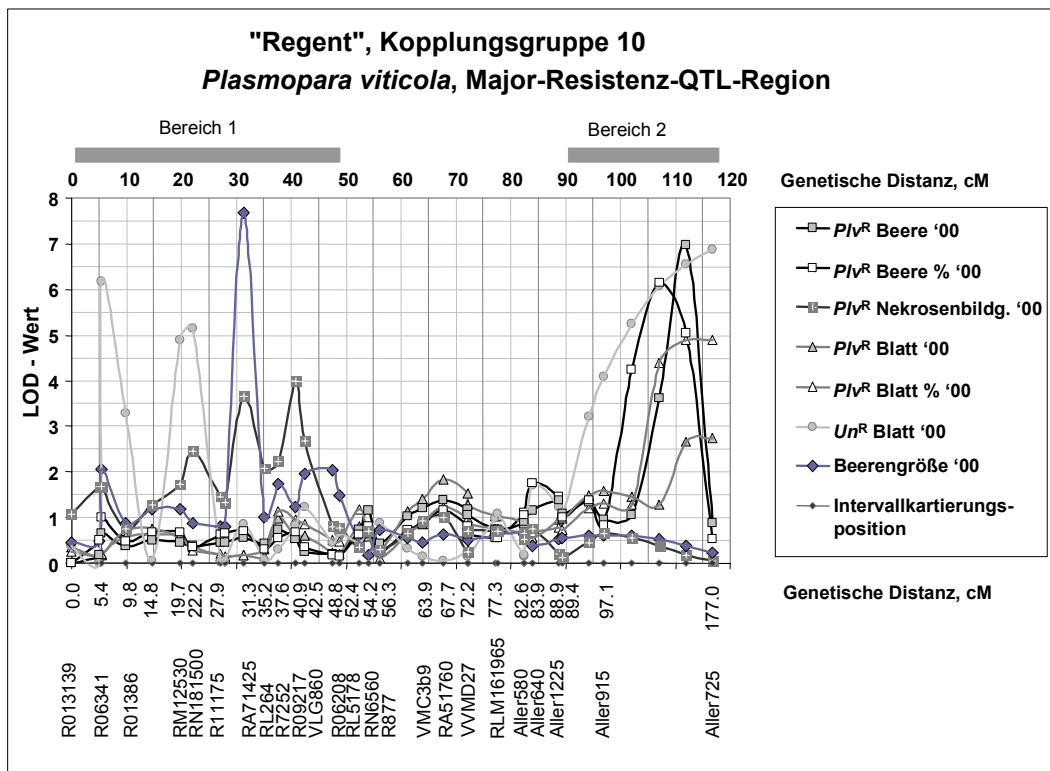
Die zentral im QTL-Maximum gelegenen AFLP-Marker R9.167, R017.250, RL17.367 und RL14.100 wurden für Untersuchungen auf DNA-Ebene ausgewählt, führten bei R017.250 bis zur Sequenzcharakterisierung sowie im Fall von RL17.367 schließlich zur Identifizierung einer putativen Gensequenz (vgl. Abschnitt. 4.12).

■ **‘Regent‘- Kopplungsgruppe R10: Major QTL für Resistenz gegen *Plasmopara viticola* und QTL für *Uncinula necator*-Resistenz des Blattes**

In dieser Kopplungsgruppe treten zwei distinkte QTL-Bereiche durch signifikante LOD-Werte hervor (vgl. Abb. 4.13). Deutliche Maxima für die *Plasmopara*-Resistenz an Blatt und Beere sowie die *Uncinula*-Resistenz am Blatt mit sehr ähnlichen LOD-Werten um 6 colokalisieren in Bereich 2, der durch Major Allergen-CAPS-Marker charakterisiert ist (90 bis 117 cM).

Im Bereich 1 (0 bis 45 cM) überlagern sich Effekte der *Uncinula*-Resistenz des Blatts in den Regionen der Marker R06341 und RN181500 mit lokalen Maxima für die Nekrosenformation.





**Abbildung 4.13 Major QTL-Region von ‘Regent‘ R10 für Resistenz gegen *Plasmopara viticola* als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.**

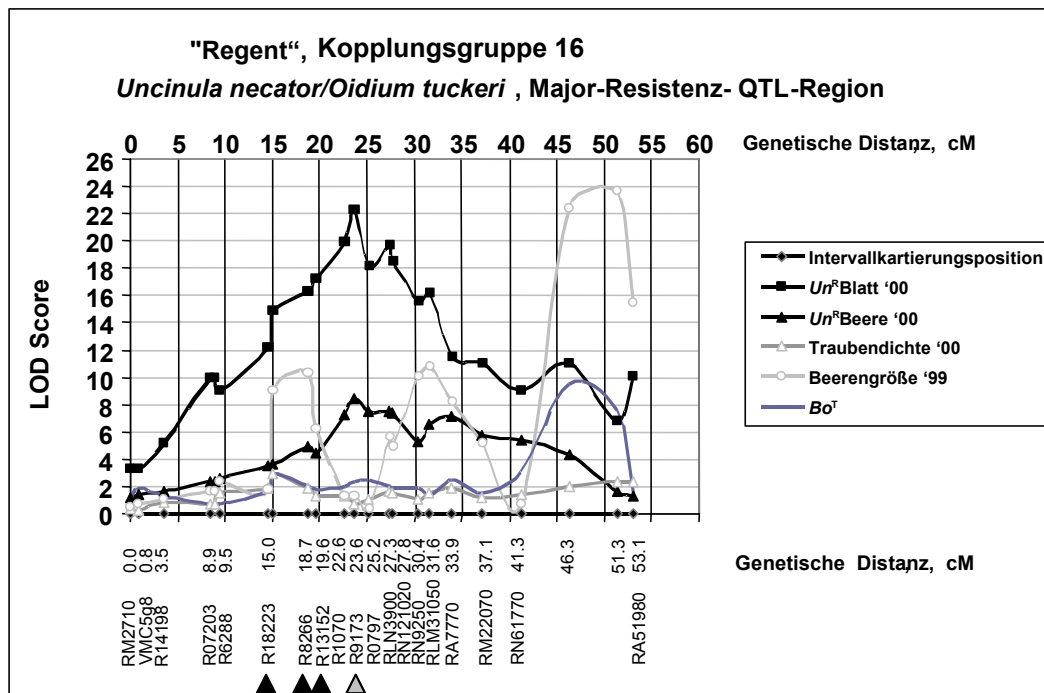
Gezeigt sind Werte des Jahres 2000. Effekte der *Uncinula necator*-Resistenz und der Beerengröße dieser Kopplungsgruppe sind ergänzt, denn sie überlappen mit den Major QTL der Plasmopararesistenz ( $Plv^R$ )

Auf Kopplungsgruppe R10 – anders als auf Gruppe R9 – steht der QTL für die Nekrosenformation in keinem unmittelbar erkennbaren Zusammenhang mit dem Profil der *Plasmopara*-Resistenz am Blatt. Ein weiteres Maximum für Nekrosenformation liegt im Bereich eines konsistenten Beerengröße-QTL bei Marker RA71425.

Durch MAPMAKER/EXP3.0 konnten dieser Gruppe zudem drei CAPS-Marker für Grape ripening related protein (Marker Gr3860, Gr38102 und Gr38750) in enger Kopplung zueinander zugeordnet werden.

■ **‘Regent‘-Kopplungsgruppe R16: Major-QTL für Resistenz gegen *Uncinula necator/Oidium tuckeri* ( $Un^R$ ); „*Uncinula*-Gruppe“**

Die für die Resistenz gegen den Echten Mehltau in der Population als wesentlich erachtete Region erstreckt sich fast über die gesamte Gruppe R16; Dabei ergeben sich fast durchweg Werte über LOD 10 im Fall der Beere. Das Profil der *Uncinula*-Resistenz am Blatt nimmt einen entsprechenden Verlauf mit etwas niedrigeren LOD-Scores (vgl. Abb. 4.14).



**Abbildung 4.14 Major QTL-Region von 'Regent' R16 für Resistenz gegen *Uncinula necator/ Oidium tuckeri* als LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.**

Erklärungen zur Darstellungsweise analog zu Abb. 4.14. Überinandergelagerte Profile zeigen Markerkorrelationen zu *Uncinula*-Resistenz ( $Un^R$ ) an Blatt und Beere sowie zur *Botrytis*-Toleranz ( $Bo^T$ ) der Beere, ergänzend sind die Merkmale „Traubendichte“ und „durchschnittliche Beerengröße“ dargestellt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Markerfragmente wurden isoliert (grau und schwarz) und nach Sequenzierung analysiert (schwarz).

Der Abschnitt von Marker RN61770 bis RA51980 scheint für die *Uncinula*-Resistenz der Beere keine Rolle zu spielen. Am Blatt werden in diesem Intervall Werte um LOD 11 in Überlappung mit lokalen Maxima für „Beerengröße“ (bis LOD 24) und „*Botrytis*-Toleranz der Beere“ (bis LOD 10) erreicht. Es handelt sich hierbei um den stärksten konsistenten Grauschimmel-Toleranzeffekt, der insgesamt zu beobachten war.

Zwischen den Markern R8.266 bis R9.173 sowie RLN3900 bis RLM31050 und RM22070 bis RA51980 erscheint das Merkmal „Beerengröße“ negativ mit dem Kurvenverlauf für „*Uncinula*-Resistenz der Beere“ zu korrelieren.

Die beschriebene Major-QTL-Region mit putativer Relevanz für Resistenz gegen *Uncinula necator/Oidium tuckeri* erklärt bis zu 42% der Varianz für  $Un^R$  (Beere) und 49% von  $Un^R$  (Blatt) an der Position des Markerlocus R9.173, die Marker RLN3900 und RN121020 stehen für bis zu 65% der Varianz am Blatt.

Der genetische Effekt erhöhter *Botrytis*-Toleranz ( $Bo^T$ ) auf der selben Kopplungsgruppe ist verantwortlich für bis zu 80% der Varianz bezüglich des Merkmals an diesem Genort.

#### 4.4.2.2 Multiple Resistenzregionen

Einige leichtere Manifestationen der Resistenz gegen beide biotrophen Schaderreger, *Uncinula necator* und *Plasmopara viticola*, teilweise auch in Kombination mit *Botrytis*-Toleranz, sind auf identischen Kopplungsgruppen vereint (z.B. 'Regent'-Gruppe R19: Resistenz der Beere; 'Regent'-Gruppe R18: Resistenz an Blatt und Beere). Kongruente Resistenzeffekte gegen *Plasmopara* und *Uncinula* zeigen sich außerdem in Korrelation zum Locus der Major-Allergen-CAPS-Marker der Kopplungsgruppe R10.

#### 4.4.2.4 QTL zu Reife und Ertragsfaktoren

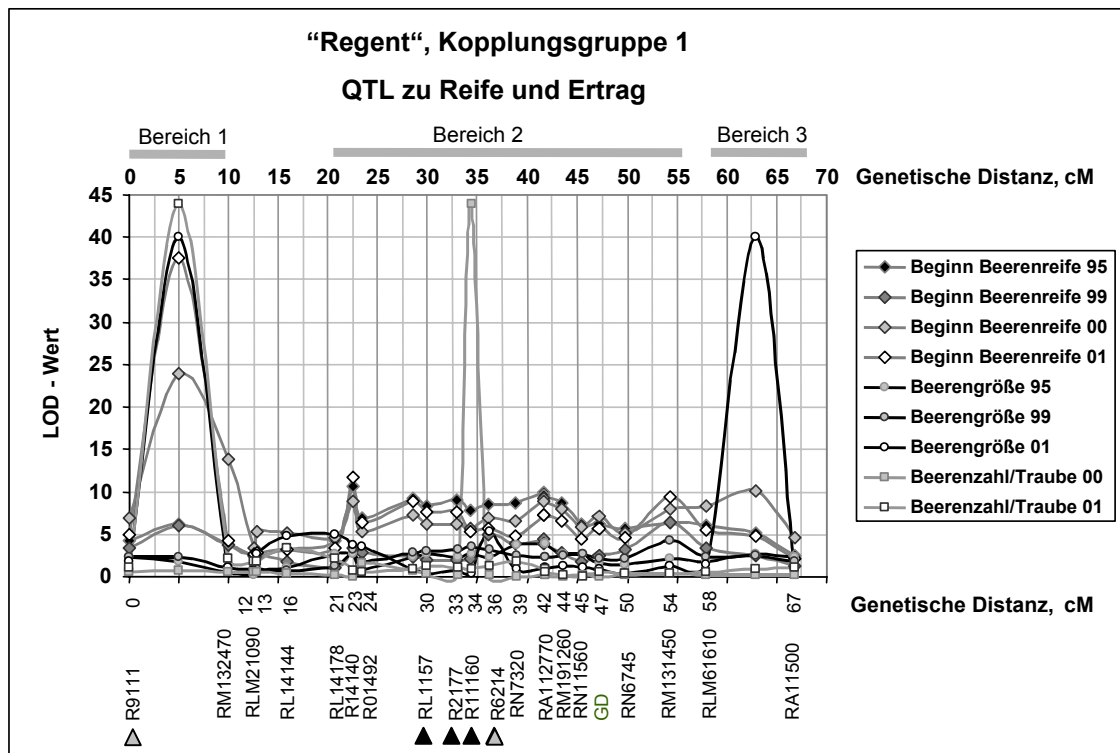
Korrelationen zwischen kartierten Genomabschnitten und dem Eintreten der Beerenreife in der Population zeigen sich auf sieben Kopplungsgruppen der Sorte 'Regent', die selbst als relativ früh reifender Kultivar charakterisiert ist.

Als Major-QTL bewertete Effekte für Beerenreife mit vollständiger Konsistenz in allen vier Erfassungsjahren liegen auf den drei Kopplungsgruppen R1, R6 und R11, die nun zunächst betrachtet werden.

#### ■ 'Regent'-Kopplungsgruppe R1: „Beerengröße“ und „Beerenzahl pro Traube“

Die Maxima für die Ertragsparameter „Beerengröße“ und „Beerenzahl pro Traube“ in den Randsegmenten der Gruppe 1 entsprechen in drei von vier Erfassungsjahren in ihrer Lage den stabilen Peaks für „Beginn der Beerenreife“.

Fünf „Dreher“ der Markerabfolge im Bereich der stärksten QTL treten in dieser Gruppe auf und geben dem „zerklüfteten“ Verlauf des QTL-Profiles, nicht jedoch der Signifikanz als solcher, vorläufigen Charakter (vgl. Abb. 4.15).



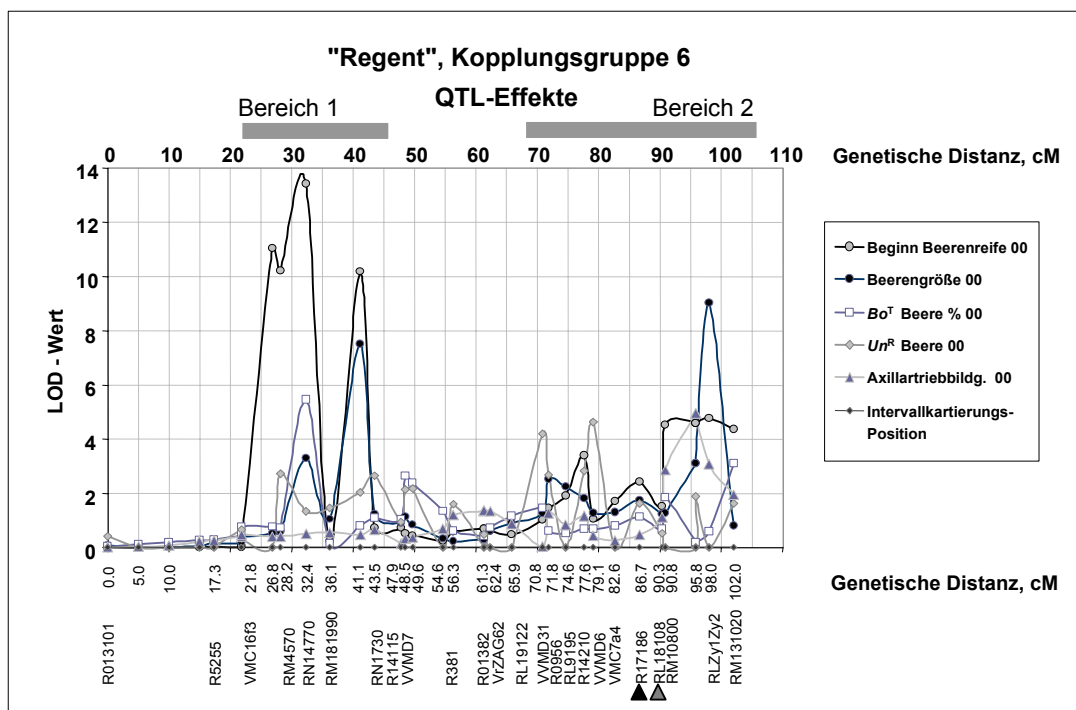
**Abbildung 4.15 Major QTL-Region von 'Regent' R1 für Faktoren, die Reife und Ertrag beeinflussen könnten, dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.**

Gezeigt sind aussagefähige Werte aus verfügbaren Boniturjahren. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Markerfragmente wurden isoliert (grau und schwarz) und nach Sequenzierung annotiert (schwarz).

Anhand der Daten aus dem klimatisch auffälligen Jahr 1999 waren für die Merkmale „Beerengröße“ und „Beerenzahl pro Traube“ keinerlei QTL zu ermitteln. Vergleicht man die übrigen Erfassungsjahre, so zeichnen sich bei den genannten Ertragsparametern - ähnlich wie bei „Beginn der Beerenreife“ - deutliche Schwankungen für die Rolle der genetischen Komponente mit stark unterschiedlichen LOD-Scores ab. Die Merkmale „Beerenzahl pro Traube“ und „Beerengröße“ scheinen auf dieser Gruppe besonders stark durch Umweltfaktoren beeinflusst und sogar überlagert zu werden.

■ **‘Regent’-Kopplungsgruppe R6: Eigenschaften der Beere und Axillartrieb-  
bildung**

Bereich 1 zeigt in teilweiser Überlappung Maxima für „Beerengröße“, „Beerenzahl pro Traube“ und, am auffälligsten ausgeprägt, für „Beginn der Beerenreife“. In Bereich 2 liegen lokale Maxima für *Uncinula*-Resistenz der Beere mit zwei SSR-Markern an den Scheitelpunkten. Auf diesen Abschnitt entfällt auch ein schwächerer Beerengröße-Peak. Bereich 3 weist ein LOD 5-Plateau für „Beginn der Beerenreife“ sowie lokale Maxima für „Beerengröße“ und „Axillartrieb-  
bildung“ auf. In Bereich 1 verlaufen die Profile für „*Botrytis*-Toleranz der Beere“ und „Beerengröße“ gleichsinnig, in Bereich 3 sind die Kurven jedoch gegenläufig (vgl. Abb. 4.16).



**Abbildung 4.16: QTL-Effekte der Kopplungsgruppe R6 dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.**

Die mit Pfeilen gekennzeichneten Markerfragmente wurden isoliert (grau und schwarz) und nach Sequenzierung analysiert (schwarz).

Die QTL-Effekte dieser Kopplungsgruppe sind durch einen „Zickzackverlauf“ der Profile charakterisiert, denn einzelne Marker rufen durch fehlende oder negative Korrelation mit den evaluierten Merkmalen diskrete Einschnitte in den Kurven hervor. Beispiele sind der Einbruch des „Beerenreife“-QTL bei RM181990 und der Einschnitt des „*Uncinula necator*“-Resistenz-QTL bei Marker RL9.194. Erklärbar ist der Profilverlauf evtl. dadurch, dass die auf dieser Gruppe versammelten Marker ähnlich wie

bei Gruppe R1 möglicherweise noch nicht in ihrer tatsächlichen Reihenfolge positioniert sind. Dazu passt das Auftreten von insgesamt zehn „Drehern“ in der Markeranordnung (acht bezogen auf ‘Regent’) im Vergleich der verschiedenen Kartenvarianten. Mit Rearrangements auf dieser Gruppe ist also noch zu rechnen.

■ **‘Regent’- Kopplungsgruppe R11: Effekte zu Reife und Ertrag**

Auf dieser Kopplungsgruppe liegen Eigenschaften, die die Beschaffenheit der Beere charakterisieren und die zum Teil überlappen.

Zwischen den Markern RM12150 und VR2 bilden die QTL-Korrelationen im Kurvenverlauf ein Plateau aus, das auch die Lage eines der drei Major QTL für „Beginn der Beerenreife“ kennzeichnet (vgl. Abb. 4.17).

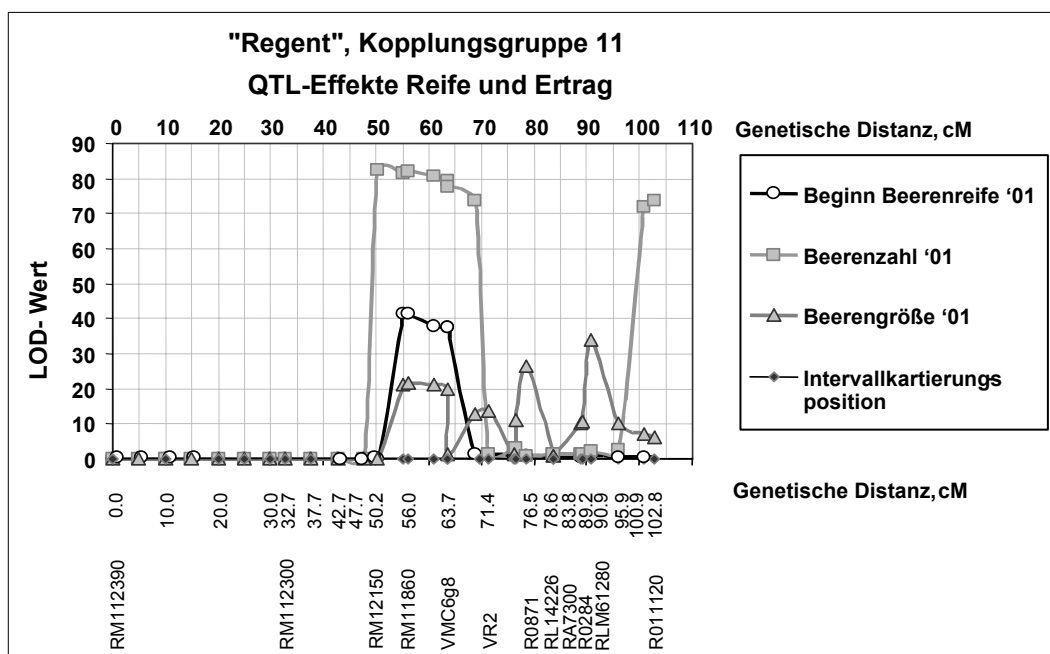


Abbildung 4.17: QTL der ‘Regent’-Kopplungsgruppe R11 dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.

Die Merkmale „Beerenzahl“ und „Beerengröße“ colocalisieren im Bereich eines Major-QTL für „Beginn der Beerenreife“.

■ **‘Regent’-Kopplungsgruppe R3: Eigenschaften der Beere und Axillartrieb- bildung**

Ein Major-QTL für Axillartrieb- bildung auf dieser Kopplungsgruppe mit zwei abgegrenzten Maxima und einem durch vier AFLP-Marker definierten Plateau auf hohem Niveau (LOD 58) konnte auf dieser Kopplungsgruppe identifiziert werden (Bereich 2).

Auf diesen Kopplungsgruppenabschnitt entfallen noch weitere Effekte, die alle die Beere betreffen (*Plasmopara viticola*-Resistenz und *Botrytis cinerea*-Toleranz, Beerengröße sowie Traubendichte.) Die LOD-Maximum-Werte des Merkmals „Traubendichte“ schwanken in den vier Erfassungsjahren allerdings stark zwischen sehr niedrigen und hohen Werten (ca. LOD 2 bis 15).

An der ca. 30 cM entfernten Position des „Plasmaintinsischen Faktors“ (Bereich 1) ergeben sich Korrelationen zu *Plasmopara viticola*- und *Uncinula necator*-Resistenz am Blatt sowie zur *Botrytis cinerea*-Toleranz der Beere. In Bereich 3 zeigen sich lediglich leichte Korrelation von zwei Markern zu *Uncinula necator*-Resistenz der Beere (vgl. Abb. 4.18).

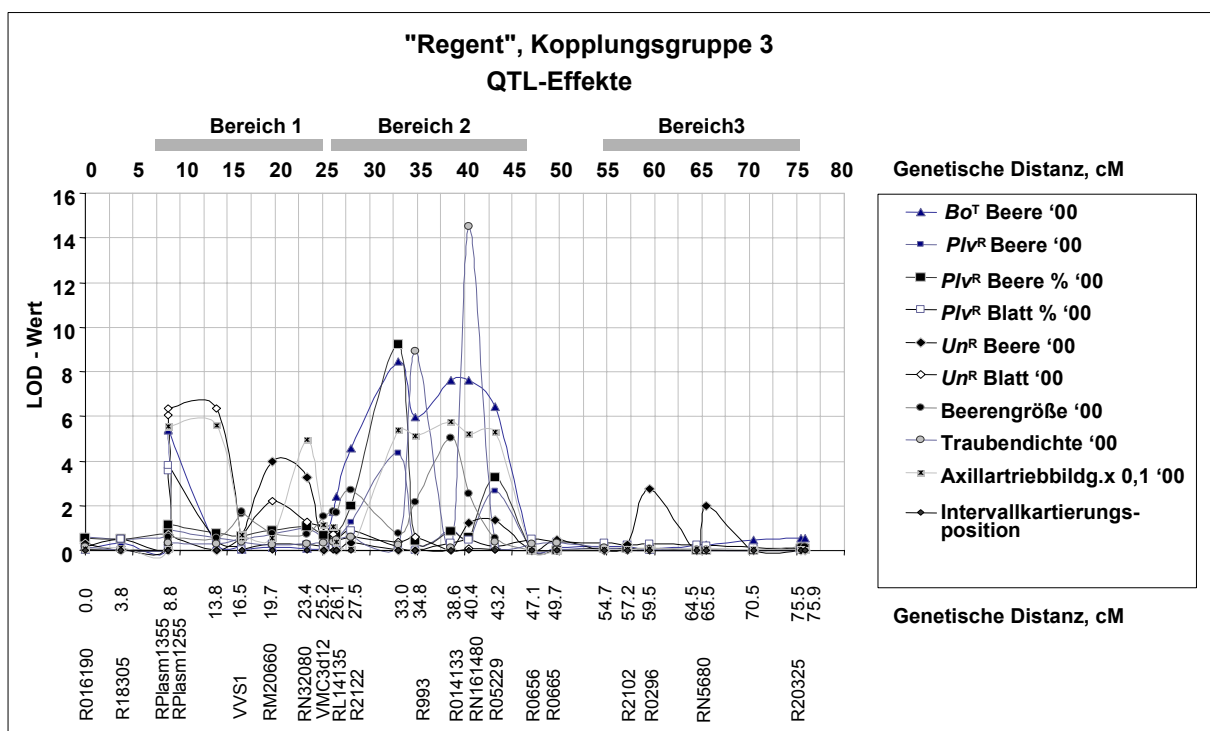


Abbildung 4.18: QTL der ‘Regent‘-Kopplungsgruppe R3, dargestellt als kontinuierliches LOD-Score-Profil aus der QTL-Intervallkartierung.

Auf dieser Kopplungsgruppe findet man Korrelationen zur schaderegerübergreifenden Resistenzausprägung sowie Merkmale, die die Architektur der Pflanze mitbestimmen. Drei Bereiche (durch Balken markiert) lassen sich grob gegeneinander abgrenzen. Abkürzungen:  $Bo^T$  – *Botrytis*-Toleranz;  $Plv^R$  – *Plasmopara viticola*-Resistenz ;  $Un^R$  – *Uncinula necator*-Resistenz

#### 4.5 Isolierung und Bearbeitung von AFLP-Markerbanden aus QTL-Bereichen

Ausgewählte polymorphe Markerfragmente in Assoziation mit QTL-Maxima für Resistenz oder Reife wurden über ein Polyacrylamidgel und Elution gewonnen (vgl. hierzu exemplarisch Abb. 4.19). Nach einer PCR zur Anreicherung wurde der Einzelbandencharakter des über QIAquick PCR Purification Kit Spin columns (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigten Amplifikats nochmals über Agarosegelelektrophorese überprüft und gleichzeitig eine Abschätzung der Fragmentkonzentration vorgenommen (vgl. hierzu exemplarisch Abb. 4.21 A). Ein Aliquot des Ansatzes wurde dann für die Sequenzanalyse eingesetzt.

Für einige der potentiell interessanten Fragmente erwies sich die weitere Bearbeitung durch Schwierigkeiten bei der eindeutigen Identifizierung auf den 5 - 8%igen PAA-Gelen als zeitaufwendig und wurde daher im begrenzten Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt. So beispielsweise, wenn

- ◆ kleine Fragmente von ca. 100 bp im Gel in einem „Schmier“- Bereich hoher Fragmentdichte und schlechter Auftrennung lagen (z.B. R9.111, RL14.100 und RL18.108) und nicht sauber voneinander zu trennen waren;
- ◆ die Reamplifikation ohne Erfolg verlief (R6.214), bzw. mehrere Banden auftraten (R9.167 und R9.173).

Die Vorgehensweise von der Bandenelution über die Direktsequenzierung bis zu weiterführenden Untersuchungen ist am Beispiel des Fragments AFLP R8.266 (einem Marker mit Korrelation zu *Uncinula necator*-Resistenz) in Abschnitt 4.8 geschildert.

#### 4.6 Sequenzierung isolierter AFLP-Fragmente

Nach Cycle-Sequencing und Sequenzanalyse über das Kapillarelektrophoresegerät ABI Prism GA 3100 wurden die erhaltenen AFLP-Markersequenzen manuell editiert.

Auswertbare Sequenzreaktionen wurden für die in Tab. 4-7 dargestellten neun Fragmente erhalten.

Im Fall der Fragmente R8.266, R017.250 sowie R17.186 wurden stichprobenhaft Banden von zwei verschiedenen Individuen der Kreuzungspopulation (solche mit einem klaren Fingerprintmuster im Bereich des Zielfragments) isoliert und sequenziert. Die verglichenen Sequenzen stimmten im Fall von R8.266 (2 nt bzw. 0,9% Abweichung) und R017.250 (3 nt bzw. 1,4% Abweichung) gut überein; im Fall von R17.186 zeigte sich im Abgleich ein Sequenzunterschied von 12% bzw. 18 nt (vgl. Anhang I).



TABELLE 4-7

**Ergebnis der Direktsequenzierung QTL-korrelierter AFLPs im Überblick.**

Dargestellt sind Resultate für die Fragmente, die nach Elution als Einzelbande reamplifiziert werden konnten und ein gut auswertbares Sequenzierergebnis erbrachten.

AFLP-Fragment	Ursprungslänge (bp)	lesbarer Bereich (bp)
R1.157	157	142
R2.177	177	158
R8.266	266	221
R11.160	160	136
R13.152	152	144
R17.186	186	163
R017.250	250	216
RL17.367	367	307
RL18.223	223	207

Die bereinigten Markersequenzen wurden mit den BLAST-Analysetools sowie mit den Programmen MEME und NSITE untersucht (Darstellung der erhaltenen Sequenzen nach NSITE-Analyse mit Annotierung: s. Anhang II).

**4.7 Datenbankrecherchen mit Sequenzen isolierter AFLP-Fragmente in BLAST**

Zunächst wurden die Sequenzen der isolierten AFLP-Fragmente mit BLASTN (Datenbankabgleich auf Nukleotidebene) und BLASTX (Datenbankabgleich mit Proteindatenbanken wie SwissProt) analysiert.

Beide Algorithmen sind als Software-Tools über das Internet von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) frei verfügbar. Die Ergebnisse sind mit je einem gezeigten Verweis in Tab. 4-8 und 4-9 dargestellt.

Die erhaltenen E-Werte waren, eventuell mit Ausnahme des Resultats für Fragment R8.266 (vgl. Abschn. 4.8.2), nicht signifikant, um an diesem Punkt der Untersuchungen Aussagen über die Bedeutungen der Sequenzen zu machen.

**TABELLE 4-8 AFLP-Fragmentanalyse: Ergebnisse mit BLASTN 2.2.1**

AFLP R8.266

>gi|3283025|gb|AF051562.1|AF051562 *A. thaliana* transposon Tag1 putative transposase mRNA  
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.042 Identities = 31/34 (91%)

AFLP R2.177

>gi|11691704|emb|AL138707.10|AL138707 Human sequence from clone RP11-430M15 on chromosome 13. Contains the 3' end of the gene for a novel protein (ortholog of rat four repeat ion channel)  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.45 Identities = 20/20 (100%)

AFLP R18.233

>gi|9587171|gb|AF265664.1|AF265664 genomic sequence from *Solanum tuberosum* resistance gene cluster, Score = 36.2 bits (18), Expect = 9.6 Identities = 18/18 (100%)

AFLP RL17.367

>gi|8247260|emb|AL121935.17|HSBA517H2 human DNA sequence from CCR6 (chemokine (Coiled coil motif) receptor 6) gene region Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.24 Identities = 21/21 (100%)

AFLP RL1.157

>gi|12698735|gb|AF325499.1|AF325499 *Capra hircus* stearyl-CoA desaturase mRNA  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.40 Identities = 20/20 (100%)

AFLP R17.186

>gi|5823985|emb|AL078588.9|HSDJ784K2 Human DNA sequence from clone RP4-784K2 on chromosome 20. Contains an STS and GSSs, complete sequence [*Homo sapiens*]  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.47 Identities = 20/20 (100%)

AFLP11.160

>gi|12597146|emb|AL512782.6|AL512782 Human DNA sequence from clone RP11-464I4 on chromosome 13, complete sequence [*Homo sapiens*] Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.025 Identities = 22/22 (100%)

AFLP R017.250 keine Treffer unter Expect = 2

AFLP R13.152 keine Treffer unter Expect >1,5

**TABELLE 4-9 AFLP-Fragmentanalyse: Ergebnisse mit BLASTX 2.2.1**

AFLP R8.266

>gi|3283026|gb|AAC25101.1| (AF051562) putative transposase [*A. thaliana*] Score = 73.2 bits (178), Expect = 6e-13 Identities = 33/70 (47%), Positives = 46/70 (65%)

AFLP R17.186

>gi|13430822|gb|AAK26033.1|AF360323\_1 (AF360323) unknown protein [*Arabidopsis thaliana*]  
Length = 181, Score = 49.7 bits (117), Expect = 7e-06 Identities = 22/32 (68%), Positives = 27/32 (83%)

AFLP RL17.367

>gi|6180101|gb|AAF05798.1|AF193903\_21 NADH dehydrogenase subunit 2 [*Cafeteria roenbergensis*]  
Length = 805 Score = 33.9 bits (76), Expect = 0.32 Identities = 26/85 (30%), Positives = 42/85 (48%), Gaps = 11/85 (12%)

AFLP R017.250

>gi|12957712|gb|AAK09230.1|AC084320\_17 (AC084320) putative copia-like retrotransposon Hopscotch gag-pol polyprotein [*Oryza sativa*] Length = 1219 Score = 53.1 bits (126), Expect = 6e-07 Identities = 30/70 (42%), Positives = 40/70 (56%), Gaps = 1/70 (1%)

Keine Ergebnisse unter Expect = 1.0 für die restlichen analysierten AFLP-Sequenzen

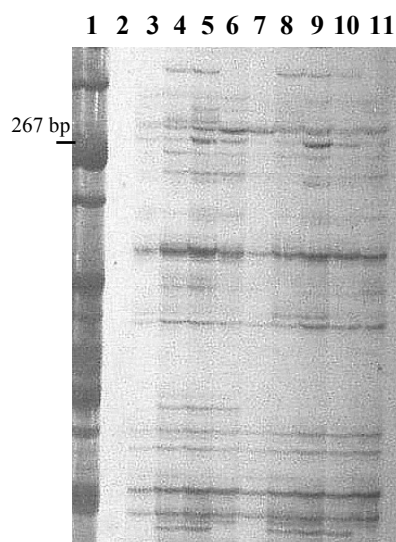
## 4.8 Exemplarische Darstellung der AFLP-Fragmentanalyse am Beispiel des Markers R8.266

Das BLASTX-Ergebnis für AFLP R8.266 (streckenweise Tag1-Transposase-Homologie) wurde als Basis für Hybridisierungsuntersuchungen mit diesem Markerfragment herangezogen. Dabei sollte in erster Linie untersucht werden, ob die Markersequenz bzw. Signatur dieses Transposons im Genom von ‘Lemberger‘ generell fehlt.

### 4.8.1 Isolierung des Fragments R8.266

Dieses Fragment tritt bei ‘Regent‘-Kopplungsgruppe R16 (IGGP15) auf. Es liegt an der Basis des Major-QTL mit Relevanz für *Uncinula necator*-Resistenz an Blatt und Beere sowie einem überlappenden QTL für „Beerengröße“ (vgl. Abb. 4.13). Die beiden AFLP-Nachbarmarker R18.233, 4 cM entfernt, und R13.152, 3 cM entfernt, wurden ebenfalls isoliert und charakterisiert.

Abb. 4.19 zeigt die Region eines silbergefärbten Polyacrylamidgels, aus der Fragmente des Markers R8.266 von ‘Regent‘ (Spur 3), von Zuchtstamm 91-011-0103 (Spur 5) sowie Zuchtstamm 91-011-0303 (Spur 9) der Kreuzungspopulation ausgeschnitten, anschließend eluiert und mit Ethanol gefällt wurden.



**Abbildung 4.19** Auftrennung von PCR-Ansätzen ausgewählter Individuen der Kreuzungspopulation mit dem Primerpaar K8 über ein 6% -iges Polyacrylamidgel.

Der Pfeil markiert Fragment R8.266.

Gelspuren:

1: Größenstandard („Lambda-DNA x *TaqI* u. *HaeIII*“)

2: leere Spur

3: ‘Regent‘

4, 5, 6, 8, 9, 10, 11: Individuen der Kreuzungspopulation, die das Fragment im Fingerprint der Kapillarelektrophorese in guter Intensität gezeigt hatten.

7: Individuum der Kreuzungspopulation, das das Fragment nicht aufwies.

### 4.8.2 Direktsequenzierung des amplifizierten Isolats und Analyse mittels BLAST

Nach der Cycle-Sequencing-Reaktion mit anschließender Datenerfassung über das Kapillarelektrophoresegerät ABI Prism GA 3100 und nach manuellem Editieren wurde die Sequenz des Zuchtstamms 91-011-0303 mit den Software-Tools BLASTN auf Nukleotidebene und BLASTX auf Proteinebene untersucht.

Über BLASTN zeigten sich leichte Homologien zu einer Transposase, wie sie typischerweise in Retrotransposon-mRNA des Typs Tag1 (z.B. in *Arabidopsis thaliana*) vorkommt. Dieses Ergebnis bestätigte sich nach einer TBLASTX-Analyse auf Proteinebene mit einem Wert  $E = 3e-15$  (vgl. Abb. 4.20).

```

> putative transposase [Arabidopsis thaliana] Length = 729
Score = 73.2 bits (178), Expect = 6e-13 Identities = 33/70 (47%), Positives = 46/70 (65%)
Frame = +2

Query: 2 DP AWEHVSKERYANGRKTLICLYCKKITKGGGIHRMKQHLAGVKGDIGPCKSISLDVRFMRMENS LQEFVN 211
           D AW +V + + G+ L C +C K +GGGI+RMK HLAGVKG+ C IS D+RF++ N+L+E N
Sbjct: 24 DIAW SYVIQSKDEKGTVLECAFCHKKKRGGGINRMKHHLAGVKGNTDA CLKISADIRFKIVNALKEAEN 93
           1

Query: 2 DP AWEHVSKERYANGRKTLICLYCKKITKGGGIHRMKQHLAGVKGDIGPCKSISLDVRFMRMENS L 196
           D AW+H +Y + R + CLYC+K+ KGGGI R+K+HLAG KG C + +VR ++ +
Sbjct: 16 DSAWKHCEVYKYGD-RVQMRCLYCRKMFKGGGITRVKEHLAGKKGQGTICDQVPDEVRLFLQOCI 79
           2

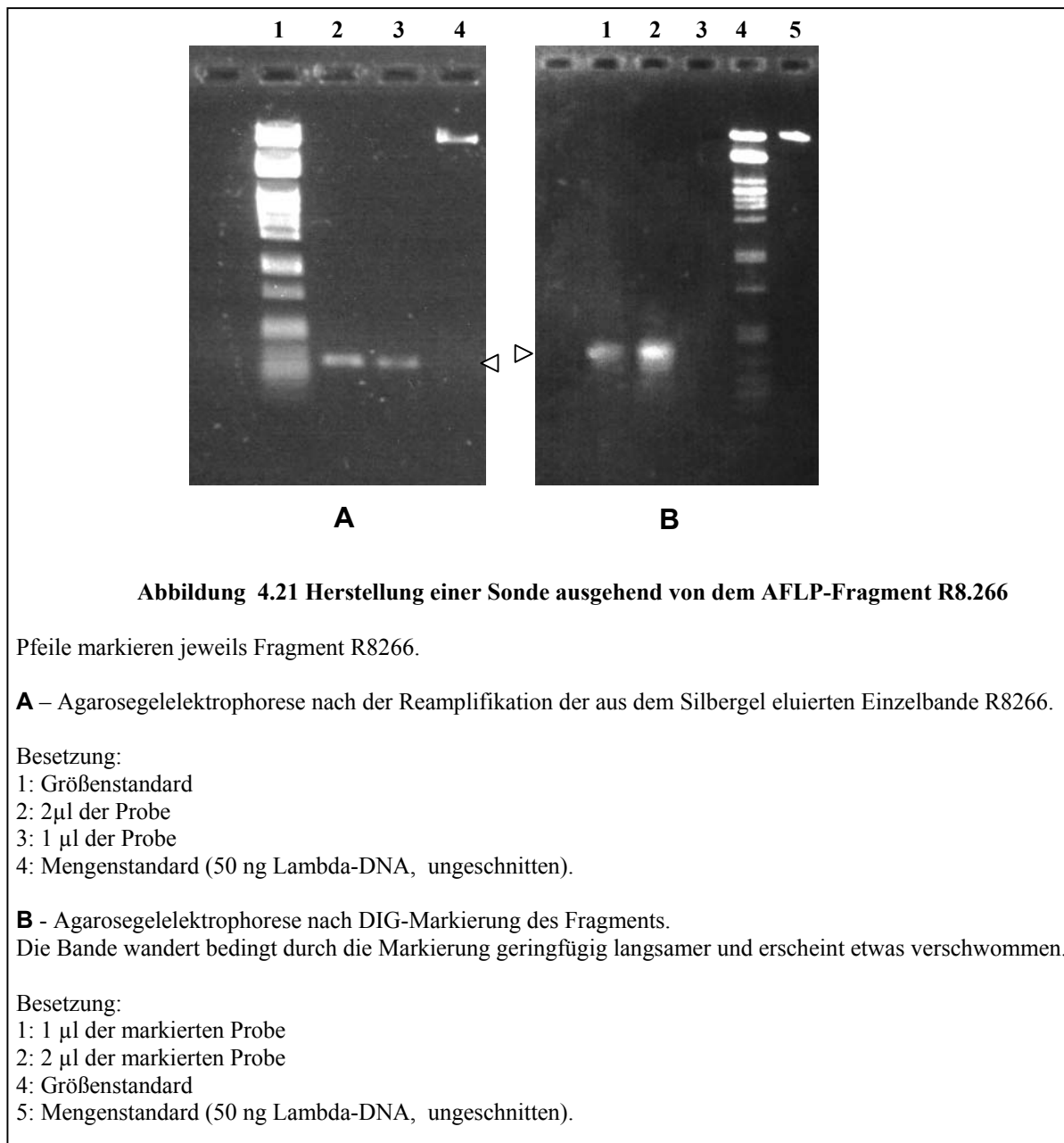
> transposase-like protein [Arabidopsis thaliana] Length = 761
Score = 57.4 bits (137), Expect = 3e-08 Identities = 27/65 (41%), Positives = 40/65 (61%)
Frame = +2
    
```

**Abbildung 4.20 Ergebnis der Analyse des AFLP-Fragments R8.266 in BLASTX.**

Zwei Datenbankhomologien zu einer Transposase des Typs Tag1 wurden gefunden (repräsentiert als Sbjct1 und Sbjct2). Die Formatierungen der Abbildung wurden dem BLAST-Ausgabeformat zur Hervorhebung konservierter Bereiche hinzugefügt. Graue Kästchen und rote Schrift: konservierte Aminosäuren, grüne Schrift: zwischen Treffer „Sbjct1“ und Suchsequenz konservierte Aminosäuren, blaue Schrift zwischen Treffer „Sbjct2“ und der Suchsequenz konservierte Aminosäuren; wobei „Sbjct1“ oberhalb des Alignments, „Sbjct2“ darunter durch Wiedergabe der Datenbankeinträge näher definiert ist.

### 4.8.3 Herstellung einer Sonde aus AFLP R8.266 für die Southern Blot Analyse

Eine PCR-Reaktion zur Herstellung DIG-markierter Zielfragmente wurde gemäß Anleitung des DIG-Labeling-Kit-Handbuchs des Herstellers (Boehringer/Roche, Mannheim) durchgeführt. Als Template wurde eine reamplifizierte aufgereinigte Einzelbandenprobe des Zuchtstammes 91-011-0303 verwendet. Die Konzentration des markierten Amplifikats konnte über ein Agarosegel auf 20-30 ng/μl bestimmt werden (s. Abb. 4.21).



Mit dieser Sonde für AFLP R8.266 wurden anschließend Hybridisierungsexperimente (ein Dot Blot und ein genomischer Southern Blot) durchgeführt.

#### 4.8.4 Dot Blot mit der Sonde AFLP R8.266

Für den Dot Blot wurden neben ‘Lemberger‘ und ‘Regent’ Rebsorten aus dem Stammbaum von ‘Regent’ als dem Ursprungselter des Sonden-Fragments ausgewählt. ‘Morio Muskat‘ (mit keiner der Elternsorten verwandt, pilzsensitiv) wurde zum Vergleich analysiert (vgl. Abb. 4.22).

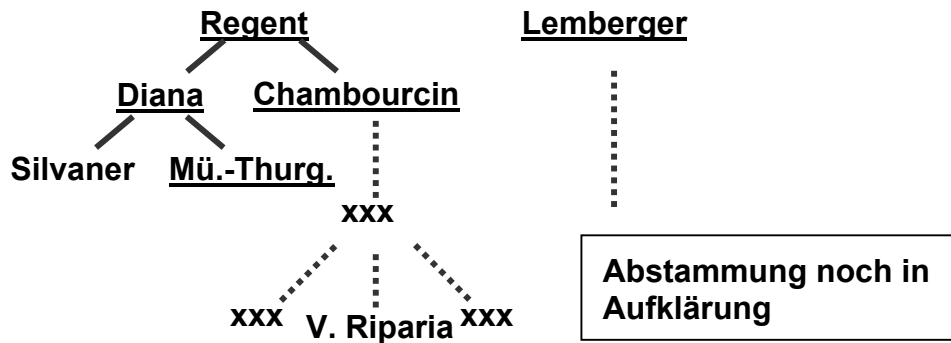


Abbildung 4.22 Schematischer Stammbaum von ‘Regent’.

Die in der Stammbaumskizze unterstrichenen Sorten ‘Diana’, ‘Chambourcin’, ‘Müller-Thurgau’ sowie ‘Lemberger’ wurden bezüglich des Markerfragments R8.266 untersucht. XXX symbolisiert Sorten aus dem komplexen genetischen Hintergrund, darunter Genotypen sieben resistenter amerikanischer Wildarten wie *V. riparia*). Über die Abstammung von ‘Lemberger’ sind zum Stand der Dissertation noch keine detaillierten Fakten bekannt (JUNG, pers. Mitt.).

Der Dot Blot (s. Abb. 4.23) hat ergeben, dass die Sequenz der Fragments AFLP R8.266 in den Genomen von ‘Regent’, ‘Lemberger’, ‘Diana’, ‘Chambourcin’ und möglicherweise auch ‘Müller-Thurgau’ vorkommt.

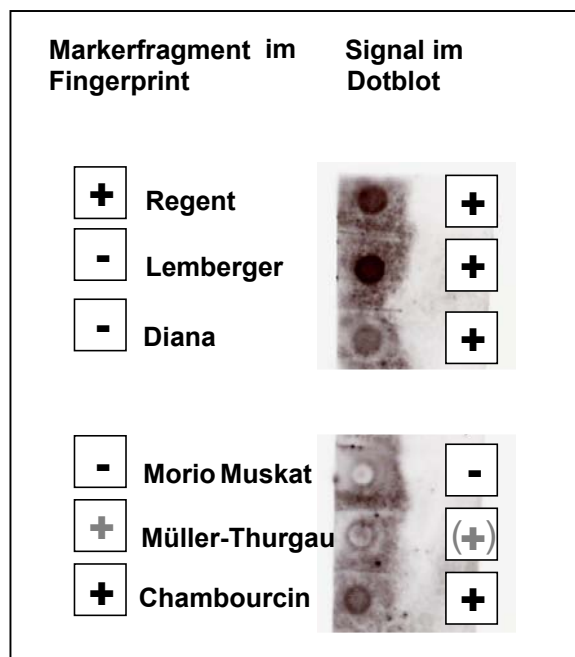


Abbildung 4.23 Dot Blot mit einer Sonde aus Marker R8.266 im Vergleich mit der Erfassung des Markers als AFLP-Bande.

Ein positives/vorhandenes Signal ist jeweils durch ein Kreuz angezeigt.  
 Grau kennzeichnet schwächere Signale, Klammern bezeichnen ein unklares Ergebnis.  
 Die Dot Blot-Membran wurde digital fotografiert.

Ein Vergleich der Dot Blot-Signale mit den Fingerprintmustern der untersuchten Sorten bezüglich R8.266 hat gezeigt, dass (a) nur die Vergleichssorte ‘Morio Muskat’ eindeutig

negativ bezüglich der Sequenz im Fingerprint und Dot Blot ist, dass (b) ein Signal bei 'Regent', 'Müller Thurgau' und 'Chambourcin' (Linie der Resistenzträger) in Fingerprint und Dot Blot auftaucht und dass (c) das Signal durchaus im Dot Blot vorhanden sein, im Fingerprint jedoch fehlen kann (etwa durch Polymorphismen im fragmentflankierenden Bereich der Restriktionsenzym-Schnittstellen oder durch Lokalisierung der Sequenz an einem anderen Ort im Genom); dies ist außer bei der Sorte 'Diana' (aus dem Zweig des 'Regent'-Stammbaums, der nicht auf die Wildarten zurückführt) auch bei 'Lemberger' der Fall. Ein genomischer Southern Blot nach Restriktion sollte solche offenen Fragen klären.

#### **4.8.5 Genomischer Southern Blot**

Als Sonde wurden ca. 150 ng des DIG-markierten Fragments AFLP R8.266 eingesetzt. Nach einer Gelelektrophorese wurden jeweils 500 und 1500 ng *EcoRI* – geschnittener genomischer DNA beider Eltern, Zuchtstamm 91-011-0303, aus dem die Sonde entwickelt wurde (Positivkontrolle) und 'Morio Muskat' (Negativkontrolle), nebeneinander geblottet. Das Ergebnis verweist auf ein Einzelbandensignal mit unterschiedlicher Laufstrecke in 'Regent'/91-011-0303 im Vergleich zu 'Lemberger' ('Morio Muskat': kein Signal). Insgesamt bot die wiederholt unzureichende Qualität der Signalintensität des Blots im Verhältnis zum Hintergrund jedoch keine Grundlage für eine gesicherte Aussage. Alternativ zur DIG-Markierung könnte eine künftige radioaktive Sondenmarkierung über eine verbesserte Sensitivität zu einem verlässlichen Resultat führen; dies zu überprüfen war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

#### **4.9 Auswertung der Sequenzen aller isolierten AFLP-Marker mit Programmen zur Motiverkennung**

Um die gewonnene Sequenzinformation trotz geringer Fragmentlängen nutzbar zu machen, wurden die Fragmente mit den Programmen NSITE (zur Identifizierung konservierter Motive, regulatorischer Elemente und Retroelementssignaturen) und MEME (Identifizierung repetitiver Motive) untersucht, um erste Hinweise über die Natur der getroffenen Markersequenzen erhalten.

##### **4.9.1 Transposon- und Retroelementssignaturen**

Tab. 4-10 zeigt die in den Markersequenzen gefundenen Retroelementssignaturen im Überblick.

TABELLE 4-10

Überblick der Ähnlichkeiten zu Retroelementsignaturen in sequenzierten AFLP-Fragmenten

Fragment	Virus-/Retroelementsignatur, (Ursprungsorganismus)	Tool / Datenbankeintrag / Referenz	Umfang u. Orientierung
AFLP RL1.157	<b>Transposable Ocr-Element</b> (jeweils einmal in beiden Strängen; <i>versch. Organismen</i> )	NSITE	16 nt 16 nt revers
	<b>TSCL Retrotransposon</b> (Signatur, <i>versch. Organismen</i> )	TIGR Database, Link über <i>Arabidopsis</i> -Homologie	65 nt
AFLP R2.177	repetitiv, jedoch keine Hinweise auf bekannte Retroelemente		
AFLP R8.266	<b>Tag1-Element</b> (Transposase) ( <i>A. thaliana</i> )	BLASTN	33 nt
	<b>Transposase-like protein</b> ( <i>A. thaliana</i> )	BLASTX	209 nt
	<b>Octamermotiv (Ocr-Element- typisch)</b> ( <i>verschiedene Organismen</i> , <i>regulatorische Introns</i> <i>monokotyle Pflanzen</i> )	NSITE, DONATH et al. (1995), GREEN und TOBIN (1999)	8 nt
AFLP R11.160	<b>Ocr-Element</b> ( <i>verschiedene Organismen</i> )	NSITE GREEN und TOBIN (1999)	17 nt
	<b>LTR mit ADH3-Enhancer- Homologie</b> , ähnlich HIV-1 LTR ( <i>Human</i> )	NSITE	13 nt
AFLP R13.152	<b>Ty2-917-Element</b> (Signatur) ( <i>S. cerevisiae</i> )	NSITE	9 nt
AFLP R17.186	<b>Ty2-917-Element</b> , Proteinase I ( <i>S. cerevisiae</i> );	NSITE	10 nt
	<b>HIV-1-ähnlicher LTR</b> ( <i>Human</i> )	NSITE	13 nt
AFLP R017.250	<b>Hopscotch-Element</b> ( <i>copia</i> -ähnlich, Protease bzw. Reverse Transkriptase) ( <i>Z. mays</i> , <i>O. sativa</i> , <i>A. thaliana</i> )	BLASTX	219 nt
AFLP RL17.367	HIV-1-ähnlicher LTR ( <i>Human</i> )	NSITE	11 nt
AFLP R18.233	<b>Aktivatorsequenz</b> des Octamermotivs/Ocr-Element	NSITE GREEN und TOBIN (1999)	9 nt



#### 4.9.2 Statistische Analyse mit MEME/MAST/BLOCKS zum Auffinden repetitiver Motive

Für die Weinrebe ist im Hinblick auf Transposons nur wenig bekannt. Das Tool MEME wurde aufgrund dessen eingesetzt, um noch nicht beschriebene repetitive Motive, die u.U. typisch für die Rebe sein könnten, in den hier sequenzierten Markerfragmenten zu identifizieren.

Acht Wiederholungsmotive konnten mit MEME ermittelt werden. Sie liegen häufig tandemartig in gleicher (+) oder entgegengesetzter (-) Orientierung im jeweiligen AFLP-Fragment hintereinander, wie das von MEME erstellte Schema (Abb. 4.24) anhand von Motivdiagrammen zeigt. Die statistische Signifikanz leichter Sequenzvarianten sowie eine Konsensus-Sequenz zu jedem Motiv (Abb. 4.25) wurden ebenfalls ermittelt.

```
AFLP R017250: +M1 +M6 +M1 +M3
AFLP RL1157:  +M2 +M2
AFLP R11160:  +M2 +M2
AFLP R17186:  +M8 -M8 -M6 +M2
AFLP R8266:   +M4 +M2 +M2 +M4 +M5
AFLP R13152:  -M4
AFLP RL17367: -M4 -M6
AFLP R2177:   +M7 +M7 +M7 +M7 +M5
```

**Abbildung 4.24** MEME-„Motivdiagramme“ der isolierten und sequenzierten AFLP-Fragmente. Acht Motive wurden gefunden (M1 bis M8). „+“ und „-“ bezeichnen die Orientierung.

Motiv	p-Wert	Multilevel-Konsensus
M1	>1.60e-27	TTTGGGTTGTCTGAAACTCAAACCGGAGTTGCATTATCCTTTCTCTTGAT
M2	>2.10e-15	GAAAACATCTGACTTGATTGTAATGTTAAATTGGTAC
M3	>2.76e-20	CTGGTGTGAGTGAGGAATAGAGCCAAGT
M4	>8.17e-14	CATGAGAGCATATTTCTAAAGGAAAAT
M5	>9.00e-13	TGTGAATTGGTACGCAGACA
M6	>1.90e-09	ATGCAGAGAAGATTT
M7	>1.26e-09	GTCTGATTAAGTTG
M8	>2.6e-13	GCAAGCAACGAGCTTCTGGC

**Abbildung 4.25** Konsensus-Sequenzen der durch MEME identifizierten Wiederholungsmotive.

#### 4.10 ADH- (Alkoholdehydrogenase-) ähnliche Sequenzmotive

Bei den Fragmentsequenzen der Marker RL17.367, R13.152, R11.160 und R1.157 wurden mehrere kurze Strecken mit Ähnlichkeit zu Promotorsegmenten von Alkoholdehydrogenasen gefunden. Der Marker RL17.367 wurde in der Umgebung der als CAPS-Marker repräsentierten Alkoholdehydrogenase kartiert. Motivanalysen mit NSITE

an AFLPs, die nicht in Nachbarschaft zu diesem Marker liegen, zeigten, dass Fragmente mit Retroelementsignaturen oft kurze Abschnitte mit Homologie zu ADH-typischen Sequenzen aufweisen. Dabei handelt es sich sowohl um Segmente aus Alkoholdehydrogenasegenen selbst oder um Nukleotidfolgen mit Ähnlichkeit zu regulatorischen Einheiten (z.B. distaler Promotor, proximaler Promotor, vgl. Tab. 4-11). So zeigt ein LTR-Motiv, das bei Fragment R1.157 auftritt und in der Literatur für HIV-1 beschrieben ist, gleichzeitig auch Ähnlichkeit zu einer mit ADH3 assoziierten Sequenz.

**TABELLE 4-11**

**Motive mit Bezug zu ADH-Genen aus sequenzierten AFLP-Fragmenten nach NSITE-Analyse**

Vorkommen	ADH-Typ	Beschreibung	Basenfolge
AFLP RL17.367	ADH	proximale Promotorsequenz in reverser Orientierung.	AGGAATAGTAACAAAGA
AFLP R13.152	ADH2	C/EBPalpha-Bindungsstelle	AGTGTGTAATAT
AFLP R11.160	ADH3	C/EBPalpha-Bindungsstelle, Gegenstrang, LTR-artig, enthält MEME-Motiv +2	ACCACTTCAACAT
AFLP R1.157	ADH3	C/EBPalpha-Bindungsstelle, im Gegenstrang, MEME+2, Teil eines LTR-Motivs	ACCAATTCAACAT
AFLP R18.233	ADH	distales Promotorelement	AACAGCTG
Walking-Sequenz: (Pos. 1210)	ADH	proximaler Promotor (im Gegenstrang)	TTTGTTATCAAGAAAA

#### **4.11 Identifizierung von regulatorischen Motiven in den Fragmentsequenzen**

Durch Analyse mit NSITE wurden putative regulative Bereiche und Proteinbindungsstellen in beiden Strängen der Fragmentsequenzen gefunden (Darstellung der annotierten Sequenzen vgl. Anhang II).

Angaben zu Transkriptionsfaktoren sind dabei exemplarisch zu verstehen: die Assoziationen ergeben sich aus Homologien zu Datenbankeinträgen in TRANSFAC (<http://www.transfac.gbf.de/TRANSFAC>) und betreffen konservierte Zielsequenzen DNA-bindender Proteine, die für andere Organismen bereits charakterisiert sind und deren Bezeichnungen in der Annotation vorläufig beibehalten wurden. Einige der Motive werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

#### 4.11.1 Motivanalyse des Fragments R8.266

Dieses Fragment kartiert als Marker in 'Regent'-Kopplungsgruppe R16 (IGGP15). Es liegt an der Basis des Major-QTL mit Relevanz für *Uncinula necator*-Resistenz sowie einem überlappenden QTL für „Beerengröße“ (vgl. Abb. 4.14). Angesprochen wurde bereits die in BLAST ermittelte Homologie zu Transposonsequenzen des Typs Tag1. Gemäß NSITE weist das Fragment auch eine Basenfolge mit Ähnlichkeit zum Octamermotiv aus Ocr-Retroelementen sowie diverse cis-regulatorische Motive in beiden Strängen auf (z.B. eine Prolaminbox, ein cAMP-responsives Element, ein samenspezifisches Enhancerelement vom Typ AtPer1 einer Peroxidase aus *Arabidopsis thaliana* sowie mögliche Bindungsstellen für *AP-1* *STE-12* und *STE-2*).

#### 4.11.2 Motivanalyse des Fragments R2.177

AFLP R2.177 enthält G-Boxen in beiden Strängen, ein Evening-AT-Element, Zielstellen für die Transkription stimulierende Faktoren (Typ *USF*, *Msn*, *Mcm*) und eine überlappende Repressor-Bindungsstelle (Typ *Sko1*). Mit dem Motiverkennungs-Tool MEME wurde ein vierfacher Tandemrepeat identifiziert (Motiv MEME+7), der gemäß NSITE-Analyse je ein Elicit-Box E - Motiv enthält. Ein fünftes anschließendes Wiederholungselement ist leicht abgewandelt (Pos. 90 – 103). Das Elicit-Box-Motiv des Fragments R2.177 weist gemäß NSITE-Analyse Ähnlichkeit zur (dort in nur einer Kopie vorhandenen) Elicit-Box E des Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase-Promotors (CCoAOMT) der Petersilie auf (vgl. Promotoranalysen in GRIMMIG und MATERN, 1997). Primer für ein PCR-Walking wurden abgeleitet, um die Umgebung dieses auffälligen Elicit-Box-Arrangements näher untersuchen zu können. Bei der Primerentwicklung wurde die Positionierung in wiederholt auftretenden Sequenzmotiven vermieden. Die für das Walking erforderliche PCR-Reaktion verlief trotz Optimierungsbemühungen - wahrscheinlich doch aufgrund des repetitiven Charakters der Markersequenz - ohne reproduzierbares Ergebnis und wurde vorerst nicht weiterverfolgt.

#### 4.11.3 Motivanalyse des Fragments R17.186

R17.186, zentral in einem QTL für Veraison gelegen, zeigt über die Analyse der translatierten Sequenz in BLASTX auf Proteinebene, insbesondere im Bereich eines konservierten Motivs, Homologien zu ca. zwanzig Datenbankeinträgen intrazellulärer Proteinasen, (vgl. Abb. 4.26). In Überlappung mit diesem proteinasetyptischen Motiv wurde ein zweiter Abschnitt gefunden, der in Transkriptionsregulatoren der *araC*-Familie konserviert ist.

<p>MVAXNELLAVHRMKCISFPELQQLKSIVHGKWMHLAQYMKTGKPDASICHGQILAATGVLKGGKCTSCGEQ PEARXLLP</p>	<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> <p>konserviertes Proteinasemotiv (20 verschiedene Treffer in BLASTX)</p> <hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> <p>konserviertes Transkriptionsregulatormotiv (4 verschiedene Treffer in BLASTX)</p>
---	---

**Abb. 4.26 Charakteristisches Aminosäuremotiv aus Proteinasen und Transkriptionsfaktoren in der translatierten Fragmentsequenz von R17.186.**

Konservierte Sequenzbereiche sind durch Balken unterhalb der Proteinsequenz repräsentiert.

Als cis-regulatorische Motive treten eine CARG-Box, eine Aktivatorsequenz, einige kurze Homöoboxmotive (Typ *ftz* aus *Drosophila* und *Zmhox1a* aus Mais ) sowie mehrere G-Boxen in der Fragmentsequenz auf. Die G-Box-Elemente sind revers, in Überlappung und palindromartig zueinander auf beiden Strängen angeordnet. Interessanterweise zeigt die Markersequenz unmittelbare Ähnlichkeit zu einem EST aus reifenden Beeren der Weinrebe ( $E= 2e-29$ , score=135 bits, 96% identities). Möglicherweise repräsentiert der Marker sogar selbst den Teil einer Gensequenz, die das Merkmal „Beerenreife“ beeinflusst.

#### 4.11.4 Motivanalyse des Fragments RL17.367

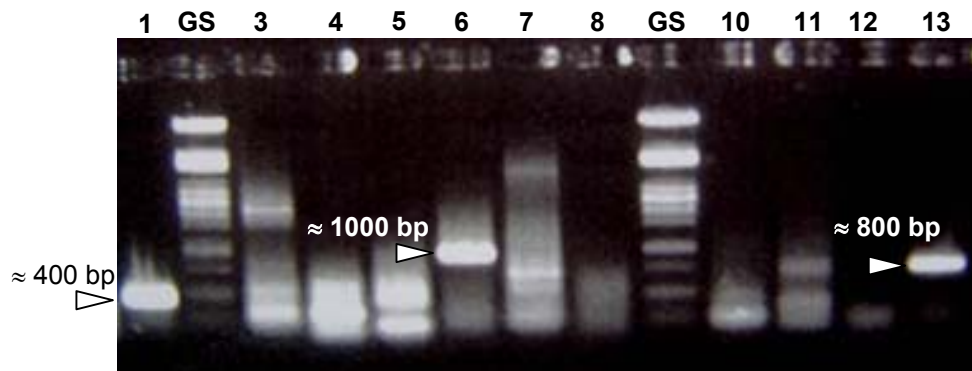
Das Fragment weist gemäß NSITE-Analyse Homologien zu mehreren Promotorboxen sowie Zielstellen für Transkriptionsfaktoren in Initiationsnähe auf (z.B. *SP-1*, *AP-1*, *STE11*, *C/EBP*). Außerdem fällt das gehäufte Auftreten von cis-regulatorischen Elementen mit Bezug zu Redoxstress (CARG-Box, CRP-Promotorelement, anaerobes Response-Element, G-Boxen) auf. Mit dem Topologie-Analysetool HMMTOP wurden zwei in Membranproteinen konservierte Sequenzbereiche identifiziert, die die Ausprägung von Transmembranhelices begünstigen. Aufgrund der interessanten Anordnungen von putativen cis-regulatorischen Elementen und dem Hinweis auf codierende Bereiche für Membrandomänen wurde ausgehend von der Markersequenz ein PCR-Walking unternommen.

#### 4.12 PCR-Walking ausgehend von AFLP RL17.367

Um die den Marker flankierenden Genomregionen zu untersuchen, wurde der bis dahin bekannte Sequenzbereich anhand der Methode des PCR-Walking mit dem Genome-Walker Kit (Clontech) in beiden Richtungen erweitert. Dazu wurden aus der Mitte des AFLP-Fragments RL17.367 zwei in beiden Richtungen aus dem Fragment herausweisende nested-Primer-Sets (GPS1 und GPS2 bzw. GPS3 und GPS4) abgeleitet. In den Abbildungen 4.28 und 4.29 ist die Position dieser Primer eingezeichnet.

### 4.12.1 Gewinnung von geeigneten Ausgangsfragmenten für das PCR-Walking

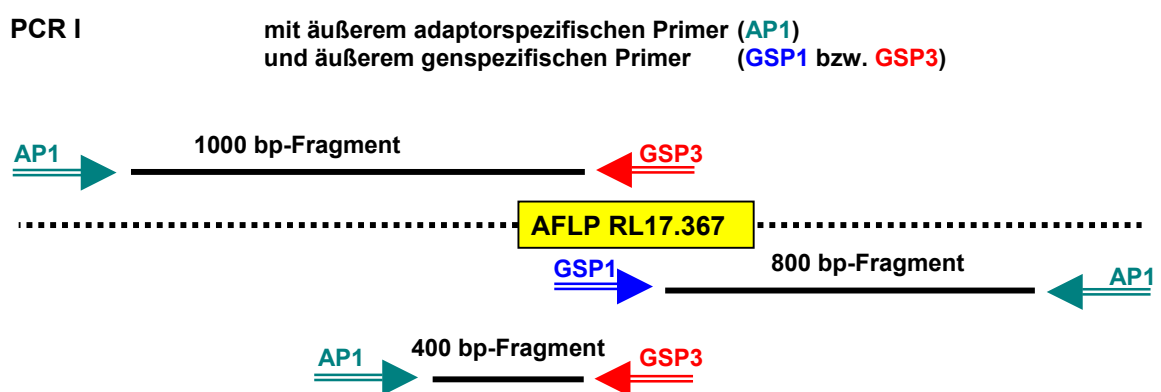
Nach der Vorbereitung der genomischen DNA von ‘Regent‘ gemäß der Anleitung von Clontech (Restriktion, Adaptorligation etc., Verwendung einer *DraI*-Fragmentbibliothek) zeigte das Ergebnis der PCR I mit den äußeren Adaptor- und genspezifischen Primern neben einer Reihe unspezifischer Resultate (vgl. Spuren 3-5, 7, 8, 10-12 in Abb. 4.27) drei Ansätze mit einzelnen klar amplifizierten Fragmenten von ca. 1000 bp (Spur 6), ca. 800 bp (Spur 13) und ca. 400 bp (Spur 1).



**Abbildung 4.27 (a) PCR-Walking ausgehend von AFLP RL17.367.**

Gezeigt sind Ansätze des PCR I-Schrittes, der der „nested PCR II“ vorausgeht. Amplifikate mit klaren Einzelbanden, die relativ große Fragmente repräsentieren, wurden für die weiteren Schritte ausgewählt. Die drei Fragmente der Ansätze 1, 6 und 13, die diesen Kriterien entsprachen, sind durch Pfeile markiert. Aliquots dieser Ansätze dienten als Matrize für den nächsten Schritt. GS – Größenstandard.

Abbildung 4.27 (b) stellt die Amplifikation der PCR I schematisch dar.



**Abbildung 4.27 (b) PCR-Walking ausgehend von AFLP RL17.367 (Schema).**

Gezeigt sind die drei untersuchten Fragmente im Kontext eines Schemas des PCR I-Schrittes, der der „nested PCR-II“ vorausgeht. AP1 – adaptorspezifischer äußerer Primer, GSP1 und GSP3 – äußere genspezifische Primer (von Marker AFLP RL17.367 abgeleitet, dessen Lage zur besseren Orientierung eingezeichnet ist (gelb).

#### 4.12.2 Modifikation der Walking-PCR II und Ergebnis: Acht sequenzierte Walking-Fragmente („Runs“)

Nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls wurden Aliquots der PCR I mit den inneren Adaptor- und genspezifischen Primern reamplifiziert („nested“ PCR II). Dieser Reaktionsansatz verlief jedoch ergebnislos. Das Protokoll der Reamplifikation wurde daraufhin modifiziert, indem der äußere adaptorspezifische Primer AP1 mit den inneren genspezifischen Primern kombiniert wurde. Die so erzeugten Reamplifikate wurden anschließend mit den inneren genspezifischen Primern sowie mit AP1 sequenziert. Außerdem wurde der innere Adaptorprimer AP2 zur Sequenzierung der PCR I – Produkte eingesetzt. Die genaue Vorgehensweise geht aus folgendem Überblick hervor:

<b>Modifikation des Protokolls, statt „nested“ PCR II:</b>																	
<b>PCR II</b>	mit <b>äußerem</b> adaptorspezifischen Primer ( <b>AP1</b> ) und <b>innerem</b> genspezifischen Primer ( <b>GSP2</b> bzw. <b>GSP4</b> )																
Matrize:	PCR-Aliquot aus I.																
Ergebnis:	<table border="0"> <tr> <td><b>1000 bp-Fragment</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>AP1</b></td> <td>Produkt: <b>Run1</b> 302 bp (= lesbarer Bereich)</td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>GSP4</b></td> <td>Produkt: <b>Run8</b> 778 bp</td> </tr> <tr> <td><b>400 bp-Fragment</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>GSP4</b></td> <td>Produkt: <b>Run4</b> 394 bp,</td> </tr> <tr> <td></td> <td><b>Run14</b> 397 bp (= Wdh. v. Run4)</td> </tr> <tr> <td><b>800 bp-Fragment</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>GSP2</b></td> <td>Produkt: <b>Run12</b> 713 bp</td> </tr> </table>	<b>1000 bp-Fragment</b>		Sequenzierprimer: <b>AP1</b>	Produkt: <b>Run1</b> 302 bp (= lesbarer Bereich)	Sequenzierprimer: <b>GSP4</b>	Produkt: <b>Run8</b> 778 bp	<b>400 bp-Fragment</b>		Sequenzierprimer: <b>GSP4</b>	Produkt: <b>Run4</b> 394 bp,		<b>Run14</b> 397 bp (= Wdh. v. Run4)	<b>800 bp-Fragment</b>		Sequenzierprimer: <b>GSP2</b>	Produkt: <b>Run12</b> 713 bp
<b>1000 bp-Fragment</b>																	
Sequenzierprimer: <b>AP1</b>	Produkt: <b>Run1</b> 302 bp (= lesbarer Bereich)																
Sequenzierprimer: <b>GSP4</b>	Produkt: <b>Run8</b> 778 bp																
<b>400 bp-Fragment</b>																	
Sequenzierprimer: <b>GSP4</b>	Produkt: <b>Run4</b> 394 bp,																
	<b>Run14</b> 397 bp (= Wdh. v. Run4)																
<b>800 bp-Fragment</b>																	
Sequenzierprimer: <b>GSP2</b>	Produkt: <b>Run12</b> 713 bp																
<hr/>																	
<b>Zusätzlich:</b>	<b>Sequenzierungen von Aliquots aus PCR I</b>																
	<table border="0"> <tr> <td><b>1000 bp-Fragment</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>AP2</b></td> <td>Produkt: <b>Run6</b> 818 bp</td> </tr> <tr> <td><b>400 bp-Fragment</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>AP2</b></td> <td>Produkt: <b>Run2</b> 412 bp</td> </tr> <tr> <td><b>800 bp-Fragment</b></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sequenzierprimer: <b>AP2</b></td> <td>Produkt: <b>Run10</b> 732 bp</td> </tr> </table>	<b>1000 bp-Fragment</b>		Sequenzierprimer: <b>AP2</b>	Produkt: <b>Run6</b> 818 bp	<b>400 bp-Fragment</b>		Sequenzierprimer: <b>AP2</b>	Produkt: <b>Run2</b> 412 bp	<b>800 bp-Fragment</b>		Sequenzierprimer: <b>AP2</b>	Produkt: <b>Run10</b> 732 bp				
<b>1000 bp-Fragment</b>																	
Sequenzierprimer: <b>AP2</b>	Produkt: <b>Run6</b> 818 bp																
<b>400 bp-Fragment</b>																	
Sequenzierprimer: <b>AP2</b>	Produkt: <b>Run2</b> 412 bp																
<b>800 bp-Fragment</b>																	
Sequenzierprimer: <b>AP2</b>	Produkt: <b>Run10</b> 732 bp																

An dieser Stelle kann man nun mutmaßen, dass die Schwierigkeiten mit der „nested“ PCR II mit dem Bindungsverhalten der genspezifischen Primer zusammenhängen.

Die Sequenzen der Walkingfragmente wurden aus praktischen Gründen (Verwaltung aller Rohdaten über die ABI-Software) mit der fortlaufenden Probennummer des ABI Prism-Laufs („Runs“ 1 bis 14) bezeichnet. Die Basenfolgen der Runs wurden durch Wiederholung der Sequenzreaktion bestätigt, Run14 stellt die Wiederholung von Run4 dar, beide Sequenzen weichen in drei Nukleotiden voneinander ab. Die Sequenzen der inneren und äußeren genspezifischen Primer sind in Anhang III dargestellt.

### 4.12.3 BLAST-Analysen mit Sequenzen des Walking und Identifizierung eines putativen Thioredoxingens

Die Sequenzen der individuellen Walkingfragmente (Run1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14) wurden in BLAST auf Nukleotid- und auf Proteinebene analysiert. Die gewonnenen Informationen über codierende Bereiche flossen auch in die Darstellung eines Fragmentvarianten-Alignments (Abschn. 4.12.4, Abb. 4.28) ein. Die stärksten Homologien ergaben sich bereits bei Analysen mit den Teilsequenzen (entsprechend den „Runs“) der Walkingfragmente zu einem thioredoxinähnlichen Protein aus *Arabidopsis thaliana*, das zu diesem Zeitpunkt noch nicht näher charakterisiert war (s. Tab. 4-12).

TABELLE 4-12

#### Homologien der Walkingfragmente gemäß BLASTX-Analyse.

##### Run8 und Run6

>gi|15223728|ref|NP\_177802.1| (NM\_106326) thioredoxin-like protein [Arabidopsis thaliana]  
gi|6143893|gb|AAF04439.1|AC010718\_8 (AC010718) thioredoxin-like protein; 49720-48645  
[Arabidopsis thaliana] Length = 151 Frame = +2

Run8:

Score = 110 bits (276), Expect = 1e-23, Identities = 51/59 (86%), Positives = 56/59 (94%) Frame= +2

Run6:

Score = 103 bits (257), Expect = 2e-21 Identities = 47/55 (85%), Positives = 53/55 (95%) Frame= +2

##### Run10 und Run12

>gi|15223728|ref|NP\_177802.1| (NM\_106326) thioredoxin-like protein [Arabidopsis thaliana]  
gi|6143893|gb|AAF04439.1|AC010718\_8 (AC010718) thioredoxin-like protein; 49720-48645  
[Arabidopsis thaliana] Length = 151

Run10:

Score = 34.3 bits (77), Expect = 1.4, Identities = 17/20 (85%), Positives = 18/20 (90%) Frame = -2

Run12:

Score = 34.3 bits (77), Expect = 1.3, Identities = 17/20 (85%), Positives = 18/20 (90%) Frame = +2

##### Run2 (kein Hinweis auf Thioredoxinhomologie)

>gi|17229970|ref|NP\_486518.1| (NC\_003272) hypothetical protein [Nostoc sp. PCC 7120]  
gi|17131570|dbj|BAB74177.1| (AP003589) ORF\_ID:alr2478~hypothetical protein [Nostoc sp. PCC 7120]  
Length=131,  
Score=32.0 bits (71), Expect = 1.3, Identities = 13/34 (38%), Positives = 23/34 (67%), Frame = +1

##### Run4 und Run14

keine BLASTX- Treffer

#### 4.12.4 Homologisierung der Walking-Fragmente und hypothetische Architektur des Locus

Durch Recherchen in der SALK-Datenbank mit T-DNA-Insertionsmutanten, im Arabidopsis Gene Index (TIGR AGI) und dem Thioredoxin-Web-Portal<sup>15</sup> konnte das „thioredoxinlike protein“ als T10P12.4 identifiziert werden, das durch Pfam als Thioredoxin 1 klassifiziert ist.

Die Fragmente des Walking wurden mit Hilfe überlappender und ähnlicher Bereiche zu dem ab S. 133 dargestellten Abgleich der Teilsequenzen (Abb. 4.28) sowie dem in Abb. 4.29 gezeigten hypothetischen Übersichtsschema angeordnet. Es bleibt noch unklar, inwieweit es sich bei den verwandten Sequenzabschnitten um wiederholte Varianten in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander auf dem gleichen Strang handelt (paralog), ob die Sequenzen als Allele aufzufassen sind (homolog) oder sogar verstreut vorkommen. Vielleicht existieren außer den identifizierten auch noch weitere verwandte Sequenzen. Dementsprechend ist die schematische Anordnung zur möglichen Architektur des Locus (Abb. 4.29) als Entwurf zu verstehen. Tabelle 4-13 fasst Erläuterungen zu den in Abb. 4.28 in Alignment angeordneten Fragmentsequenzen zusammen.

**TABELLE 4-13 Erläuterungen zur Darstellung der Walking-Fragmentvarianten in Abb. 4.28**

Die Anmerkungen „Start“ und „Ende“ bezeichnen den Verlauf sequenzierter Walkingfragmente und verweisen auf ihre ursprüngliche Orientierung. Nukleotidpositionen sind oberhalb der Sequenzen angegeben.

„>“ markiert mögliche Start-Codons bzw. den Beginn eines Orf (Open Reading Frame). In den Bereichen putativer Orfs sind Aminosäuren angegeben und in homologen Bereichen zu einem Datenbankalignment fettgedruckt..


„\*“ markiert in-frame-Stop-Codons.

„-“ wurde für nicht besetzte Nukleotidpositionen eingefügt, um das Alignment zwischen den Fragmentvarianten visuell zu unterstützen.

„xxGTxx“ markiert mit dem Programm „SplicePredictor“ ermittelte sichere Splice-Stellen hoher Signifikanz

„xxGTxx“ markiert mit „SplicePredictor“ ermittelte mögliche Splice-Stellen mittlerer Signifikanz


„tttaaa“ bezeichnet eine divergente TATA-Box, die als alternative Promotorbox bei zelltypgesteuert-differentieller Expression eine Rolle spielt (HOVRING et al., 1999) und oft mit Steroid-Response-Elementen zusammen agiert (FENTON et al., 1996).

Mögliche Exonbereiche sind durch Balken zwischen beiden DNA-Strängen hervorgehoben. „“

Polymorphismen auf DNA-Ebene sind gekennzeichnet, indem betroffene Nukleotide **fett** gedruckt sind.

Weinreben-fremde Sequenzen (präparativ bedingte Adaptorsequenzen) sind **grau unterlegt** oder entfernt.

Ergänzungen regulatorischer Motive und codierender Segmente stammen aus Analysen mit den im Methodenteil beschriebenen Bioinformatikprogrammen.

Die Lage des Markers AFLP RL17.367 sowie der fragmentverankerten Walkingprimer GSP1 u. 2 sowie GSP3 u. 4 sind eingezeichnet und durch Pfeile markiert. 

<sup>15</sup> [www.ukc.ac.uk/bio/klappa/research/thioredoxin%20web%20portal\\_files/menu.html](http://www.ukc.ac.uk/bio/klappa/research/thioredoxin%20web%20portal_files/menu.html)



Trx-Walking-Alignment, Fragmentsequenzen sind nach Überlappung (Contiglogik) angeordnet.

Nukleotid-Positionen: 1740

	10	20	30	40	50	60		
			▼	<b>Exon E1</b>				
	taaattccacacttggttgatttctttAGg- <u>ttgaagcaaagaagcaaaca-ttt-tcttcc</u>						Run1 Start	
	atthaaggtgtgaacaacactaaagaaatcc-aacttcgtttcttcgtttgt-aaa-agaagg							
	* I P H L L * F L * <b>V E A K K Q T F S S</b>							
	K F H T C C D F F R L K Q R S K H F L P							
	N S T L V V I S L G *							
			▼	<u>Origin of replication (ORI)</u>	<u>Motiv aus Apoptosis-</u>			
	taaattccacacttggttgatttctttag <u>cttgaagcaaagaagcaaaca</u> cttttcttctcc						Run6 Start	
	atthaaggtgtgaacaacactaaagaaatccgaacttcgtttcttcgtttgtgaaagagaagg							
	* I P H L L * F L * A * S K E A N <b>T F S S</b>							
	K F H T C C D F F R L E A K K Q T L S L P							
	N S T L V V I S L G L K Q R S K H F L F							
	70	80	90	100	110	120		
	putativer Translationsstart der TRX-Gensequenz							
	und 5'-Start des homologen EST >grape CF607141							
	<u>Promotorelement C/EBP</u>							
	<u>LTR-Motiv</u>	<u>CAAT-Box</u>			Orf1 >	▼		
	ttggatgaattgctagcaaa-attctgacaa-acctgtact-gg-tagact-tctat-gcaacttgG						Run1	
	aacctacttaacgatcgtt-taagactggt-tggacatga-cc-atctga-agata-cgttgaacc							
	<b>L D E L L A N S D K P V L V D F Y A T W</b>							
	W M N C * M Q L G							
	L G *							
						▼		
	ttggatgaattgctagcaaacattctgacaatacctgtactaggcttagactatctatagcaacttgG						Run6	
	aacctacttaacgatcgttgaagactggtatggacatgatccgatctgatagatacgttgaacc							
	L D E L L A T F * Q Y L Y * A R L S I A T W							
	W M N C *							
	L G *							
	130	140	150	160	170	180	190	
	[ Intron I1 ]							
				<u>TATA-Box</u>	<u>Poly-A-Signal</u>			
	T-gagttttccatttttttttaacttttttttaaa <sup>aa</sup> aatga <sup>aa</sup> ataaaaataaa <sup>ataa</sup> atcc						Run1	
	a-ctcaaaaaggtaaaaaaaaaaattgaaaaaaaaatctttactttattttattttatttagg							
	* E F F H F F F N F F * M K *							
	S F S I F F L T F F K K *							
	Tagagttttccatttttttttaacttttttttaaa <sup>aa</sup> aatga <sup>aa</sup> ataaaaataaa <sup>ataa</sup> atcc						Run6	
	a-tctcaaaaaggtaaaaaaaaaaattgaaaaaaaaatctttactttattttattttatttagg							
	* R V F P F F F * M K *							
	E F F H F F F N F F * M K *							
	200	210	220	230	240	250		
	<u>Promotor coupling element</u>		<u>TATA-Box</u>	Orf2 >				
	catacttgccaccggttggcttcttttaaa <sup>t</sup> AGaaggaaaatgatgtgagatggttgg						Run1	
	gtagaacgggtggcaaacacgagaaaatttacttcttactaactctaccaacca							
	E G K * M V G							
	K E N D V R W L V							
	R K M M *							
					>			
	catacttgccaccggttggcttcttttaaa <sup>t</sup> AGaaggaaaatgatgtgagatggttgg						Run6	
	gtagaacgggtggcaaacacgagaaaatttacttcttactaactctaccaacca							
	E G K * M V G							
	K E N D L R W F V							
	R K M M *							

> >
♦tacttgcca-cggtt-g-ttgctc-ttaaatt--aaggaaaatgatatgagatggtttgt Run8 Ende
♦atgaacggg-gcaa-c-aacgag-aattta--ttccttttactatactctaccaacca
M V G
M R W F V
\*

260 270 280 290 300 310

tattttgggttaagctagatgataacctgaattagctgtctttggcagcaaaa♦ Run1 Ende
ataaaacaacattcgatctactattggacttaatcgacagaaccgctcgttt♦
Y F V V S \*
I L L \*
F C C K L D D N L N \*
distales Promotorelement

tattttgggttaagctaaatgataacctgaattagctgtctttggcagcaaaaatgtgaaat Run6
ataaaacaacattcgatttactattggacttaatcgacagaaccgctcgttttactacttta
Y F V V S \*
I L L \*
F C C K L N D N L N \*
NF kappaB...

tattt-gttgtaagctagatgata--ctgaattagctgtctttggcagcaaaaatgtgagat Run8
ataaa-caacattcgatctactat--gacttaatcgacagaaccgctcgttttactactcta
Y L L \*
I C C K L D D T E L A V L A A K C E I
F V V S \* M I L N \*

320 330 340 350 360 370

CAAT-Box Orf3 >
ttaaagc[caaatt]atattccatcaataagacatgctagGTCagtcacctcattgaagtgtt Run6
aaattcgggttaataataaggtagttattctgtacgatccagtcagggagtaacttcacaa
M L G Q S L I E V F
S P S L K C
V P H \*

..NF kappaB >
tt-aagc[caaatt]atattccatcaataagacatgctagGTCagtcacctcattgaagtgtt Run8
aa-ttcgggttaataataaggtagttattctgtacgatccagtcagggagtaacttcacaa
M L G Q S L I E V F
S P S L K C
V P H \*
\*

380 390 400 410 420 430

tccttgagggtgtgctgttctaaggagtctctattttctatgagatattgaggaaactaaa Run6
aggaactcccacacgacaagattcctcagagataaagataactctataactcctttgattt
P \* G C A V L R S L Y F Y E I L R K L N
F L E G V L F \*
S L R V C C S K E S L F L \*

tccttgagggtgtgctgttctaaggagtctctattttctatgagatattgaggaaactaaa Run8
agaaactcccacacgacaagattcctcagagataaagataactctataactcctttgattt
L \* G C A V L R S L Y F Y E I L R K L N
F L E G V L F \*
S L R V C C S K E S L F L \*

440 450 460 470 480 490

Exon E2, konservierte TRX-Domäne
... intervartiel konservierter Bereich ..... Aktives Zentrum
taaaactagaagtaacaaattactggtttccAGgtgtggcccttgtcagttcatggttcc Run6
atattgatcttattgtttaatgaccaaaggtccacaccgggaacagtcaggtaccaagg
K T R S N K L L V S R C G P C Q F M V P
I K L E V T N Y W F P G V A L V S S W F
\*

▼

taaaactagaagtaacaaattactggtttccAGggtgtggccttgtcagttcatggttcc Run8  
 attttgatcttcattgtttaatgaccaaaggtccacaccgggaacagtcaagtaccaagg  
 K T R S N K L L V S R **C G P C** Q F M V P  
 I K L E V T N Y W F P G V A L V S S W F  
 \*

500 510 520 530 540 550

tatcctcaacaagtcggggcttctctgaaagacaagatccagggtggtgaaaattgatac Run6  
 ataggagttgtttcagcccgaagagactttctgttctaggtccaccacttttaactatg  
 I L N K V G A S L K D K I Q V V K I D T  
 Y P Q Q K A G F S E R Q D P G G E N \*  
 L S S T K S G L L \*

>Start der SALK-TDNA-Insert-Homologie

tatcctcaacgaagtcgggtgcttctctgaaagacaagatccagggtggtgaaaattgatac Run8  
 ataggagttgtttcagcccgaagagactttctgttctaggtccaccacttttaactatg  
 I L N E V G A S L K D K I Q V V K I D T  
 Y P Q A S A C F S E R Q D P G G E N \*  
 L S S T K S V L L \*

560 570 580 590 600 610

GATA-1

tgagaaataccaagcattgctgataagtaccgaatagaggcattgcctactttcatcat Run6  
 actctttatgggttcgtaacgactattcatggcttatctccgtaacggatgaaagtagta  
 E K Y P S I A D K Y R I E A L P T F I I  
 \*  
 R N T Q A L L I S T E \*

tgagaaataccaagcattgctgataagtaccgaatagaggcattgcctactttcatcat Run8  
 actctttatgggttcgtaacgactattcatggcttatctccgtaacggatgaaagtagta  
 E K Y P S I A D K Y R I E A L P T F I I  
 \*  
 R N T Q A L L I S T E \*

620 630 640 650 660 670

>

atTTaaag-atgggaaaccgt-tgatcgctttGTaagtggaattcgattcttgtttgcact Run6  
 taaatttc-taccctttggca-actagcgaaacattcaccttaagcaagaacaacgtga  
 F K D G K P K I A L \*  
 I \* V S G I A F L F A L  
 M G N A \* S L C K W N S F L V C T

\*Ende Salk-TDNA-Insert-Homologie

Orf4 > [Intron I2]

atTTaaag-atgggaaaccgtatgatcgctttGTaagtggaattcgattcttgtatgcact Run8  
 taaatttc-taccctttggcactactagcgaaacattcaccttaagcatagaacatcagtgta  
 F K D G K P Y D R F V S G I R I L Y A L  
 I \* K W N S F L V C T  
 M G N A M I A L \*

>

♦agGTaaag-atgggaaaccgtatgatcgctttGTaagtggaattcgattcttgtatgcact Run4 Ende  
 ♦tccatttc-taccctttggcactactagcgaaacattcaccttaagcatagaacatcagtgta  
 [Adaptorsequenz...]  
 K D G K P Y D R F V S G I R I L Y A L  
 \* K W N S Y L V C T  
 V K M G N A M I A L \*

>

♦agGTaaag-atgggaaaccgtatgatcgctttGTaagtggaattcgattcttgtatgcact Run14 Ende  
 ♦tccatttc-taccctttggcactactagcgaaacattcaccttaagcatagaacatcagtgta  
 [Adaptorsequenz...]  
 K D G K P Y D R F V S G I R I L Y A L  
 \* K W N S Y L V C T  
 K M G N A M I A L \*

▼  
**caG**Taaagca-gggaaaccg**ta**t**gatc**g**ctttG**Taagtggaattcg**ta**tctt**gtat**gca**ct** Run2 Start  
**gtc**attt**cg**t-ccctt**tg**ca**tact**agc**gaa**acatt**ca**cttaag**ca**ta**ga**aca**tac**gt**ga**  
 S K A G K P Y D R F V S G I R I L Y A L  
 V K Q G N A M I A L \*  
 K W N S Y L V C T

680 690 700 710 720 730

> > >  
 -gtacaaaa-aacctttttg**g**-aaat-gt**ca**tgaat-g-ccacatgattt---atc-ttca Run6  
 -catgtttt-ttggaaaaacc-ttta-cagtactta-c-ggtgtactaaa--tag-aagt  
 V Q K T F L E M S \* M P H D L S S  
 Y K K P F W K C H E C H M I Y L Q  
 C T K N L F G N V M N A T \*

Orf5 > Orf6 >  
 t**gt**acaaaa**ta**accttttt**gg**aaatt**gt**ca**tga**at**gt**ccacatgattt**tc**atc**ttt**ca Run8  
 acatgtttt**att**ggaaaaacc**ct**ttta**ac**agtactta**ac**aggtgtactaaa**ag**taga**aa**agt  
 V Q N N L F G K L S \* M I F I F H  
 M N C P H D F H L S  
 L Y K I T F L G N C H E L S T \*

> >  
 t**gt**acaaaa**ta**accttttt**gg**aaatt**gt**ca**tga**at**gt**ccacatgattt**tc**atc**ttt**ca Run4  
 acatgtttt**att**ggaaaaacc**ct**ttta**ac**agtactta**ac**aggtgtactaaa**ag**taga**aa**agt  
 V Q N N L F G K L S \* M I F I F H  
 L Y K I T F L G N C H E L S T \*  
 C T K \* M N C P H D F H L S

> >  
 t**gt**acaaaa**ta**accttttt**gg**aaatt**gt**ca**tga**at**gt**ccacatgattt**tc**atc**ttt**ca Run14  
 acatgtttt**att**ggaaaaacc**ct**ttta**ac**agtactta**ac**aggtgtactaaa**ag**taga**aa**agt  
 V Q N N L F G K L S \* M I F I F H  
 L Y K I T F L G N C H E L S T \*  
 C T K \* M N C P H D F H L S

> >  
 t**gt**acaaaa**ta**accttttt**gg**aaatt**gt**ca**tga**at**gt**ccacatgattt**tc**atc**ttt**ca Run2  
 acatgtttt**att**ggaaaaacc**ct**ttta**ac**agtactta**ac**aggtgtactaaa**ag**taga**aa**agt  
 V Q N N L F G K L S \* M I F I F H  
 L Y K I T F L G N C H E L S T \*  
 C T K \* M N C P H D F H L S

740 750 760 770 780 790

> > ▼  
 -at-gcct-g-gaatg-g-gca---ccctgt-acat-gac**gg**-taactgc-cttcttaacttacAG**g** Run6  
 -ta-cgga-c-cttac-c-cgt---gggaca-tgta-ct**g**cc-attgacg-gaagaattgaatgtcc  
 M P G M G T L Y M T V T A F L T Y R  
 C L E W A P C T \*  
 N A W N G H P V H D G N C L L N L Q

Orf7 > NF-kappaB > ▼  
 ca**t**-gcct-g**t**gaatg-g-gc**ag**ccctgtaacat-gact**gt**ttaactgc-cttcttaacttacAG**g** Run8  
 g**ta**-cgga-**ca**cttac-c-cgt**cg**gggacattgta-ct**ga**caattgacg-gaagaattgaatgtcc  
 M P V N G Q P L \*  
 H A C E W A A P V T \*  
 T C L \* M G S P C N M T V N C L L N L Q

> > ▼  
 ca**t**-gcct-g**t**gaatg-g-gc**ag**ccctgtaacat-gact**gt**ttaactg**ct**cttcttaacttacAG**g** Run4  
 g**ta**-cgga-**ca**cttac-c-cgt**cg**gggacattgta-ct**ga**caattgac**ga**gaagaattgaatgtcc  
 M P V N G Q P L \*  
 H A C E W A A P V T \*  
 M G S P C N M T V N C S S \*

> NF-kappaB >

cat-gcct-gtgaatg-g-gcagccctgtaacat-gactgtttaactgc-cttcttaacttacAGg Run14  
 gta-cgga-cacttac-c-cgtcggggacattgta-ctgacaattgacg-gaagaattgaatgtcc  
 M P V N G Q P L \*  
 H A C E W A A P V T \*  
 M G S P C N M T V N C L L N L Q

Defense related ethylene  
 > responsive GCC-Element

catagcctagtgaatgagagcagccctgtaacatagactgtttaactgc-cttcttaacttacAGg Run2  
 gtatcggatcaacttactctcgtcggggacattgta-ctgacaattgacg-gaagaattgaatgtcc  
 I A \* M R A A P V T \*  
 H S L V N E S S P C N I D C \*  
 \*

---

800      810      820      830      840      850      860  
 Primer GSP1..

Übergang extrapoliert

tcttagtagca } ctggcgttgg  
 agaatcatcgt } gaccgcaacca  
 F L V A } L A L V  
 S \*  
 L S S T G V G

MseI-  
 Polymorphismus >

caa-cctta-acctg-caatgacc-agt-ct-ag-ct-c-ct♦  
 gtt-ggaat-tggac-gttactgg-tca-ga-tc-ga-g-ga♦  
**A T L T C N D Q S S S**  
 Q P \* M T S L A P  
 N L N L Q \* \* L L

Run6 Ende

**Exon E3** Orf8 >

caaaccttacac-tggcaatgaccagttcttaggcttctcttctt-gtagca-ctggc-ttggg Run8  
 gtttggaaatgtg-accgttactgggtcaagaatccgaagagaagaa-catcgt-gaccg-aacca  
**A N L T L A M T Q F L G F S S C S T G L V**  
 Q T L H W Q \*  
 K P Y T G N D P V L R L L F L \*

>

caaaccttacac-tggcaatgaccagttcttaggcttctcttctt-gtagcagctggc-ttggg Run4  
 gtttggaaatgtg-accgttactgggtcaagaatccgaagagaagaa-catcgtcgaccg-aacca  
**A N L T L A M T Q F L G F S S C S T G L V**  
 Q T L H W Q \*  
 K P Y T G N D P V L R L L F L \*

>

caaaccttacac-tggcaatgaccagttcttaggcttctcttctt-gtagcagctggc-ttggg Run14  
 gtttggaaatgtg-accgttactgggtcaagaatccgaagagaagaa-catcgtcgaccg-aacca  
**A N L T L A M T Q F L G F S S C S T G L V**  
 Q T L H W Q \*  
 K P Y T G N D P V L R L L F L \*

>

caaaccttacac-tggcaatgaccagttcttaggcttctcttctt-gtagcagctggc-ttggg Run2  
 gtttggaaatgtg-accgttactgggtcaagaatccgaag-gaagaatcatcgt-gaccg-aacca  
**A N L T L A M T Q F L G F L L S S T G L V**  
 Q T L H W Q \*  
 K P Y T G N D P V L R L P S \*

---

870      880      890      900      910      920

... Primer GSP1 (in Leserichtung) →

W-Box      Root specific element      Orf9 > MEME-4...

tttacaca-c-gtttgactc-tattgaa-ttatactttttcacgggattagcca[atgaaggt] RL17.367  
 aaatgtgt-g-caaactgag-ataactt-aatatgaaaaagtgcctaatacggttacttccaa

←

Homologie zu mRNA (Gegenstrang) aus Cabernet Sauvignon (VvGI >grape |CB972430)  
 L H T F D S I E L Y F F T G L A N E G  
 Y T A L T L L N Y T F S A D \* M K V  
 F T H V \*

*W-Box* *Root specific element* >  
 tttc-aca-cactttgactc-tattgaagttataactttttcacgggattagcca[atgaaggtt] Run8  
 aaagatgctgtgaaactgag-ataacttcaaatatgaaaaagtgcctaatacggttacttccaa  
 F Y S T L T L L K L Y F F T G L A N E G  
 V S T A L \* M K V  
 F L Q H F D S I E V I L F H G I S Q \*

>  
 tttc-aca-cactttgactc-tattgaagttataactttttcacgggattagcca[atgaaggtt] Run4  
 aaag-tgt-gtgaaactgag-ataacttcaaatatgaaaaagtgcctaatacggttacttccaa  
 F T H F D S I E V I T F H G I S Q \*  
 F H T L \* M K V  
 V S H T L T L L K L Y F F T G L A N E G

>  
 tttc-actacactttgactcctattgaagttataactttttcacgggattagcca[atgaaggtt] Run14  
 aaag-tgatgtgaaactgaggataacttcaaatatgaaaaagtgcctaatacggttacttccaa  
 F T H F D S Y \* M K V  
 F H Y T L T P I E V I L F H G I S Q \*  
 V S T T L \*

>  
 tttc-aca-cactttgactc-tattAGaattataactttttcacgggattagcca[atgaaggtt] Run2  
 aaag-tgt-cgtgaaactga-gatacttcaaatatgaaaaagtgcctaatacggttacttccaa  
 F T H F D S I R I I L F H G I S Q \*  
 F H T L \* N Y T F S R D \* M K V  
 V S H T L T L L E L Y F F T G L A N E G

930 940 950 960 970 980

...Transmembranhelix1...  
 Primer GSP2 (in Leserichtung) ...  
 Motiv aus Coiled-coil-Domänen  
 CArG Box

... MEME-4 Orf10 > MEME+6 > >  
 ttct-ctttggcataggaaga-gatgtctacagaatctttctt-ctgcat]ttatac-aatgcatgg RL17.367  
 aaga-gaaaccgtatcctct-ctacagatgtctttaaagaa-gacgtaaatatg-ttacgtacc  
 ...mRNA (Gegenstrang) aus Cabernet Sauvignon (VvGI >grape |CB972430)  
 F L F G I G E M S T E F S S A F I Q C M  
 F S L A \*  
 S L W H R R D V Y R I F F C I Y T M H

> > > >  
 ttct-ctttggcatagga]gatgatgtctacagaatctttctt-ctgcat]ttatac-aatgcatggtttg Run8 Start  
 aaga-gaaaccgtatcctctactacagatgtctttaaagaaacgacgtaaatatg-ttacgtaccaaaac  
 F L F G I G D D V Y R I F L L H L Y N A W F C  
 F S L A \* M M S T E F S C C I Y T M H G F  
 S L W H R R \* C L Q N F L A A F I Q C M V L

> > > >  
 ttct-ctttggcatagga]gatgatgtctacagaatctttctt-ctgcat]ttatac-aatgcatggttt Run4 Start  
 aaga-gaaaccgtatcctctactacagatgtctttaaagaa-gacgtaaatatg-ttacgtaccaaa  
 F L F G I G D D V Y R I F F C I Y T M H G ?  
 F S L A \* M M S T E F S S A F I Q C M V  
 S L W H R R \* C L Q N F L L H L Y N A W F

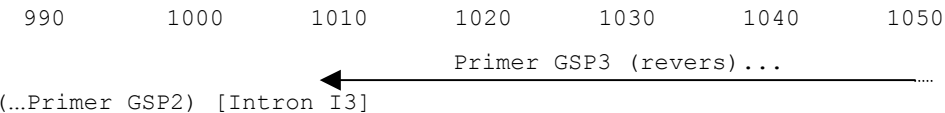
> > > >  
 ttctcctttggcatagga]gatgatgtctacagaatctttctt-ctgcat]ttataccaatgcatggttt Run14 Start  
 aagaggaaccgtatcctctactacagatgtctttaaagaa-gacgtaaatatggtttacgtaccaaa  
 F L L W H R R \* M H G ?  
 F S F G I G D D V Y R I F F C I Y T N A W F  
 S P L A \* M M S T E F S S A F I P M H G

> > > >

ttct-ctttggcataggagatgatgtctacagaatttttctt-ctgcatttatac-aatgcatgg Run2  
 aaga-gaaaccgtatcctctactacagatgtcttaaaagaa-gacgtaaataatg-ttacgtacc  
 F L F G I G D D V Y R I F F C I Y T M H G  
 F S L A \* M M S T E F S S A F I Q C M  
 S L W H R R \* C L Q N F L L H L Y N A W

> >

♦aatttttcttgctgcatttatac-aatgcatgg Run10 Ende  
 ♦ttaaaagaaacgacgtaaataatg-ttacgtacc  
 F S C C I Y T M H G  
 N F L A A F I Q C M  
 I F L L H L Y N A W



Orf11 > CRP-Element Orf12 > MLP Promotor-element

ttgggcctcagGTatgtacagtggcaccatagtc~~caaa-tg~~GTatcttgg-ttt-tcactgta RL17.367  
 aaccggagtccatacatgtcaccgtggtatcagttt-accaatagaacc-aaa-agtgacat  
*Light responsive element LRE*

V G P Q V C T V A P \* Y L G F H C  
 L G L R Y V Q W H H S Q M V I L V F T V  
 W A S G M Y S G T I V K W L S W F S L Y

> >

ttgggcctcagGTatgtacagtggcaccatagtc~~caaaat~~gggt-a♦ Run2 Ende  
 aaccggagtccatacatgtcaccgtggtatcagttttacca-t♦  
 V G P Q V C T V A P \*  
 L G L R Y V Q W H H S Q N G  
 W A S G M Y S G T I V K M V ...

...Übergang Start Run8 und 12 extrapoliert *Antioxidant response element ARE*

> >

ttttgacctcagGTatgtacagtggcaccatagtc~~caaa~~tagtgacacttggctgtgtcactgta Run12 Start  
 aaaacggagtccatacatgtcaccgtggtatcagtttatcactgtgaaccgacacagtgacat  
 F C L R Y V Q W H H S Q I V T L G C V T V  
 V L P Q V C T V A P \*  
 F A S G M Y S G T I V K \*

> > *W-Box* >

ttgggcctcagGTatgtacagtggcaccatagtc~~caaa-tg~~gttatcttgg-ttt-tcactgta Run10  
 aaccggagtccatacatgtcaccgtggtatcagttt-accaatagaacc-aaa-agtgacat  
 V G P Q V C T V A P \*  
 L G L R Y V Q W H H S Q M V I L V F T V  
 W A S G M Y S G T I V K W L S W F S L Y

1060 1070 1080 1090 1100 1110

*Poly-A-Signal*

FUS-TLS Transmembranmotiv *Motiv aus Coiled-coil-Domänen*

cttttgattgtatTTTTCTTTGGTTGTTCTAT-tgccactagtttattttatTTTTTatgt RL17.367  
 gaaaactaacataaaaagaaaaccaacaagata-acgggtgatcaataaataaaaaaatata  
 T F D C I F L L V V L L P L V Y L F F M  
 L L I V F F F W L F Y C H \* F I Y F L C  
 F \*

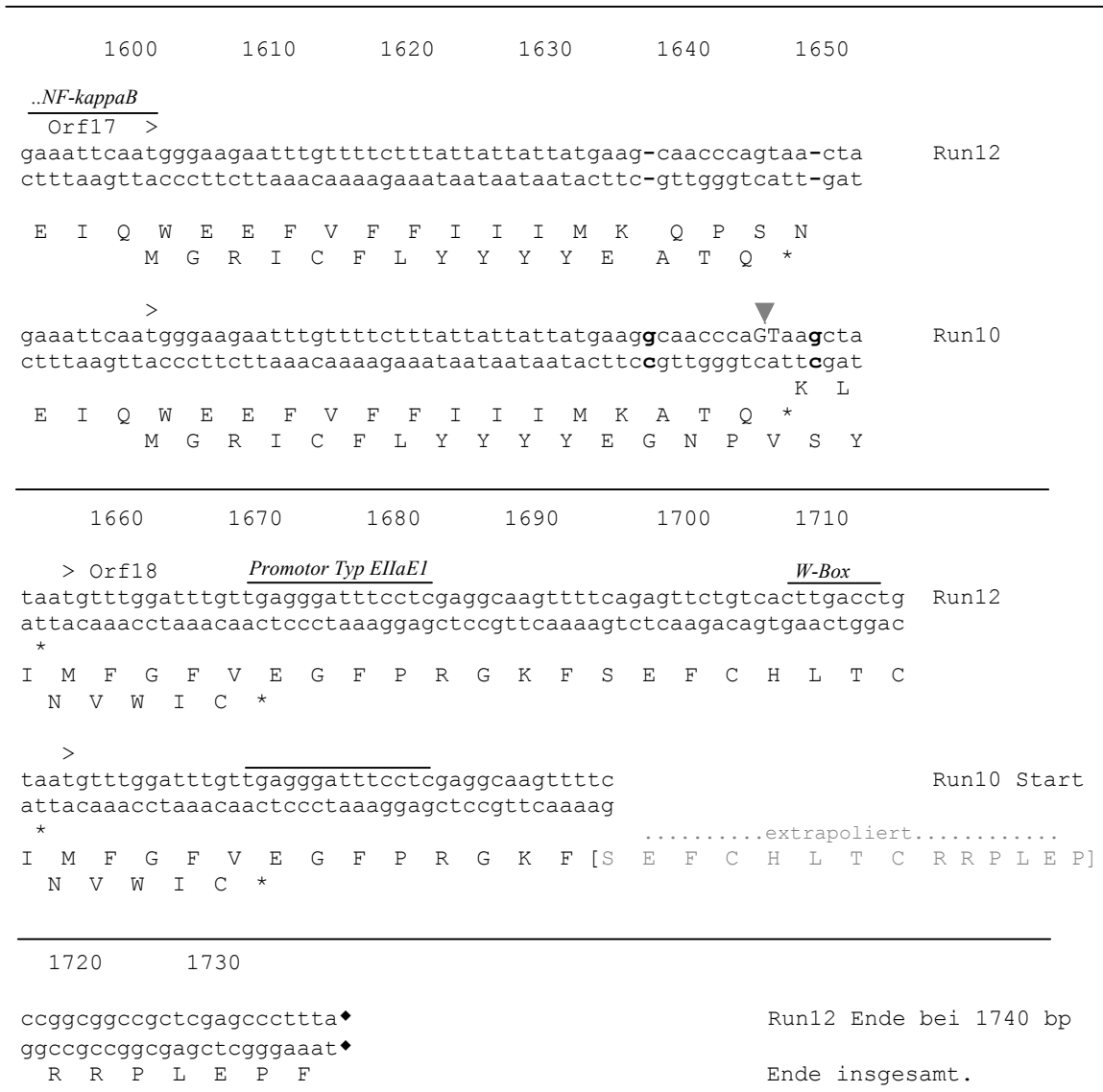
*leichte Homologie zu EST TC4048 aus 'Cabernet Sauvignon'*

cttttgattgtatTTTTCTTTGGTTGTTCTATctgccactagtttattttatTTTTTatgt Run12  
 gaaaactaacataaaaagaaaaccaacaagatagacgggtgatcaataaataaaaaaatata  
 L L I V F F F W L F Y L P L V Y L F F M  
 T F D C I F L L V V L S A T S L F I F Y V

cttttgattgtatTTTTCTTTGGTTGTTCTAT-tgccactagtttattttttttatgt						Run10
gaaaactaacataaaaaagaaaaccaacaagata-acgggtgatcaataaataaaaaataca						
T F D C I F L L V V L L P L V Y L F F M						
L L I V F F F W L F Y C H * F I Y F L C						
<hr/>						
1120	1130	1140	1150	1160	1170	
<i>Antioxidant Response Element ARE</i>			<b>Exon E4, konservierte Domäne</b>			
[Cabernet Sauv.-Homol.]			Orf13 > <i>EcoRI-Site</i> ▼ ▼ <i>W-Box</i> ▼			
tctaatttctttgttactattcctgtctgatgaatttcAGGgaAGgtgctttgactgcAGa						Run12
agattaaagaacaatgataaggacagactacttaaggtccttccacgaaactgacgtct						
S N F F V T I P V * G R C F D C R						
L I S L L L F L S D E F Q <b>E G A L T A D</b>						
F * M N S R K V L *						
<hr/>						
tctaatttctttgttactattcctgtctgatgaatttcAGGgaAGgtgctttgactgcAGa						Run10
agattaaagaacaatgataaggacagactacttaaggtccttccacgaaactgacgtct						
S N F F V T I P V * G R C F D C R						
[L I S L L L F L S D E F Q] <b>E G A L T A D</b>						
F * M N S R K V L *						
<hr/>						
tctaatttctttgttactattcctgtctgatgaatttgggtaccgcaatcaccocccccc						RL17.367 Ende
agattaaagaacaatgataaggacagactacttaaccatggcggttagtgggggggg						[Adaptorsequenz]
S N F F V T I P V *						
L I S L L L F L S D E F						
F * M N ...						
<hr/>						
1180	1190	1200	1210	1220	1230	
<i>ADH Prox. Promotor</i>						
tcagctcatccaacgcattgagaccacactaaaagtgaacaatagttcctttggtgagt						Run12
agtcgagttaggttgcgtaactctgggtgtgattttcactttgttatcaagaaaaccactca						
S A H P T H * ←						
<b>Q L I Q R I E T T L K V K Q *</b>						
S S S N A L R P H *						
<hr/>						
tcagctcatccaacgcattgagaccacactaaaagtgaacaatagttcctttggtgagt						Run10
agtcgagttaggttgcgtaactctgggtgtgattttcactttgttatcaagaaaaccactca						
S A H P T H * ←						
<b>Q L I Q R I E T T L K V K Q *</b>						
S S S N A L R P H *						
<hr/>						
1240	1250	1260	1270	1280	1290	
ttcttccttcttctctatttgaaccctttccagttcaattctaaaactcttctagtctt						Run12
aagaaggaagaaggagataaaacttgggaaaggtcaagttaagattttgagaagatcagaa						
<hr/>						
ttcttccttcttctctatttgaaccctttccagttcaattctaaaactcttctagtctt						Run10
aagaaggaagaaggagataaaacttgggaaaggtcaagttaagattttgagaagatcagaa						
<hr/>						
1300	1310	1320	1330	1340	1350	
<i>GATA-1</i>			<i>Enhancer C/EBP</i> ▼			
aactggtgaatagtcgcttagttccttttttttcttttgggtgtaataacAGttggtgaa						Run12
ttgacaacttatcagcgaatcaaggaaaaaaggaaaaaccacaattatgtcaacaactt						
S C *						
V V E						
L L S						







**Abbildung 4.28 Alignment der Walking-Sequenzvarianten.** Mögliche Open Reading Frames (Orf) sind fortlaufend nummeriert. Ergänzungen umfassen Datenbankhomologien (mRNA- und EST-Sequenzen), Ähnlichkeiten zu promotorhomologen Motiven und cis-regulatorischen Elementen (aus NSITE) sowie konservierte Bereiche (aus NSITE oder BLAST). Weitere Erläuterungen s. Text.

#### 4.12.5 Struktur der Walking-Sequenz

Die Walking-Sequenz erstreckt sich über einen Bereich, der 18 potentielle interne Start-ATG-Codons und damit zahlreiche ineinander verschachtelte Orf-Fragmente (Orf - Open reading frame, offenes Leseraster) enthält, die durch NCBI-Orf-Finder bestätigt wurden (TATUSOV und TATUSOV, <http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>; Juni 2003), in der Mehrzahl jedoch recht kurz sind. Ein Poly-A-Signal ist nicht mehr im sequenzierten „Fenster“ enthalten. Der aufgeklärte Genomausschnitt enthält vier putative Exons (E1 bis E4). Intron-Exon-Junctions wurden mit „GenScan“ ermittelt. Eine Analyse mit dem Tool SPLICE-Predictor identifizierte darüber hinaus eine Reihe alternativer sowie eingeschränkt signifikanter Splice-Stellen. Schließt man Exon E1 als Teil eines putativen

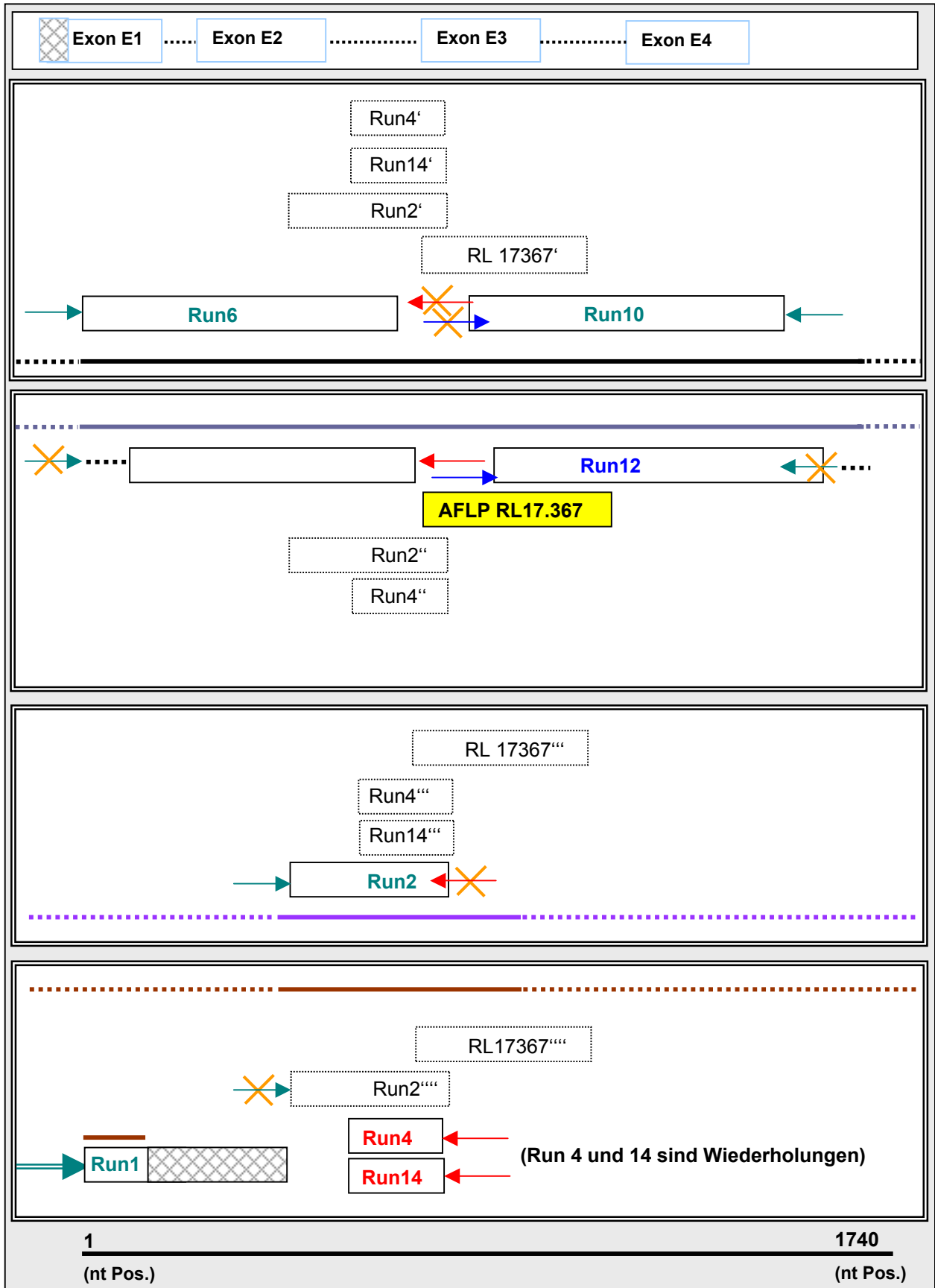
Genprodukts ein, so wäre der Startpunkt in 5'-Richtung außerhalb des sequenzierten Fensters zu erwarten, denn das Methionincodon des Translationsstartpunkts *upstream* von E1 ist noch nicht erfasst.

Konservierte Thioredoxinmotive (bestätigt durch Pfam-Analyse) zeigen sich in den Homologiestudien zuweilen bereits ab Exon E1 und sehr deutlich dann in den Bereichen von Exon E2 und Exon E4 (vgl. Abschn. 4.12.3). Beide Varianten von Exon E1 („Run1“ und „Run6“) ergeben jeweils distinkte Treffer in der BLAST-Analyse (vgl. Abb. 4.30). Dies legt die Vermutung nahe, dass jede der E1-Sequenzvarianten in *Arabidopsis*, möglicherweise auch in weiteren Pflanzenarten, ihre Entsprechung besitzt. Die durch Run6 definierte E1-Variante ist allerdings wahrscheinlich nicht funktionell, denn sie ist durch Stop-Codons verkürzt und bricht dadurch vor der Splicing-Stelle ab, sodass das abgeleitete Peptid nicht mit den Thioredoxin-domänen (Exon E2 mit dem aktiven CGPC-Zentrum und E4) verknüpft werden kann.

Das zentrale Thioredoxinmotiv reicht mit E2 über 61 Aminosäuren hinweg. Der Anknüpfungspunkt für E1 liegt unmittelbar vor dem Aktiven CGPC-Zentrum. In E2 unterscheiden sich Run6 und Run8 nur durch ein Lysin an nt-Position 502 statt des spezieübergreifend konservierten Glutamats sowie in den letzten vier Aminosäuren. Bei Run2 (möglicherweise auch Run4 und 14; der Bereich grenzt an die Adaptorsequenz und ist schlecht beurteilbar) ergibt sich eine alternative Splicing-Stelle durch einen Polymorphismus an Position 611, der die zehn letzten Aminosäuren von E2 betrifft. Mögliche topologische Implikationen dieses Polymorphismus wurden im Rahmen der PSORT-Analyse untersucht (vgl. Abschn. 4.12.9).

Exon E3 hat zu keinem konkreten thioredoxin-verwandten Protein aus Datenbankeinträgen eine Entsprechung, die ersten Aminosäuren (fett) werden jedoch durch PROSITE an Exon E2 addiert und einer Trx2-Domäne zugerechnet. Eine auf die Sequenz des Exons E3 beschränkte BLAST-Analyse ergab keine signifikanten Homologien zu sonstigen Proteinen. Die Anordnung von Aminosäuremotiven in E3 begünstigt jedoch eine helikale Topologie (Transmembransegmente, Coiled Coils gemäß HMMTOP, PSORT), sodass die Funktion dieses Exons möglicherweise in der Ausprägung einer Transmembrandomäne zu sehen ist.

Nach der Erstellung des Walking-Fragmentalignments wurden die Fragmentvarianten rückschließend von Sequenzunterschieden, Ähnlichkeiten und Überlappungen in logische Beziehung zueinander gesetzt, sodass zum Stand der Untersuchungen folgende Anordnung (Abb. 4.29) skizziert werden kann:



**Abb. 4.29 Hypothetische Anordnung der Walking Varianten relativ zueinander.**

Fragmentbezeichnungen mit durchbrochenen Rahmen und Hochstrichen (') deuten die Position nicht sequenzierter Variantensegmente relativ zum sequenzierten Fragment (Run, durchgängiger Rahmen) an. Pfeile repräsentieren Walking-Primer. Grün: Adaptorprimer AP2 und AP1 (=> Doppelpfeil). Rot: GSP2. Blau: GSP4. Schraffierte Bereiche: Sequenz noch nicht ermittelt oder nicht auslesbar. Die Lage der Exons (im oberen Teil) sowie die vermutete Relation zum gesamten Walkingbereich (entsprechend dem Balken im unteren Teil) ist angedeutet. Gelb: Markerallel AFLP RL17.367 von 'Regent'. Oranges Kreuz: keine Primerbindung/kein Amplifikationsprodukt.

**Rückschluss (1)** Der während des PCR-Verlaufs zur Erzeugung der Walking-Fragmente gewonnene Eindruck, es könnten bezüglich der genspezifischen Primerbindungsstellen Polymorphismen bestehen, bestätigte sich durch die Information des Sequenzvergleichs (vgl. Abb. 4.28, Pos. 858 bis 1053; so liegt z.B. in Run12 an der GSP3-homologen Position ein nur in dieser Variante existierendes Antioxidant Response Element). Durch die unterschiedliche Passgenauigkeit und Kombination der Walking-Primer im genetischen Hintergrund von ‘Regent‘ war es möglich, mindestens vier Varianten zu ermitteln und die zugehörigen Fragmentsequenzen klar und reproduzierbar darzustellen.

**Rückschluss (2)** Run1 lässt sich wahrscheinlich Variante 4 zuordnen: Dass die für Run1 ermittelte Sequenzreaktion zunächst sehr deutlich ist, ab ca. 300 bp jedoch unauswertbar wird und sich mit einer zweiten Sequenz zu überlagern scheint, ist erklärbar, sofern die Sequenzreaktion von Run1 tatsächlich ein „Gemisch“ aus zwei Sequenzen darstellt (Variante 2 und 4), die im vorderen, eindeutig sequenzierten Bereich übereinstimmen, aber dann divergieren (entsprechend dem unlesbaren Bereich).

Das Walking wurde am resistenten Elter ‘Regent‘ durchgeführt, doch die GSP-Primer wurden aus praktischen Erwägungen (günstige, isolierte Lage der AFLP-Markerbande) aus einem RL17.367-Fragment des Zuchtstammes 91-011-0281 abgeleitet<sup>16</sup>. Die *Mse*I-Schnittstelle, die den AFLP-Marker ermöglichte, kann in ‘Regent‘ nur in Variante 1 (Run6) identifiziert werden, jedoch binden die genspezifischen Primer nicht in Variante 1. Diese Beobachtung führt zu **Rückschluss (3)**: Der ursprünglich sequenzierte Marker AFLP RL17.367 des Zuchtstammes und die entsprechende Sequenz aus ‘Regent‘ stellen **Markerallelvarianten** dar. Möglicherweise repräsentiert die Variante des Zuchtstammes 91-011-0281 ein Markerallel von ‘Lemberger‘, was allerdings noch experimentell zu belegen wäre - ebenso wie die in Abb. 4.29 implizierte Hypothese, Kombinationen der erweiterten Sequenzvarianten stellten Allele dar. Beim momentanen Stand der Untersuchungen könnte die Anordnung der Varianten in ‘Regent‘ als heterozygotem Elter folgendermaßen aussehen:

**Chromosom 1:      Variante1\_Variante3      (Marker RL17.367 aus Variante 1)**

**Chromosom 2:      Variante2\_Variante4      (kein Marker)**

Um zu sagen, ob die Varianten in direkten Tandemwiederholungen vorliegen, müsste z.B. über variantenspezifische Southern Blots oder SCAR-Markerkartierung ihre

<sup>16</sup> In ‘Regent‘ lag das Fragment zu dicht an R17.336, dieser Marker fehlt günstigerweise in 91-011-0281.

Lokalisierung am gleichen Locus aufgezeigt werden, anschließend müsste man die Übergänge sequenzieren.

Basierend auf den geschilderten Überlegungen wurden die Sequenzvarianten Run6, gefolgt von der Markersequenz RL17.367 sowie Run8, gefolgt von Run12 für weitere Analysen vorläufig zu fortlaufenden Nukleotidabfolgen fusioniert (bezeichnet als Sequenz „Run6\_367“ und Sequenz „Run8\_12“), wie sie sich aus der kontinuierlichen Aneinanderreihung gemäß des Schemas von Abb. 4.29 ergeben würden.

#### 4.12.6 Speziesübergreifendes Alignment miteinander assoziierter Walksequenzen

Mit den in fortlaufender Logik zusammengeführten, möglicherweise allelischen Varianten 1 (Run8\_12) und 2 (Run6\_367) wurden Analysen mit TBLASTN durchgeführt. Die signifikantesten Übereinstimmungen sind in Abb. 4.30 als Alignment homologer Sequenzen verschiedener Taxa gezeigt. Eine Aufschlüsselung der verglichenen Organismen und der Bezug zu den entsprechenden Datenbankeinträgen sind ergänzend zu Abb. 4.30 in Tab. 4-14 dargestellt.

Zur Überprüfung der Ähnlichkeit zu T10P12.4 wurde ein paarweises Alignment mit dem Tool „Blast2sequences, Vers. BLASTN 2.2.6 [Apr-09-2003] (TATUSOVA und MADDEN, 1999) zwischen der Nukleotidsequenz von T10.P.12.4 aus *Arabidopsis thaliana* einerseits und

- (1) der Variante Run8\_Run12 des Walking
- (2) der Variante Run6\_367 des Walking

vorgenommen.

Signifikante Ähnlichkeit auf Nukleotidebene besteht genau im Bereich des Exons E2 ab der Splice-Stelle für Run8\_Run12 (1):

(1) Score = 104 bits (54), Expect = 1e-19; Identities = 128/165 (77%)

und im Bereich des Exons E1 für Run6\_367 (2):

(2) Score = 69.9 bits (36), Expect = 4e-09; Identities = 70/87 (80%)

Alignment 1: mit Walking-Sequenz-Variante "Run 1" [R] von Exon E1 erhaltene Blastx-Treffer

T10P12\_4 - Protein aus Arabidopsis thaliana, gesamte Länge. WAISLAIATVIGFCPTPESSGASPTLSSRLLVRSQIIRFSGVSSSTREAFPLTV (N-terminaler Startbereich, für Rebe noch nicht erfasst)

Table with multiple columns showing sequence alignments for various Arabidopsis thaliana proteins (e.g., At4g2599, At1g1240, At3g4336, etc.) against the query sequence. Includes annotations for Exon E1, OrE3, and OrF10.

Alignment 2: mit Walking-Sequenz-Variante "Run6" von Exon E1 erhaltene Blastx-Treffer

Table showing sequence alignments for Lotus japonicus proteins (Lotus japonicus; Zea mays; Oryza sativa; Medicago truncatula) against the query sequence. Includes annotations for OrF10 and OrE3.

Abkürzungen
R, Run6: Vitis-Trx-Sequenzvarianten aus dem Walking
A: Arabidopsis thaliana-Varianten

(durchnummeriert bzw. im Run6-Alignment mit Buchstaben versehen)
L: Lotus japonicus;
Z: Zea mays;
O: Oryza sativa;
T: Trichodesmium erythraeum;
M: Medicago truncatula.

Abbildung 4.28 Blastx-Homologien: Putative Thio redoxinsequenzen der Rebe (aus PCR-Walking) im Abgleich mit thio redoxinverwandten Sequenzen anderer Spezies.

Der genaue Bezug zwischen den Abkürzungen und den Datenbankeinträgen ist aus Tabelle 4-4 ersichtlich. Konservierte Aminosäuren sind fett, Aminosäuren, die in der Rebe an entsprechender Position nicht vorkommen grau gedruckt. Längere Aminosäure-Bereiche ohne Homologie sind in geschweiften Kläschen ergänzt; Basenfolgen ohne konservierte Bereiche sind durch die Angabe ihrer Länge in bp in eckigen Klammern repräsentiert. Sonstige Zahlenangaben bezeichnen Nukleotidpositionen in Datenbankeinträgen.

**TABELLE 4-14 TBLASTX-Homologien zu Thioedoxinen von Walkingbereichen.**

Indizes und statistische Größen sind gemäß BLASTX wiedergegeben. Abkürzungen in Klammern nach dem Artnamen stellen den Bezug zur Darstellung des artübergreifenden Walking-Alignments her (vgl. Abb. 4.30).

<b>Organismus/Genbank-Index</b>	<b>Art der DNA-Sequenz</b>	<b>BLAST-Kenngrößen</b>	<b>homologer Bereich</b>
<i>Medicago truncatula</i> (M) >gi 24414363 gb AC126014.5  (Fabaceae)	clone mth1-18j5, complete sequence length = 113199	Score = 149 bits (375) Expect = 4e-34 Identities = 92/171 (53%), Positives = 106/171 (61%)	Exon E1, längste beobachtete Homologie mit Orf3, Kernexon E2, und Exon E4. Konserviert: geladene aromatische Orf3-AS, v.a. Leucine)
<i>Lotus japonicus</i> (L) >gi 17736892 dbj AP004525.1  complete sequence length = 86497	genomic DNA, chromosome 5 clone: LjT08O18, TM0052b,	Score = 148 bits (374) Expect = 5e-34 Identities = 83/136 (61%) Positives = 97/136 (71%)	Exon E1, Orf3, Kernexon E2, Orf12, Exon E4
<i>Arabidopsis thaliana</i> (A1) >gi 6143885 gb AC010718.5 AC010718 complete sequence length = 87684	chromosome 1 BAC F28O16 genomic sequence,	Score = 54.7 bits (130) Expect(2) = 7e-33 Identities = 23/30 (76%) Positives = 27/30 (90%)  Score = 111 bits (277) Expect(2) = 7e-33 Identities = 59/86 (68%) Positives = 69/86 (80%)  Score = 42.0 bits (97) Expect = 0.067 Identities = 22/42 (52%) Positives = 29/42 (69%)	Exon E1  Orf3, Kernexon E2  Orf12, Exon E4
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A2] >gi 18411194 ref NM_106326.1	chromosome 1 CHR1v07142002 genomic sequence, length = 456	Score = 140 bits (354) Expect = 1e-31 Identities = 74/119 (62%) Positives = 83/119 (69%)	Exon E1, ORF3, Kernexon E2



Organismus/Genbank-Index	Art der DNA-Sequenz	BLAST-Kenngrößen	homologer Bereich
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A3] >gi 4996903 gb AC007203.3  complete sequence length = 95190	chromosome 1 BAC T10P12 genomic sequence,	Score = 141 bits (356) Expect = 6e-32 Identities = 78/120 (65%) Positives = 90/120 (75%)	Exon E1, (Orf3 fehlt), Kernexon E2
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A4] >gi 18400928 ref NM_103481.1	chromosome 1 CHR1v07142002 genomic sequence, length = 339	Score = 134 bits (336) Expect = 1e-29 Identities = 73/119 (61%) Positives = 81/119 (68%)	Exon 1 und Kernexon E2
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A5] >gi 22135796 gb AY128276.1	At1g43560/T10P12_4 mRNA, complete cds Length = 673	Score = 130 bits (328) Expect = 1e-28 Identities = 71/117 (60%) Positives = 79/117 (67%)	Exon E1 und Kernexon E2
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A6] >gi 26798714 emb AJ530454.1  ATH530454	T-DNA flanking sequence, left border, clone 209G06, Length = 701	Score = 40.0 bits (92) Expect(2) = 2e-28 Identities = 16/27 (59%) Positives = 20/27 (74%)	Exon E1
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A7] >gi 26799533 emb AJ531273.1  ATH531273 left border, clone 229G08	T-DNA flanking sequence, length = 712	Score = 111 bits (277) Expect(2) = 2e-28 Identities = 59/86 (68%) Positives = 69/86 (80%)	ORF3, Kernexon E2
		Score = 42.0 bits (97) Expect = 0.067 Identities = 22/42 (52%) Positives = 29/42 (69%)	Orf12, Exon E4
		Score = 111 bits (277) Expect = 9e-23 Identities = 59/86 (68%) Positives = 69/86 (80%)	Orf3 und Kernexon E2

Organismus/Genbank-Index	Art der DNA-Sequenz	Blast-Kenngrößen	homologer Bereich
<i>Arabidopsis thaliana</i> [A8] >gi 26797892 emb AJ529632.1  ATH529632	T-DNA flanking, sequence left border, clone 191B03, Length = 389	Score = 42.0 bits (97) Expect = 0.067 Identities = 22/42 (52%) Positives = 29/42 (69)  Score = 54.7 bits (130) (A8) Expect(2) = 2e-08 Identities = 23/30 (76%) Positives = 27/30 (90%)  Expect(2) = 2e-08 Score = 29.3 bits (64) (A8) Identities = 17/36 (47%) Positives = 22/36 (61%)	Orf10 und Exon E4  Exon E1  ORF3 und Start Kernexon E2 mit AZ
<i>Zea mays</i> [Z] >gi 21211237 gb AY108159.1	mRNA sequence PCO093529 Length = 658	Score = 130 bits (327) Expect = 1e-28 Identities = 73/125 (58%) Positives = 79/125 (63%)	Exon E1 und Kernexon E2
<i>Trichodesmium erythraeum</i> [T] >gi 23039472 ref NZ_AAAU01000002.1  JIMS101 Tery_2,	whole genome shotgun sequence, length = 238164	Score = 105 bits (262) Expect = 5e-21 Identities = 53/118 (44%) Positives = 72/118 (61%)  Score = 74.7 bits (182) Expect = 9e-12 Identities = 40/117 (34%) Positives = 63/117 (53%)  Score = 64.7 bits (156) Expect = 1e-08 Identities = 34/117 (29%) Positives = 60/117 (51%)	Exon1 und Kernexon E2  Variante Exon1 und Kernexon E2  Variante 2 Exon1 und Kernexon E2
<i>Arabidopsis thaliana</i> [Aa] A9>gi 21407326 gb AY088552.1	clone 7791 mRNA, complete sequ. Length = 597	Score = 56.6 bits (135) Expect = 2e-06 Identities = 35/109 (32%)	Run6-Homologie: Exon E1, Orf3, Kernexon E2

**4.12.7 Parallelen am Trx-Locus zwischen *Vitis vinifera* und *Arabidopsis thaliana***

Die Homologie der hier beschriebenen Trx-Genomregion der Rebe (IGGP-Gruppe 18) zu Bereichen des Genoms von *Arabidopsis* (Chromosom 1) zeigt sich im Alignment deutlich. Abgesehen von den konservierten Nukleotidfolgen der codierenden Segmente bestehen auch im Bereich der Introns Übereinstimmungen zwischen *Vitis* und *Arabidopsis* am Locus At1g43560.1 des thiothioninähnlichen Proteins T10P12.4. Sequenzdatenbankeinträge verfügbarer T-DNA-Insertionsmutanten<sup>17</sup>, die ein T10P12.4-Insert enthalten, belegen ebenfalls, dass genflankierende Regionen aus *Arabidopsis* den exonbenachbarten Rebensequenzen des Walking entsprechen, sodass man von Colinearität, vielleicht sogar von Syntenie sprechen kann.

Wie Tab. 4-15 zeigt, befinden sich in direkter Nachbarschaft des Locus At1g43560.1 bei *Arabidopsis* retroelementartige Polyproteinsequenzen. Auch für die Weinrebe ergaben sich Hinweise auf Retroelements Signaturen in der Walking-Sequenz (über Motivanalyse in MAST/MEME und NSITE), sowie schwache Homologien zu Retroelementsequenzen in BLASTN (Beispiel ein typisches LTR-Motiv an Pos. 70 des Walking).

<b>TAB. 4-15 Locus 1g43560 / AtTrx1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) in seiner BAC-Umgebung<sup>16</sup></b>				
<b>Locus</b>	<b>Protein</b>	<b>TrEMBL</b>	<b>Beschreibung</b>	<b><u>Ath Chromosome 1</u></b>
.				
At1g43160	RAP2.6			
.				
.				
	T10P12.1	Q9XIG7	(Crosslink EMBL) Integrase polyprotein	
	T10P12.2	Q9XIG6	(Crosslink PFAM) Ty3/Gypsy (LTR-type)	
	T10P12.3	Q9XIG5	Retrotransposon polyprotein (LTR-type)	
<b>At1g43560</b>	<b>T10P12.4</b>	<b>Q9XIG4</b>	<b>AtTrx1</b>	
	T10P12.5	Q9XIG3	retroelement transcriptase (non-LTR-type)	
	T10P12.6	Q9XIG2	hypothetical protein	
	T10P12.7	Q9XIG1	UDP-Glucose-Sterol-Glucosyltransferase	
	T10P12.8	Q9XIG0	hypothetical protein	
	T10P12.9	Q9XIF9	bipartite TULP transcription factor	
.				
.				
At1g48130	peroxidoredoxin			

<sup>17</sup> Die Basenfolge ist zugänglich über ein Archiv sequenzierter *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionsmutanten („A Sequence-Indexed Library of Insertion Mutations in the *Arabidopsis* Genome“. ALONSO et al., 2001; The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, USA), das mit GenBank verknüpft ist und in TIGR AGI über ein gemeinsames Interface nutzbar ist.

#### 4.12.8 Recherchen im TIGR *Vitis vinifera* Gene Index (VvGI)

Neben der globalen Analyse in Blast sollten direkte Recherchen im „TIGR *Vitis vinifera* Gene Index“ (VvGI, Mai 2003) Parallelen zu Sequenzen aufzeigen, die aus der Weinrebe isoliert und möglichst auch transkribiert werden. Mit dem Tool Wu-BLAST 2.0 (GISH, 1996-2000) greift man dabei auf ein Register tentativer Contigs aus EST- und mRNA-Sequenzen als Datenbasis zu (Banken aus verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien, z.B. ‘Cabernet Sauvignon‘; GOES DA SILVA et al., 2003<sup>18</sup>). Man erhält zusätzlich Verknüpfungen zu GenBank-Einträgen.

##### 4.12.8.1 Abgleich in VvGI mit Run6\_367: Homologie zu EST [[>grape|CB972430](#)]

Die Suchanfrage mit Run6\_367, einer kombinierten Sequenz aus Run6 und der Sequenz des AFLP-Markers RL17.367 (als mögliches Allel zur Kombination aus Run8 und Run12 eingestuften Variante) ergab im VvGI als einzigen Treffer eine mRNA aus ‘Cabernet Sauvignon‘ [[>grape|CB972430](#)] ohne erwiesene proteincodierende Funktion.

Es handelt sich um eine 130-nt-Sequenz mit 65% Identität zur Markersequenz des AFLP RL17.367 - interessanterweise bezüglich der Thioredoxinsequenz in Antisense-Orientierung. Die Sequenz deckt einen DNA-Abschnitt mit zahlreichen cis-regulativen Elementen in hoher Dichte genau im Bereich des ursprünglichen QTL-korrelierten AFLP-Fragments RL17.367 ab, liegt zwischen beiden konservierten Thioredoxin-Kernexons E2 und E4 und schließt exakt mit dem Start von E3 ab. Den Start der mRNA-Homologie markiert das repetitive Motiv MEME6. Im Walking-Alignment (vgl. Abb. 4.28) reicht die abgegliche Strecke über 105 bp. Für die Termination käme eine A-reiche Sequenz in Intron I1 mit 22 Adeninbasen auf einer Strecke von 28 Nukleotiden (außerhalb der homologen Strecke) in Frage.

In der Darstellung des Wu-BLAST-Ergebnisses (Abb. 4.31) wurde die Sequenz von Run8\_12 zur besseren Übersicht nachträglich ergänzt:

---

<sup>18</sup> Goes da Silva, F., Iandolino, A., Lim, H., Baek, J., Jones, K. and Cook, D.: Expressed sequence tags from *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' berries at various developmental stages. Unpublished (2003)



Schwache Homologie besteht zwischen einem Bereich aus Run8\_12 und einem EST aus 'Cabernet Sauvignon' [>grape|TC4048] (Abb. 4.32)

>grape|TC4048

weakly similar to GP|21595244|gb|AAM66084.1 thioredoxin (Arabidopsis thaliana), partial (82%) Length = 636.

Plus Strand HSPs: Score = 143 (55.4 bits), Expect = 4.6e-09, Sum P(2) = 4.6e-09  
Identities = 26/73 (35%), Positives = 46/73 (63%), Frame = +1 / +3

(1)

```
[Run8_12: 10 SDKPVLVDFYATWCG... (Bereich aus Exon1, von Hand nachgetragen) ]
Run8_12: 238 SNKLLV-----SRCGPCQFMVPILNEVGASLKDKIQVVKIDTEKYPSIADKYRIEALPTF 402
          SN+L+V      + CGPC+FM P      + + + D +  VKID ++ P +A ++ ++A+PTF
Cab.s. : 159 SNQLMVIDFAATWCGPCKFMPEPAVKSMASKYTD-VDFVKIDVDELDPVAQEFTVQAMPTE 335

Run8_12: 403 IIFKDGKPYDRFV 441
          ++ K GK  +R +
Cab.s. : 336 VLLKKGKELERVI 374
```

Score = 143 (55.4 bits), Expect = 4.6e-09, Sum P(2) = 4.6e-09  
Identities = 26/73 (35%), Positives = 46/73 (63%), Frame = +1/+3

(2)

```
Run8_12:799 *LYFSFG--CSICH*FIYFLCSNFFV 870
          *++F FG  C +CH  +Y L + ++
Cab.s. :435 *IFFLEGISCELCHQKLYALALSLEYL 512
```

Score = 46 (21.3 bits), Expect = 4.6e-09, Sum P(2) = 4.6e-09  
Identities = 9/26 (34%), Positives = 16/26 (61%), Frame = +1/+3

**Abbildung 4.32: Homologieanalyse mit Run8\_12 über Wu-BLAST 2.0.** Zwei Bereiche, (1) und (2), aus dem Walking zeigen Ähnlichkeit zu [>grape|TC4048], einem EST aus der Sorte 'Cabernet Sauvignon'.

Die Homologie besteht (1) im Bereich des konservierten Trx-Exons E2 einschließlich sechs der Splice-Stelle vorausgehenden Aminosäuren, sowie (2) zu einer Strecke in Orf11 (eine Splice-Stelle läge am Beginn von ORF11), die vor E4 abbricht. Das Ergebnis der Analyse wurde für die Abbildung manuell durch eine Aminosäurefolge aus Exon E1 ergänzt, die Ähnlichkeit zum Anfangsbereich der 'Cabernet Sauvignon'-Sequenz aufweist (Abb. 4.32 (1)).

Eine Erklärung für diese Ähnlichkeit wäre, dass dieser Intronabschnitt in evolutionärer Beziehung zu Exon E1 stehen könnte.

**(2) Sehr starke Homologie von Run8\_12 zu einer ‚Pinot Noir‘- mRNA,  
[CF607141.1 | GI:37187788]**

Die Anordnung einer fortlaufenden Sequenz als Kombination der Fragmente Run8 und Run12 ging als Entwurf aus dem PCR-Walking hervor. Dementsprechend hatte diese Anordnung zunächst rein hypothetischen Charakter. Die Sequenz erzielte bei der Recherche in VvGI schließlich einen Treffer mit 98% Übereinstimmung über eine Strecke von 493 Basenpaaren zu einer mRNA aus ‚Pinot noir‘ [AC: CF607141, MOSER et al., 2003]. Dies spricht dafür, dass ein transkribiertes Gegenstück existiert und der Entwurf der Realität sehr nahe kommt.

Das Alignment zu der ‚Pinot noir‘-mRNA entspricht akkurat den Thioredoxinexons E2 und E4 und erstreckt sich *downstream* über zwei weitere kurze Open reading frames (Orf13, 34 AS; Orf 14, 20 AS). Als putatives Startcodon des ‚Regent‘-Homologs der ‚Pinot noir‘-mRNA ergibt sich ein ATG in Orf1 an Pos. 120 der Walking-Sequenz.

Auf Proteinebene ergibt sich 100% Identität mit einem Splice-Produkt aus den beiden konservierten Thioredoxinexons E2 und E4 (Bezeichnung MQLE2(8)/E4, vgl. Tab. 4-16 und Abb. 4.33).

Genbank-Referenz:

```
DEFINITION  GEMMA01_000597 Grape Bud pSPORT1 Library Vitis vinifera cDNA 5',
mRNA sequence. cultivar="Pinot Noir"
ACCESSION   CF607141
VERSION     CF607141.1  GI:37187788
```

GenScan-Vorhersage eines Peptids:

```
>Pinot_TRX|GENSCAN_predicted_peptide_1|84_aa
1  MQLRRCGPCQF MVPILNEVGA SLKDKIQVVK IDTEKYPSIA DKYRIEALPT FIIFKDGPY DRFEGALTAD
   QLIQRIETTL KVKQ 84
```

PSORT-Targetinganalyse:

```
----- Final Results -----
cytoplasm          Certainty= 0.650 (Affirmative)    < succ>
mitochondrial matrix space Certainty= 0.100 (Affirmative)    < succ>
endoplasmic reticulum (membrane) Certainty= 0.000 (Not Clear)      < succ>
endoplasmic reticulum (lumen) Certainty= 0.000 (Not Clear)      < succ>
```

**Abbildung 4.33 Vorhersage eines Proteins (GenScan) und seiner subzellulären Lokalisierung (PSORT).** Die Analyseergebnisse basieren auf der zu [CF607141.1] homologen Sequenz der fortlaufenden Fragmentkombination Run8\_12, die offenbar in der Rebe transkribiert wird.

Gemäß PSORT-Vorhersage handelt es sich bei dem mittels GenScan aus der mRNA-Sequenz des Datenbankeintrags abgeleiteten Thioredoxin um ein cytoplasmatisches Protein (vgl. Abb. 4.33).

#### 4.12.9 Analyse verschiedener Splice-Kombinationen mit PSORT und HMMTOP

Aus dem Walking lassen sich zahlreiche Cis- und Trans-Splice-Kombinationen ableiten, die für hypothetische Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften stehen. Mit der in Tab. 4-16 gezeigten Auswahl wurden Analysen in PSORT (Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen) und HMMTOP (Topologieanalyse und Identifizierung putativer Transmembrandomänen) durchgeführt. Auch trunkierte Varianten, bei denen die Sequenz des jeweiligen Exon-Elements bis zum nächsten Stopcodon fortgeführt wird und auf Translationsebene dort abbricht, statt über eine Splice-Stelle mit dem Folgeelement verknüpft zu werden, sind berücksichtigt. Da der N-terminale Bereich vor E1 für die Rebe noch nicht ermittelt ist, eignen sich abgeleitete Peptide, die mit der Walking-Sequenz von E1 in dieser vorläufigen Form beginnen, momentan noch nicht für eine Vorhersage möglicher Zielorte. Dennoch sollte Exon E1 in den Analysen berücksichtigt werden, um ein vollständigeres Bild der Möglichkeiten zu gewinnen, die sich für eine Trx-Variantenbildung aus den putativen Splice-Elementen und ihren Kombinationen ergeben würde. Die Ergebnisse wurden kritisch verglichen.

■ **Exon E1** wurde aus diesen praktischen Gründen für die Analyse

- 1) komplettiert (d.h. die Rebasequenz E1 wurde mit Aminosäuren des Startbereichs von T10P12.4 gemäß Alignment zu einem „chimären“ N-terminalen Element Ara\_Rebe ergänzt.)
- 2) ersetzt. (Das Exon 1-Fragment der Rebe wurde für die Analyse komplett durch das ähnliche Exon 1 von CITRX, einem pathogenresponsiven Trx aus *Nicotiana*, ausgetauscht.
- 3) Außerdem wurde ein aus Orf10 abgeleitetes Peptid testweise an den N-Terminus gesetzt.

■ **Exon E2** wurde für die Analyse

- 1) bei N-terminaler Position durch die Start-Aminosäuren des Orf, MQL, ergänzt (wegen eines mutierten Startcodons in Run6 nur für die Run8-Variante möglich) oder
- 2) bei interner Position nur als von Splice-Stellen flankierte Sequenz eingesetzt.

Insgesamt wurden demnach vier Alternativen für die Beschaffenheit des N-Terminus untersucht, von denen drei rein experimentell und eine als ‘Pinot noir’- mRNA nachgewiesen ist. Mit den Kombinationen der in Tab. 4-16 aufgeführten Elemente (Exons E1 bis E4, ein Orf-10-Peptid), die hypothetische Genprodukte repräsentieren, wurden Analysen in PSORT und HMMTOP zur subzellulären Lokalisierung und Strukturvorhersage durchgeführt. Tab. 4-17 zeigt die Ergebnisse im Überblick.



TABELLE 4-16: Exons und Splice-Einheiten des Walkings im Überblick.

Die Ursprungs-Walkingfragmente sind durch Zahlen in Klammern repräsentiert, z.B. (6) für Run6, (8) für Run8, (8\_12) für Run8 übergehend in Run12 usw. Splice-Stellen sind durch Pfeile hervorgehoben. Fortführung der Sequenz eines Exons bis zum jeweils folgenden Stopcodon (\*) statt bis zur Splice-Stelle erzeugt verkürzte Peptidvarianten. In N-terminaler Position beginnt E2 mit den eingezeichneten Aminosäuren MQL (entsprechend des Orf-Beginns). Farbige Hervorhebung kennzeichnen Exonursprünge.

<p><b>E1 (Ara_Rebe)</b></p> <p>MAISLATAYISPCFTPESSNSASPSRTLSSVRLPSQIRRFQSVQSPSSSTRFRLT<b>VEAKKQTFSSLDELLANS</b><b>DKPVLVDFYATW</b>▼</p> <p><b>E1 (CITRX)</b></p> <p>MQAATLSFQPSAPPLQTSAPHFSSKQPNQLKYSLFSYTCPIKRSLLSTQTLRSKSICKPPDVATGKYVREDYLVKKVS AKDIQELIKGERNV<b>PLIIDFYATW</b>▼</p> <p><b>E1 (1)</b></p> <p>▼<b>VEAKKQTFSSLDELLANS</b><b>DKPVLVDFYATW</b>▼</p>
<p><b>Orf10 (8)</b></p> <p>▼</p> <p>MMSTEFSCCIYTMHGFCWASGMYSGTIVKSDTWLCHCTFDCIFLLVLSATSLFIFLCLISLLEFLSDEFQEGALTADQ LIQRIETTLKVKQ*</p>
<p><b>E2 (6)</b></p> <p>▼</p> <p>* <b>RCGPCQFMVPILNKVGASLKDKIQVVKIDTEKYPSIADKYRIEALPTFIIFKDGKPKIAI</b>*▼</p> <p><b>E2 (8_2) a und E2 (8_2) b</b></p> <p>▼</p> <p><b>MQLRCGPCQFMVPILNEVGASLKDKIQVVKIDTEKYPSIADKYRIEALPTFII</b><b>SKAGKPYDRE</b><b>VGIRILYAL</b>* b▼ a▼</p> <p><b>E2 (8)</b></p> <p>▼</p> <p><b>MQLRCGPCQFMVPILNEVGASLKDKIQVVKIDTEKYPSIADKYRIEALPTFIIFKDGKPYDRE</b><b>VGIRILYAL</b>*▼</p>
<p><b>E3 (8_12)</b></p> <p>▼</p> <p><b>ANLTLAMTQFLGFSSCSTGLVFYSTLTLKLYFFTGLANEGFLFGIGDDVYRIFLLHLYNAWFCLRYVQWHHSQIVTLG</b> CVTVLLIVFFFWLFYLPVLYLFFMF*</p> <p><b>E3 (6_367)</b></p> <p>▼</p> <p><b>ATLTCNDQSSSFLVALALVLHTFDSIELYFFTGLANEGFLFGIGEMSTEFSSAFIQCMVGPQ</b>▼<b>VCTVAP</b>*</p> <p><b>E3 (2)</b></p> <p>▼</p> <p><b>ANLTLAMTQFLGFLLSSTGLVFTHFDSIRIILFHGISQ</b>*</p>
<p><b>E4 (12=10)</b></p> <p>▼</p> <p><b>EGALTADQLIQRIETTLKVKQ</b>*</p>

TABELLE 4-17

**Ergebnisse der Analyse verschiedener Splice-Kombinationen mit HMMTOP und PSORT**

Splice-Kombinationen sind gemäß Tab. 4-5 zusammengestellt. Trunkierte Varianten (Einbau des Elements bis zum Stopcodon statt bis zur Splice-Stelle) sind durch T markiert.

Weitere Abkürzungen: TMH – Transmembranhelices; TRX – Thioredoxinregion des Aktiven Zentrums.

Splice-Kombination	Bemerkung	Anzahl TMH (HMMTOP)	Domäne i/a (innen/außen)	Lokalisierung (PSORT)
MQLE2 (8_2) a/E3 (8) /E4		TMH:2	TRX i E4 i	Peroxisom
MQLE2 (8_2) a/E3 (6) /E4		TMH:0		Cytoplasma
MQLE2 (8_2) a/E3 (8) T	kein E4	TMH:3	TRX i	ER-Membran
MQLE2 (8_2) a/E3 (6) T	kein E4	TMH:0		Cytoplasma
MQLE2 (8_2) a/E3 (2)	kein E4	TMH:1	TRX i	Peroxisom
MQLE2 (8_2) b/E3 (8) /E4		TMH:2	TRX i E4 i	Peroxisom
MQLE2 (8_2) b/E3 (6) /E4		TMH:1		Cytoplasma
MQLE2 (8_2) b/E3 (8) T	kein E4	TMH:3	TRX o	ER-Membran
MQLE2 (8_2) b/E3 (6) T	kein E4	TMH:1	TRX i	Cytoplasma
MQLE2 (8_2) b/E3 (2)	kein E4	TMH:1	TRX i	Peroxisom
MQLE2 (8) /E3 (8) /E4		TMH:2	TRX i E4 i	Peroxisom
MQLE2 (8) /E3 (6) /E4		TMH:0		Cytoplasma
MQLE2 (8) /E3 (8) T	kein E4	TMH:3	TRX o	ER-Membran
MQLE2 (8) /E3 (6) T	kein E4	TMH:0		Peroxisom
MQLE2 (8) /E3 (2)	kein E4	TMH:1	TRX o	Peroxisom
MQLE2 (8) E4	kein E3	TMH:0		Cytoplasma

**Übersicht der Ergebnisse N-terminal tentativer Varianten**

<b>Orf10 (8) -Peptid ...</b>	bis 4 TMH bis 3 TMH ohne E3	alle Peroxisom,
außer:		
Kombinationen mit ...E3 (8) T		innere Mitoch.Membr.
Kombinationen mit ...8_2/E4		Chloropl.Stroma
<b>E1 (Ara_Rebe) ...</b>	bis 4 TMH	alle Chloropl.Stroma,
außer:		
Kombinationen mit ...E3 (8) T		Chloropl.Thylak.Membr.
<b>E1 (CITRX) ...</b>	bis 4 TMH	alle Chloropl.Stroma,
außer:		
Kombinationen mit ...E3 (8) T		Chloropl.Thylak.Membr.

Folgende Rückschlüsse lassen sich aus der topologischen Vorhersage mit HMMTOP und PSORT ziehen:

■ **E1** Proteinvarianten mit einem Exon E1 am N-Terminus tendieren offenbar ins *Chloroplastenstroma*. Dies gilt für das gemäß T10P12.4 komplettierte E1-Konstrukt (Arabidopsis/Rebe) sowie für Exon E1 aus CITRX. Ausnahme: bei Abbruch mit E3(8) ist eine Verankerung in der *Thylakoidmembran* begünstigt.

■ **Orf10 (8)** Varianten, die mit dem Peptid Orf10(8) beginnen, lokalisieren in die Peroxysomen. Ausnahme: wenn die Peptidkette mit E3(8) abbricht, ist der Zielort die *innere Mitochondrienmembran*.

■ **MQL-E2** Varianten die mit MQL-E2 beginnen, lokalisieren

- 1) ins *Cytoplasma*, wenn E3 fehlt, die Run6-Variante von E3 mit E4 gekoppelt wird oder MQL-E2 in ein C-terminal trunkeiertes Exon E3 übergeht,
- 2) in die *ER-Membran*, wenn das Protein nach einer alternativ gespleißten kürzeren Form von E3 abbricht
- 3) sowie in allen anderen Fällen in die *Peroxysomen*.

Der Einbau von Exon E3 ist für die *Fähigkeit zur Ausbildung von Transmembranhelices* unerlässlich, außer die Proteine starten mit dem hypothetischen Orf10 – Peptid, das ebenfalls Transmembranhelices ermöglichen würde.

Endet das Peptid mit der Run8-Variante von E3 [E3(8)T], so wird eine Membranverankerung prognostiziert (innere Mitochondrienmembran beim Orf10-Peptid, ER-Membran bei MQLE2, Thylakoidmembran bei E1 Ara\_Rebe und CITRX).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Molekulare Marker und Kartierung

#### 5.1.1 Erzeugung von Mikrosatelliten-Markern

##### 5.1.1.1 Eignung der VMC-Mikrosatelliten-Primer für 'Regent' x 'Lemberger'

Eine große Zahl SSR-Primer des „Vitis Microsatellite Consortium“ konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Genotypisierung der Kreuzungspopulation verwendet werden. Dies belegt die grundsätzliche Eignung der meisten dieser Primerpaare für sortenübergreifende Studien.

Statistisch betrachtet ist eine sechzehn Basen umfassende Sequenz auf einer Strecke von 4<sup>16</sup> Basenpaaren Länge (ca. 4000 Mbp) einmal vorhanden. Dies entspricht ungefähr der Größe des Maisgenoms<sup>19</sup> und der achtfachen Größe des Rebgenoms. VMC-Primer sind in der Regel 20 bis 25 Basenpaare lang; deshalb bindet der Wahrscheinlichkeit gemäß jedes Primerpaar theoretisch nur an einem einzigen Locus im Genom.

Je nach individuellem VMC-Primerpaar wurden Ergebnisse unterschiedlich guter Qualität mit 'Regent' x 'Lemberger' - Individuen bzw. den Eltern erzielt; es kann sich dabei um einen Effekt der sortenabhängigen „Passgenauigkeit“ der VMC-Primer in einem anderen genetischen Hintergrund als dem ihrer jeweiligen Ursprungsorte handeln. In Einzelfällen wurde mehr als ein Locus amplifiziert - ein weiteres Argument für die Notwendigkeit eines Parentalscreenings. Problematische Primerpaare wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

##### 5.1.1.2 PCR mit fluoreszenzmarkierten SSR-Primern

In der Regel entspricht der Fingerprint mit fluoreszenzmarkierten Primern genau der unmarkierten Reaktion. Gelegentlich trat bei der Amplifikation bestimmter Primer mit Fluoreszenzmarkierung allerdings der bekannte Effekt auf, dass von zwei SSR-Allelen ausschließlich ein einziges zuungunsten des zweiten amplifiziert wird (VEENSTRA-VAN DER WEELE et al., 1997). Dies wiederum würde für einen Einfluss der Fluoreszenzgruppe auf die PCR (Stabilisierung unspezifischer Bindung, sterische Effekte) sprechen. In solchen Fällen wurde das Genotyping unmarkiert über silbergefärbte Polyacrylamidgelen vorgenommen.

---

<sup>19</sup> Zitiert nach COYNE VE et al. (1996) *Molecular Biology Techniques Manual*.  
<http://www.uct.ac.za:80/microbiology/pcroptim.htm>, 12. 04. 1998

### **5.1.2 Verwendbarkeit der AFLP-Primer aus dem eingesetzten Plant Mapping Kit**

Die von PE Applied Biosystems erhältlichen Standardprimer für die Analyse von Mikroorganismen wurden angesichts des vergleichsweise kleinen Rebgenoms getestet und erwiesen sich als geeignet für die Genotypisierung der Weinrebe: es handelt sich um AFLP-Zielamplifikationsprimer mit zwei selektiven Nukleotiden bzw. Basen-„Überhängen“. Diese führten im Größenfenster zwischen 30 und 500 bp, dem Standard für die Kapillargelelektrophorese mit dem ABI Prism GA 310, zu einer guten Auflösung. Die AFLP-Methode war sehr gut reproduzierbar. Der Anteil sporadisch bei Individuen der Kreuzungspopulation auftretender Banden bewegt sich anteilig unter 1 Prozent.

## **5.2 Diskussion der Kartierungsergebnisse**

### **5.2.1 Die molekulare Markerkarte als Voraussetzung für die QTL-Kartierung und Vergleichsstudien**

Zum Zweck der QTL-Kartierung sind möglichst umfangreiche Modellpopulationen grundsätzlich wünschenswert. Diese Anforderung stößt im Fall der Rebe durch praktische Erwägungen, die die Kultivierung einer Kreuzungspopulation betreffen (Platzbedarf, Pflege, Generationszeiten, Finanzierbarkeit) an gewisse Grenzen, wie sie generell für Untersuchungen an mehrjährigen Holzgewächsen in Kauf zu nehmen sind.

Die ‘Regent’ x ‘Lemberger’-Populationsgröße von 153 Individuen übertrifft zahlenmäßig zuvor veröffentlichte Kartierungsprojekte an Weinreben (LODHI et al., 1998; DALBÓ et al., 1999, DOLIGEZ et al., 2002). Erste Kartierungsvorhaben wurden an Populationen im Umfang von 50 – 80 Individuen unternommen. Es handelte sich dabei um amerikanische Genotypen wie ‘Cayuga White’ und ‘Aurore’ (LODHI et al., 1995), um Wildarten chinesischen Ursprungs (LUO et al., 2001) oder um Tafeltrauben - in letzterem Fall mit dem Hauptaugenmerk auf der Kernlosigkeit (DOLIGEZ et al., 2002).

Für vergleichende Kartierungsstudien stehen gegen Ende dieser Arbeit Karten folgender Genotypen zur Verfügung: ‘Cayuga White’ (1196 cM), ‘Aurore’ (1477 cM; LODHI et al., 1995), ‘Horizon’ (1199 cM), ‘Illinois 547-1’ (1470 cM; DALBÓ et al., 2000), ‘Moscato bianco’ (1639 cM), ‘Vitis riparia’ (1518 cM; GRANDO et al., 2002), ‘Dattier de Beyrouth’ x ‘75Pirovano’ (1639 cM) und ‘Alphonse Lavallée’ x ‘Sultanine’ (1908 cM; DOLIGEZ et al., 2002).

### 5.2.2 Evaluierung der Kartierungsprogramme JoinMap®3.0 und MAPMAKER/EXP3.0

JoinMap®3.0 erlaubt eine benutzerfreundliche Erzeugung molekularer Markerkarten; es kommt daher bei vielen Kartierungsprojekten an der Weinrebe weltweit zum Einsatz. Durch die schwerpunktmäßige Verwendung von JoinMap®3.0 für die Kartierung der Population ‘Regent’ x ‘Lemberger’ entsprechen die im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Markerkarten der Weinrebe einem internationalen Konsens und sind deshalb zum Zweck des wechselseitigen Informationsaustauschs und –gewinns besonders gut geeignet.

Neben JoinMap®3.0 wurde auch MAPMAKER/EXP3.0 eingesetzt, ein Programm, das etwas anders arbeitet. JoinMap®3.0 erstellt als Default „Projektionschromosomen“, reduziert in der Darstellung homologe Kopplungsgruppenpaare also auf den einfachen Satz. MAPMAKER/EXP3.0 hingegen erstellt bei der separaten Verrechnung eine genetische Karte im doppelten Chromosomensatz unter Beibehaltung der Information über die Haplotypen. Von der Analysesoftware JoinMap ist bekannt, dass sie im Vergleich zu Mapmaker geringere Centimorgandistanzen zwischen benachbarten Markern errechnet (CAI et al., 1994). Gelegentlich wechseln einzelne Marker ihre relative Position zueinander („Dreher“, insbesondere im Vergleich verschiedener Kartenvarianten) oder es bilden sich Kopplungsgruppen mit einer „Symmetrie-“ oder „Spiegelachse“. Diese Effekte beobachtet man insbesondere im Rahmen der JoinMap®3.0-vermittelten Erstellung einer kombinierten Karte beider Eltern zuweilen. Statt eine Eingliederung problematischer Marker zu erzwingen, ist es sinnvoller, eine Zuordnung eines solchen Markers zur Karte über Zweipunktanalyse bzw. Assignment vorzunehmen (RÍAZ et al., 2004), denn manche Marker lassen sich in der Mehrpunktanalyse nicht oder nur unter starker Verzerrung der Centimorgandistanzen in den linearen Kontext bringen. Als Artefakt entstehen im Bereich des Konfliktmarkers „Spreizungen“ der relativen cM-Abstände als Verfremdungseffekt.

Auch im Fall einer überdurchschnittlichen Rekombinationsfrequenz kann die Karte eine nicht der Realität entsprechende Dehnung erfahren. Die Untersuchungen von FU et al. (2002) zeigten, dass retrotransposonreiche Regionen nur wenig, eventuell sogar gar keinen Beitrag zur apparenten genetischen Kartenlänge leisten.

Beide verwendeten Kartierungsprogramme können in gegenseitigem Abgleich Ambivalenz in der Markerlokalisierung und Artefakte sichtbar machen und teilweise kompensieren. Mit MAPMAKER/EXP3.0 errechnete Kopplungsverhältnisse verstehen

sich im Rahmen dieser Arbeit als Kontrolle und Zusatzinformation zur JoinMap®3.0-basierten Karte.

## **5.2.3 Stand der Kartierungsuntersuchungen gegen Ende der Dissertation**

### **5.2.3.1 Separat erzeugte Karten beider Eltern**

Mit hoher Stringenz von LOD 8 konnten 43% der erfassten ‘Regent’-Marker und 31% aller erfassten ‘Lemberger’-Marker zu einer gesicherten Rahmenkarte („Framework“) für die anschließende QTL-Analyse angeordnet werden. Nach Fusionierungen und Kombination von Information aus allen integrierten und separaten JoinMap®3.0- und MAPMAPER/EXP3.0-Verrechnungen reduzierte sich die Anzahl apparenter Kopplungsgruppen für beide Eltern auf 19. Die Sättigung der Karte, erkennbar an der Auflösung einer Kopplungsgruppenanzahl, die der realen Chromosomenzahl der Weinrebe entspricht, wäre demnach erreicht. Eine durchschnittliche Auflösung von 4,8 cM (‘Regent’) und 7 cM (‘Lemberger’) für benachbarte Marker konnte erzielt werden. Für als saturiert geltende Karten anderer Pflanzenarten, die mit weitaus lockereren Stringenzvorgaben (LOD 2-4) errechnet wurden, sind Werte in der gleichen Größenordnung publiziert; so beispielsweise 6,6 cM für *Zea mays* (CASTIGLIONI et al., 1999) und 7,5 cM für *Citrus* (CAI et al., 1994; SANKAR und MOORE, 2001).

Die Mikrosatellitenmarker erwiesen sich als nicht auffällig geclustert. Trotz einer insgesamt recht gleichmäßigen Genomabdeckung konnten eine Kopplungsgruppe von ‘Regent’, und fünf ‘Lemberger’-Gruppen bisher nicht mittels Ankermarkern definiert werden, sodass in diesen Fällen noch kein Abgleich mit der Referenzkarte von RÍAZ und MEREDITH möglich war.

*EcoRI/MseI* – AFLP- Marker scheinen im Fall der Rebe ebenfalls gleichmäßig über das Genom verteilt zu sein, obwohl AFLP-Markern in anderen Spezies eine vom Zufallsprinzip abweichende Lage attestiert wird; dabei soll sich der Einfluss des Selektionsdrucks in typischer Weise auf den Erhalt von Restriktionsenzymzielstellen in einem gegebenen Genom auswirken (HERBERGS et al., 1999).

### **5.2.3.2 Die Frage der unterschiedlichen Anzahl kartierter Marker beider Eltern**

Dass die genetische Kartenlänge des männlichen Elters ‘Lemberger’ im Vergleich zu den Resultaten für die Mutterpflanze etwas geringer ausfällt, insbesondere aber dass 38% weniger Marker auf ‘Lemberger’ entfallen, kann mit dem genetischen Hintergrund der Sorten zu tun haben. ‘Regent’ besitzt einen komplexen Stammbaum, der zahlreiche

Kreuzungsschritte zwischen Europäersorten und sieben Wildarten an der Basis einschließt (vgl. FISCHER et al., 2004), während ‘Lemberger‘ als Traditionssorte bestimmter Anbaugebiete gilt und an vielen Loci homozygot sein soll (REGNER, pers. Mitt.).

### **5.2.3.3 Homologer Abgleich der separaten Karten beider Eltern und Fusionieren von Kopplungsgruppen**

Das Homologisieren aus getrennter Verrechnung hervorgehender Karten und Kartenvarianten sowie das Fusionieren kleinerer Kopplungsgruppen zu größeren chromosomalen Einheiten über Anker- oder Brückenmarker ist nützlich, wenn es um detailliertere Aussagen zur Nachbarschaft von Loci zueinander – besonders über „Kartierungslücken“ hinweg - geht.

„Single-Locus“-Marker wie SSR bzw. Mikrosatelliten oder CAPS-Fragmente funktioneller Gene können homologe Regionen identifizieren und ermöglichen ein lineares Alignment verschiedener Karten. Sie sind auch wichtige Grundlage sortenübergreifender Analysen. Die genauere Kenntnis der Markerabfolge kann die Orientierung bei Genomwalking und Contigstellung verbessern.

### **5.2.3.4 Homologisierungen mit den Kopplungsgruppen der IGGP-Referenzkarte**

Rückschließend von gemeinsam platzierten SSR-Loci wurde eine weitgehende Übereinstimmung der ‘Regent’- und der ‘Lemberger’-Karten der vorliegenden Untersuchung untereinander sowie mit den 20 Kopplungsgruppen des IGGP-Entwurfs beobachtet. Zusätzlich erlauben die Ergebnisse der ‘Regent’ x ‘Lemberger’-Kartierung den nächsten Schritt über die IGGP-Karte hinaus: Indem sie das Fusionieren der IGGP-Kopplungsgruppen 1 und 2 ermöglichen, ergibt sich auch in dieser Referenzkarte die für die Weinrebe letztlich zu erreichende Anzahl von 19 Kopplungsgruppen.

### **5.2.3.5 Erstellung einer Konsensuskarte aus kombinierter Verrechnung der Markerinformation beider Eltern**

Grundsätzlich besteht bei MAPMAKER/EXP3.0 und JoinMap®3.0 gleichermaßen die Möglichkeit, eine integrierte Konsensus- oder Projektionskarte errechnen zu lassen. Die Markerinformation beider Eltern wird dabei von den Kartierungsprogrammen kombiniert. In der Regel lässt sich so die Auflösung erhöhen. Was eine solche mathematische Projektion nicht leisten kann, ist, die Distanzgenauigkeit der getrennt



erstellten Karten beider Eltern in der beschriebenen kombinierten Darstellung gleichzeitig zu erhalten. Höhere Markerdichte geht bei dieser Art der Kartierung u. U. auf Kosten der Centimorgan-Genauigkeit und umgekehrt.

Die integrierten Kopplungskarten von MAPMAKER/EXP3.0 und JoinMap®3.0 zeigten in der Markerabfolge recht gute Übereinstimmung. In MAPMAKER/EXP3.0 ergaben sich unter den gleichen Kartierungsbedingungen (systembedingt) oft kleinere Teilfragmente der in JoinMap®3.0 erhaltenen Gruppen.

### 5.2.3.6 Anmerkungen zur Vererbung der Beerenhautfarbe

Ein genetischer Faktor der Beerenhautfarbe, im Rahmen der ‘Regent’ x ‘Lemberger’ - Kartierung als nicht-quantitatives, morphologisches Merkmal (rot/weiß) erfasst, liegt rückschließend vom Segregationsverhältnis 3:1 bei beiden Eltern heterozygot vor und konnte der SSR-charakterisierten genetischen Region (bezeichnet durch den Marker VMC2c10.1) zugeordnet werden, die der Lokalisierung in der Karte von DOLIGEZ et al. (2002) entspricht. Der Locus liegt in beiden Fällen auf einem anderen Chromosom (auf L13 bzw. der Fusionsgruppe aus IGGP1/2) als der Locus der UFGT<sup>20</sup> (auf IGGP4). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Vererbung der Beerenhautfarbe nicht unbedingt auf den polymorph kartierten UFGT-Locus zurückzuführen ist. Die UFGT-Expression des Kultivars ‘Shiraz’ untersteht während der Reife im Vergleich zu anderen Enzymen der Anthocyaninsynthese einer gesonderten Regulation (BOSS et al., 1996), also könnte dem kartierten Beerenhautfarbe-Locus beispielsweise eine regulatorische Rolle für die Ausprägung der Beerenhautfarbe zukommen (FISCHER et al., 2004). KOBAYASHI et al. (2001) vermuten, dass durch Mutation entstandene Varianten eines Regulators der UFGT für den Phänotyp rot/weiß verantwortlich zu sein scheinen.

### 5.2.3.7 Mit MAPMAKER/EXP3.0 zusätzlich erreichte Fortschritte

Die ergänzende Analyse mit MAPMAKER/EXP3.0 als zweiter Kartierungssoftware erscheint auf den ersten Blick unorthodox, erweiterte jedoch das mit JoinMap®3.0 gewonnene Bild um nützliche Aspekte:

- Die Charakterisierung „stabiler“ Chromosomenbereiche ohne Markerpositionswechsel erhärtete sich.
- Die hinzugewonnene Information erleichtert die kritische Beurteilung der Markerarrangements, die noch Ambivalenz aufweisen und „in Bewegung“ sind.

- Erst die Verwendung von MAPMAKER/EXP3.0 führte bei ‘Regent‘ zur Identifizierung des AFLP-Fragments RL17.367 als eng mit der Resistenz gegen *Plasmopara viticola* gekoppeltem Marker. RL17.367 erlaubt es als wichtiger Brückenmarker, die zu einem Major-QTL von ‘Regent‘ homologe Chromosomenregion in ‘Lemberger‘ zu lokalisieren. Dieser Marker war Ausgangspunkt für die anschließende Identifizierung eines putativen Thioredoxins.

Insgesamt zeigte die lineare Abfolge der Marker beim Vergleich der Ergebnisse beider Programme gute Übereinstimmung.

### 5.3 Diskussion der QTL-Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation konnten QTLs für Pilzresistenz sowie für weitere weinbaulich relevante Merkmale ermittelt werden. Bei der gegebenen Populationsgröße von 153 Individuen waren typischerweise ein bis drei Major-QTL mit LOD-Werten über 15 für Merkmale, die den Donorelter besonders charakterisieren, auf ein bis drei Kopplungsgruppen identifizierbar.

#### 5.3.1 Quantitative Effekte der Resistenz

##### 5.3.1.1 Spezifische Major-Resistenz-QTL

Im Verlauf der Kartierungsstudie kristallisierte sich heraus, dass die Haupteffekte der Resistenz gegen *Uncinula necator* und *Plasmopara viticola* spezifisch und unabhängig voneinander vererbt werden, denn die betreffenden Major-QTL-Effekte lagen auf verschiedenen Kopplungsgruppen und wiesen keine Korrelation untereinander auf (vgl. FISCHER et al., 2004).

Die Resistenz gegen *Uncinula necator* manifestierte sich mit Klarheit, Stabilität und hoher Signifikanz auf Gruppe R16 in einer Region hoher Markerdichte als Major-QTL, der den überwiegenden Teil der phänotypischen Variation erklärt. Die deutliche Ausprägung weist auf eine tragende Rolle dieser Region bei der Resistenz gegen den Echten Mehltau hin.

Es zeichnet sich zum Stand der Untersuchungen ab, dass die Resistenz gegen *Plasmopara viticola* offenbar nicht nur auf einem einzigen bestimmenden Hauptfaktor beruht. Starke quantitative Resistenzeffekte gegen *Plasmopara viticola* erstrecken sich in Form von zwei Major-QTL über einen recht weitgesteckten Bereich von 55 cM der

---

<sup>20</sup> Die UDF-Glucose-Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase (UFGT) ist das letzte Enzym der Anthocyanbiosynthese.

Kopplungsgruppe R9 und auf R10 über einen 25 cM umfassenden Abschnitt zwischen RN181500 und R06208. In Korrelation zu dem auf R10 endständig als CAPS kartierten *Prunus* Major Allergen-Homolog ergibt sich darüber hinaus noch ein mäßig stark ausgeprägter Resistenzeffekt gegen *Plasmopara viticola*, der jedoch aufgrund von Schwankungen und lediglich mittlerer Konsistenz nicht als Major-QTL-Effekt gewertet wird. Major Allergen-ähnlichen Proteinen wird strukturelle Verwandtschaft zu pathogenese-bezogenen Proteinen attestiert (COUTOS-THEVENOT et al., 2001). Wie MARINO et al. (2003) zeigten, befinden sich QTL für *Plasmopara viticola*-Resistenz bei *Vitis riparia* offenbar ebenfalls auf zwei Kopplungsgruppen. Ein Genotyp dieser Wildart kann als potentieller Resistenzdonor für 'Regent' fungiert haben.

Zur Frage der Spezifität der Resistenzeffekte lässt sich ergänzen, dass im Bereich der Major-QTL die grundsätzliche Abwehrkompetenz organübergreifenden und die Ausprägungsstärke organspezifischen Charakter hat. Auf anderen Kopplungsgruppen treten einzelne Resistenzeffekte organspezifisch auf.

### 5.3.1.2 Organspezifische oder unspezifische Resistenz

Für *Uncinula necator* wie für *Plasmopara viticola* scheint es, wie geschildert wurde, jeweils eigene Haupt-Resistenzfaktoren zu geben, die weitgehend unabhängig voneinander vererbt werden. Nun soll betrachtet werden, ob und in wieweit die erregerspezifischen Abwehrreaktionen verschiedener Pflanzenorgane miteinander zusammenhängen.

Die stärksten QTL-Effekte der Resistenz, die an Blatt und Beere separat evaluiert wurden, entfallen auf die jeweils gleiche Chromosomenregion und erlaubten über die Lokalisierung von organübergreifenden Major-QTL die Charakterisierung von zwei „*Plasmopara*-Gruppen“ und einer „*Uncinula*-Gruppe“. Für die *grundlegende Fähigkeit* zur erregerspezifischen Abwehr scheint daher bei Blatt und Beere die Expression gemeinsamer Komponenten eine Schlüsselrolle zu spielen, Organ und Art der Bonitur sind offenbar irrelevant für einen großen Anteil der ermittelten Resistenz.

Es gibt auch Argumente, die für die Organspezifität einiger erfasster Resistenzeffekte sprechen. Betrachtet man die Intensität der QTL-Effekte an verschiedenen Organen, so ergeben sich im Vergleich der Datensätze für die Erfassungsjahre 1995, 1999 und 2000 am Beispiel der *Uncinula*-Resistenz  $Un^R$  (1) und der *Plasmopara*-Resistenz  $Plv^R$  (2) folgende LOD-Maxima (s. Tab. 5-1):

TABELLE 5-1

Vergleich der organotypischen LOD-Maxima für *Uncinula* ( $Un^R$ ) - und *Plasmopara* ( $Plv^R$ )-Resistenz aus drei Erfassungsjahren.

LOD	LOD	LOD
(1)		
$Un^R$ Beere '95: 35,4	$Un^R$ Beere '99: 47,8	$Un^R$ Beere '00: 28,5
$Un^R$ Blatt '95: 11,7	$Un^R$ Blatt '99: 18,8	$Un^R$ Blatt '00: 22,2
(2)		
$Plv^R$ Beere '95: 13,3	$Plv^R$ Beere '99: 12,3	$Plv^R$ Beere '00: 17,11
$Plv^R$ Blatt '95: 17,2	$Plv^R$ Blatt '99: 19,7	$Plv^R$ Blatt '00: 18,6

Die Unterschiede sind nicht gleichsinnig; eine Ableitung systematischer Zusammenhänge (horizontal: zwischen LOD-Wert und Erfassungsjahr bei konstantem Bezug auf Blatt bzw. Beere, vertikal: zwischen LOD-Werten verschiedener Organe bei konstantem Bezug auf das Erfassungsjahr) ist nicht möglich. Dies spricht für die Unabhängigkeit der apparenten Resistenz der Beere von der des Blatts und damit für eine organbezogene Ausprägungsstärke (unter Berücksichtigung wechselnder Umweltbedingungen). Ein weiteres Argument für eine zumindest teilweise organspezifische Natur der Resistenzausprägung ist die Beobachtung, dass Effekte an Blatt und Beere als QTL auch separat voneinander in Erscheinung treten. Beispiele sind 'Regent'-Kopplungsgruppe 2 mit einem vollständig konsistenten  $Un^R$ -Effekt der Beere, jedoch keinem Effekt am Blatt und 'Regent'-Kopplungsgruppe R8 mit signifikanten Werten für  $Plv^R$  der Beere bei sechs von sieben Datensätzen, aber keinem Effekt am Blatt (vgl. Tab. 4-6).

### 5.3.1.3 Unspezifische und leichtere QTL-Effekte

DALBÓ (1998) zeigte, dass die Resistenz gegen *Phyllosticta ampellicida* mit den drei stärksten QTL für die *Uncinula*-Resistenz sowie einem QTL für die Resveratrolproduktion gekoppelt ist und lieferte damit ein Beispiel dafür, dass Resistenz-QTL der Rebe pathogenübergreifend ausgeprägt sein können.

Die QTL-Kartierung an 'Regent' x 'Lemberger' erlaubte es, auf einigen Kopplungsgruppen Regionen mit unspezifisch erhöhter Resistenz gegen zwei oder alle drei untersuchten Schadpilze, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator* und *Botrytis cinerea*, zu identifizieren. Hier zeichnet sich die Existenz gemeinsamer Komponenten der Abwehr (möglicherweise ganz allgemein: der Stressantwort) ab.

So kennzeichnet das als CAPS kartierte Weinrebenhomolog des Prunus-Major-Allergens (Markerbezeichnung „Aller“) bei 'Regent' auf R10 eine chromosomale

Region, die gleich stark ausgeprägte, organübergreifende Korrelationen zu unspezifischer Resistenz gegen *Plasmopara viticola* und *Uncinula necator* erkennen lässt (jeweils LOD 6). Viele pflanzliche Allergene besitzen Ähnlichkeit oder Homologie zu PR-Proteinen (Pathogenesis-related proteins), die ihrerseits durch verschiedene Arten von physiologischem Stress (Verwundung, klimatische Faktoren) und insbesondere bei Schaderregerbefall induziert werden. (BREITENEDER et al., 2000). Das Prunus-Major-Allergen zählt zu den PR10-ähnlichen Proteinen, einer Familie, die unter der Kontrolle pathogen-induzierbarer Promotoren steht (COUTOS-THEVENOT et al., 2001). Inwieweit dieser Locus ursächlich an der Ausprägung des QTL-Effekts beteiligt ist, muss sich noch erweisen.

### 5.3.2 Quantitative Effekte zu Reife und Ertrag

Reifeparameter stehen naturgemäß in engem Zusammenhang zu Umweltbedingungen, die von Jahr zu Jahr mehr oder minder variieren können. Dadurch zu erwartende Schwankungen in den LOD-Werten treten in der Population 'Regent' x 'Lemberger' deutlich in Erscheinung. Die niedrigsten Werte ergaben sich für 1999. In diesem Jahr, für das eine andauernde Trockenperiode in den Monaten Juli und August zu verzeichnen war (Klimadaten vgl. Tab. 4-1), lagen die LOD-Werte für das Einsetzen der Beerenreife im Fall der Kopplungsgruppen 8, 12, 18 und 20 beispielsweise im nicht signifikanten Bereich knapp unter LOD 2.

Auch für die Major-QTL wurden 1999 die schwächsten Korrelationen beobachtet, dennoch bleiben die Werte hier konsistent im signifikanten Bereich und insgesamt betrachtet auf einem hohen Niveau (zwischen LOD 6 und 38 auf Gruppe R1, LOD 3 und 43 auf Gruppe R6 sowie LOD 3 und 41 auf R11). Dass sie durch Umwelteinflüsse nicht überdeckt werden, betont, dass sie als verlässlich gelten dürfen.

Das Einsetzen der Reife wird offenbar erheblich durch genetische Faktoren auf den drei genannten Kopplungsgruppen beeinflusst, kann also möglicherweise züchterisch kontrolliert werden.

### 5.3.3 Diskussion überlappender QTL-Effekte

Häufig wird die Co-Lokalisierung von QTL auf einer Markerkarte zwar als Zeichen einer gemeinsamen genetischen Komponente zweier Effekte bewertet, konkretere Rückschlüsse werden in Publikationen jedoch meistens vermieden (LOUDET et al., 2003), denn physiologische Zusammenhänge lassen sich selten auf Anhieb und nie mit

hundertprozentiger Sicherheit aus QTL ableiten, sondern zunächst nur als Hypothese formulieren. LEFEBVRE und PALLOIX (1996) konnten zeigen, dass sowohl epistatische als auch additive Effekte an der polygen vermittelten induzierbaren Resistenz der Paprika gegen *Phytophthora capsicii* L. beteiligt sind. Ein Teil der Problematik, epistatische Interdependenz zu erkennen, bleibt jedoch oft bestehen und setzt der Interpretation von QTL in Wechselwirkung miteinander ebenso Grenzen, wie Maskierung und Dominanz (WEBER, 2002).

Detaillierte Aussagen über den Grad wechselseitiger Beeinflussung zwischen QTL, insbesondere solchen auf verschiedenen Kopplungsgruppen, reichen über den für die vorliegende Arbeit gesteckten Rahmen hinaus. Sie können in der Regel erst durch spezielle statistische Analysen festgestellt und quantifiziert werden. Eine Möglichkeit hierzu, das „Association Mapping“, ist als Methode noch nicht lange etabliert und bisher nur für *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* erprobt (FLINT-GARCIA et al., 2003). Dabei wird nicht nur die Korrelation eines einzelnen QTL-Effekts mit einer bestimmten Markerregion (und co-lokalisierende Effekte), sondern das simultane Auftreten bestimmter QTL-Effekte (als Zeichen von Kopplungsungleichgewicht zwischen Allelen mehrerer Loci) relevant und statistisch bewertet.

Überlappende QTL-Effekte oder parallele Verläufe von QTL-Profilen konnten in der vorliegenden Arbeit für eine Reihe von morphologischen Merkmalen, Resistenz- und Reifefaktoren beobachtet werden. Diese Ergebnisse sollen nun vor dem Hintergrund physiologischer Aspekte erläutert werden. Der hypothetische Charakter der folgenden Betrachtungen bleibt dabei vorerst zu betonen.

#### **5.3.4 Resistenz und Reifeprozess weisen Berührungspunkte auf, kartieren jedoch nur teilweise zusammen**

Die Major-QTL-tragende „*Uncinula*-Gruppe“ (R16) sowie beide „*Plasmopara*-Gruppen“ (R9 und R10) sind völlig frei von QTL für das Einsetzen der Beerenreife oder Beerengröße. Auf allen Gruppen mit Major-QTL für Veraison befinden sich jedoch mittelstarke QTL für *Uncinula necator*-Resistenz (R1: LOD 8, R6: LOD 6, R11: LOD 5) und auf den Gruppen mit weniger deutlich ausgeprägten QTL für Beerenreife auch *Plasmopara*- Resistenz-Effekte (R8, R12, R18, R20; vgl. Tab. 4-6). Daraus folgt, dass die stark als QTL in Erscheinung tretenden Effekte der Resistenz nicht mit genetisch determinierten Faktoren gekoppelt sind, die den Reifezeitpunkt beeinflussen, dass die stärksten QTL für das Einsetzen der Reife jedoch mit leichteren Resistenzeffekten

korrelieren. Dass manche physiologischen Phänomene bei Reife und Stress Überschneidungen aufweisen (auch bezüglich ihres Proteinexpressionsmusters, z.B. bei verringerter Wasseraktivität und osmotischem Stress oder Verwundung (DENEKAMP und SMEEKENS, 2003)) bietet Ansatzpunkte für eine Interpretation der beobachteten gemeinsam lokalisierten QTL-Effekte.

Eine Besonderheit bei Weintrauben ist das Zellwachstum bei *gleichzeitigem* Weichwerden der Beeren (TATTERSALL et al., 1997). In diesem Stadium spielen Zellwandumstrukturierungen eine entscheidende Rolle, an denen u.a. Hydrolasen, hydroxyprolinreiche Glycoproteine (Grips, Grape ripening related proteins) beteiligt sind. Sie sorgen für die durchgehende Integrität der Zellwand und können damit nicht nur bei der Beerenexpansion sondern auch für die pathogenbedingte Perforierbarkeit von Bedeutung sein (NUNAN et al., 2000).

Der zunehmende Zuckergehalt macht reifende Beeren zu einem attraktiven Substrat für Pilze. Es konnte gezeigt werden, dass das Fruchtreife-Hormon Ethylen die Keimung von Konidien, das Wachstum von Hyphen und die verstärkte Ausbildung von Appressorien stimuliert (KOLATTUKUDY et al., 1995), was als Anpassung pilzlicher Pathogene an den Wirtsorganismus zu werten ist. Reifende Beeren bilden ihrerseits verstärkt abwehrraktive Substanzen wie Resveratrol und bauen dadurch eine latente (systemische) Abwehrbereitschaft auf (BAIS et al., 2000). Man kann daneben beobachten, dass während der Reife PR-Proteine angehäuft werden, z.B. Major Allergens/Ribonucleasen (PR-10), 1,3-beta-Glucanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3 u. 4), thaumatin-/osmotinartige antifungale Proteine (PR-5) u.a. (SALZMAN et al., 1998; EBNER et al., 2001). Sie stellen mengenmäßig den Hauptanteil an löslichen Proteinen in schädlingsbefallenem Gewebe und am Gesamtprotein reifer Beeren. Eine unmittelbare Rolle dieser Proteingruppe beim Reifeprozess ist zwar nicht bekannt, allerdings sind Pflanzen, die PR-Proteine früh und unabhängig von Pathogenelicitoren exprimieren, schon im Vorfeld gegen künftigen Pilzbefall gewappnet (ebd.). Die Expression solcher Proteine verläuft parallel zur Zuckerakkumulation und Erweichung der Frucht, wobei der zeitliche Verlauf mit der Resistenz der Beeren gegen *Uncinula necator* korreliert (TATTERSALL et al., 1997). Zum Beginn der Veraison sind diese Proteine noch nicht in relevanten Mengen vorhanden.

Dies kann vorläufig erklären, was sich in der QTL-Betrachtung abgezeichnet hat: dass Reife und Resistenz im Zusammenhang stehen können, ohne dass der Zeitpunkt des Einsetzens der Beerenreife bei allen beteiligten Prozessen eine erkennbare Rolle spielen muss.

### 5.3.5 Nutzung von QTL zur Sicherung von Hypothesen aus Feldbeobachtungen

#### **Beispiel 1: Erkennen von negativer Korrelation und Vermeidung von Konflikten bei der Auslese**

Statt gleichsinniger Profilverläufe können sich über die QTL-Co-Lokalisierung auch zueinander gegenläufige Tendenzen abzeichnen. Zu beobachten ist dies an den Profilen für „*Uncinula necator*-Resistenz“ und „Beerengröße“ auf R16 (s. Abb. 4.14). Möglicherweise gibt es an der Basis dieses QTL Faktoren, die die Resistenz erhöhen, sich aber negativ auf die Beerengröße auswirken können - unter Umständen ein Ausschluss-Kriterium, wenn man etwa an die Tafeltraubenzüchtung denkt, bei der es gleichzeitig auf Resistenz *und* Beerengröße ankommt. Kenntnis über negative Korrelationen kann vermeiden helfen, dass bei der Selektion auf spezielle Genombereiche verschiedene züchterische Zielsetzungen kollidieren.

#### **Beispiel 2: Erkennen von Sekundäreffekten: Charakterisierung der *Botrytis*-Toleranz**

Die QTL-Analyse kann zur Klärung komplexer Zusammenhänge beitragen, wie das folgende Beispiel zeigt; es handelt sich dabei um die Frage, ob die *Botrytis*-Toleranz als reiner Sekundäreffekt zu werten ist.

Die genetische Basis der *Botrytis*-Toleranz wird als **sekundärer Effekt der Traubenarchitektur** diskutiert (VIII. International Conference of Grape Genetics and Breeding, Kecskemet, 2002). Der Grundgedanke dabei ist die bessere Luftzirkulation durch ein lockeres Traubengerüst.

Ein genetischer Bezug zwischen *Botrytis*-Toleranz und Traubendichte (maximal LOD 3) tritt im entsprechenden chromosomalen Abschnitt der Kopplungsgruppe R16 (Abb. 4.14) nicht mit nennenswerten Effekten in Erscheinung. Von der Datenlage her ist es jedoch überhaupt schwierig, etwas über die Rolle der Traubendichte zu sagen; dies könnte mit der Ausprägung dieses Merkmals im genetischen Hintergrund von ‘Regent’ x ‘Lemberger’ zusammenhängen.

In der Literatur existieren auch Hinweise auf andere, genetische Komponenten der Toleranz gegenüber nekrotrophen Schadpilzen. STEEL et al. (2001) beschreiben in direkter empirischer Herangehensweise die elicitorabhängige, unterschiedlich stark ausgeprägte Stilbensynthesekapazität an vier Rebsorten und verschiedenen Entwicklungsstadien. Dabei ergibt sich eine deutliche negative Korrelation zwischen der *Botrytis*-Anfälligkeit und der Stilbenproduktion. Der gleiche Effekt wird allerdings auch durch intensive UV-Strahlung hervorgerufen. Beide Reiz-Reaktionsketten scheinen über



gemeinsame Komponenten zu verlaufen, die mit dem Flavonoidstoffwechsel in Zusammenhang stehen (vgl. S. 34f). *Botrytis*-Toleranz könnte also auch **Sekundäreffekt einer unspezifischen Reaktion auf spezielle Umweltbedingungen** sein.

*Botrytis* befällt die Weinrebe häufig durch Eintrittspforten, die durch eine vorausgegangene *Uncinula necator*-Infektion entstanden sind. Ein guter Zustand bezüglich *Botrytis* muss also nicht heißen, dass die Pflanze einen spezifischen Abwehrmechanismus gegen diesen Pilz besitzt. Die These, dass ein vermeintlicher *Botrytis*-Toleranz-QTL vielleicht lediglich einen **Sekundäreffekt der *Uncinula*-Resistenz der Beere** abbildet, erscheint demnach ebenfalls plausibel.

Analog zu diesen Überlegungen liegt der stärkste *Botrytis*-Toleranzeffekt in der Tat auf der „*Uncinula*-Gruppe“. Abbildung 4.14 zeigt jedoch, dass die zugehörigen QTL-Profile nicht parallel verlaufen: In der Region der *Uncinula*-Resistenz-Maxima bleiben die LOD-Scores für die *Botrytis*-Toleranz auf kaum signifikantem Niveau. Seine höchsten Werte erreicht der *Botrytis*-Toleranz-QTL erst zwischen 43 und 53 cM, einer Region, die vor allem durch ein starkes Maximum für „**Beerengröße**“ geprägt ist.

Die zunehmende Beerengröße korreliert mit dem Weichwerden der Früchte (DAVIES und ROBINSON, 2000) und ohne den morphologischen Schutz der Beerenhärte ist mit einem erhöhten Infektionsrisiko zu rechnen. Wäre die *Botrytis*-Toleranz als reiner Sekundäreffekt der *Uncinula*-Resistenz zu werten, so wäre ein paralleler Verlauf beider QTL-Profile über die gesamte Länge des Chromosoms mit übereinstimmenden Maxima zu erwarten, entsprechendes gilt für die Beerengröße. Alle beobachteten *Botrytis*-Maxima traten jedoch - in Abhängigkeit vom Erfassungsjahr – parallel mit *einzelnen* Maxima der Kategorien „Veraison“ oder „Beerengröße“ (R1 und R6), „Beerenzahl pro Traube“ (R16) sowie Resistenz (R9 und R16) auf.

Die Bewertung der genetischen Komponente der *Botrytis*-Toleranz wird zusätzlich erschwert durch die Modifizierung des unmittelbaren Einflusses eines Pathogens auf die Pflanze durch weitere Interaktionen in der komplexen Freilandsituation:

#### ■ Wechselwirkungen zwischen Symbionten und Pathogenen der Rebe

Der Befall der Weinrebe durch pathogene Pilze wird nicht nur durch Abwehrreaktionen der Wirtspflanze, sondern auch durch pilzliche Antagonisten erschwert. Gut untersucht sind z.B. Hefen als nicht-pathogene Besiedler der Oberfläche von Früchten, die symbiotisch leben und *Botrytis* u. U. vollständig unterdrücken (MASIH et al., 2000).

### ■ Wechselwirkungen zwischen Stilbenproduktion der Rebe und verschiedenen pathogenen Pilzen

Der biotrophe Schaderreger *Uncinula necator* gehört nicht in die Reihe der Pilze, deren Wachstum durch Stilbene gehemmt wird. *Uncinula necator* ist vielmehr sogar in der Lage, die Stilbenformation der Wirtspflanze aktiv zu induzieren. In einer Studie an sieben Rebsorten wurde in allen Fällen ein signifikant erhöhter Gehalt an Piceidisomeren und Transresveratrol in positiver Korrelation zur Infektion mit *Uncinula necator* nachgewiesen (ROMERO-PEREZ et al., 2001). Unter komplexen Freilandbedingungen macht dies strategisch Sinn: im Fall einer Sekundärinfektion steht *Uncinula necator* mit *Botrytis cinerea* im Wettbewerb um die begrenzten Ressourcen des befallenen Gewebes, so nutzt der Pilz pflanzliche Abwehrmechanismen zu seinem Wettbewerbsvorteil.

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich phänotypische *Botrytis*-Toleranz wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel von Faktoren ergibt, die mit der Traubenarchitektur, aber auch dem Reifezeitpunkt und der Interaktion mit biotrophen Pathogenen in Beziehung stehen und die bei wechselnden Umweltfaktoren variieren können. Die QTL-Analyse unterstreicht die Überlegungen, die zu dieser Einschätzung geführt haben, sodass die *Botrytis*-Toleranz letztendlich wohl als Sekundäreffekt klassifiziert werden kann. Es wäre jedoch kein Sekundäreffekt eines einzelnen Kriteriums, sondern einer Reihe möglicher physiologischer Ursachen und Umweltinteraktionen, was dieses Merkmal für die Züchtung schwer kontrollierbar machen dürfte.

Beispiel 1 und 2 illustrieren, wie die QTL-Analyse bei Langzeit-Zuchtprogrammen zur Risikobewertung und Erfolgsprognose beitragen kann. Auch wenn das Nachzeichnen solcher Verzahnungen auf genetischer Ebene nichts prinzipiell Überraschendes für praxiserfahrene Züchter birgt, kann die Co-Lokalisierung von QTL aufschlussreich sein, denn der Vergleich der LOD-Profile identifiziert neben überlagernden auch einzeln auftretende lokale Maxima. Mit der teilweisen Entkopplung von Beerengröße, Reifezustand, Traubenbeschaffenheit und Pilzsensitivität erlaubt die Betrachtung von QTL demnach die schwierige Abgrenzung einander berührender Effekte.

Während im Fall der Interaktion der Weinrebe mit *Botrytis cinerea* noch viele Fragen offen sind, weiß man über die *Botrytis*-Toleranz von Modellpflanzen bereits Genaueres, denn hier sind die Untersuchungen zwischenzeitlich auf der Ebene von Kandidatenloci angelangt, und durch *in vitro* Studien sind freilandtypische Umweltinteraktionen ausgeblendet worden.

Beispielsweise wirkt sich bei *Arabidopsis* der pflanzliche *Esa1*-Locus auf die Signaltransduktion über reaktive Sauerstoffspezies aus und mündet auf biochemischer Ebene in einer beschleunigten Phytoalexinsynthese. Dabei wird bei gleichbleibender Resistenz gegen biotrophe Schaderreger eine (*Esa-1* - abhängige) Modulation der Widerstandsfähigkeit gegen *Botrytis cinerea* beobachtet. (TIERENS et al., 2002). Die Beeinflussung des Abwehrstatus durch Sauerstoffradikale wäre eine Gemeinsamkeit zur hypersensitiven Reaktion, die nach der zitierten Quelle jedoch unabhängig reguliert wird.

Dies würde auch substantziell erklären, warum QTLs verbesserter *Botrytis*-Toleranz mit Resistenzeffekten gegen die Mehltäupilze co-kartieren können, obwohl die hypersensitive Reaktion kein gezielt bei der Abwehr nekrotropher Pilze wirkender Mechanismus ist. Der Nachweis, die Kartierung und die sortenübergreifende Charakterisierung von Genen wie einem *Esa-1*-Homolog der Weinrebe zur Erforschung der *Botrytis*-Toleranz wäre unter diesem Aspekt interessant.

## **5.4 Ausblick für den züchterischen Nutzen der identifizierten Major QTL**

### **5.4.1 Introgression von Major-QTL in Analogie zum „Monogen“**

Dass die Haupteffekte der Resistenz im Fall von *Plasmopara viticola* und stärker noch von *Uncinula necator* auf der Kopplungskarte recht klar auf ein oder zwei Gruppen verteilt sind, kann weitere Kreuzungsschritte sowie zukünftiges Monitoring erfolgreicher Introgression erleichtern. Die kompakte Struktur der beobachteten Resistenz-Major-QTL-Regionen hat den Vorteil, dass man nicht auf komplizierte Rekombinationsmuster selektieren muss, sondern den Erbgang größerer Chromosomeneinheiten verfolgen kann. Die QTL-Analyse liefert brauchbare Ergebnisse besonders dann, wenn die an einem Effekt beteiligten Gene als enger Block im Genom vorliegen und damit wie ein Major-Gen vererbt werden (WEBER, 2002). Dies erwies sich in praktischen Untersuchungen auch bereits als richtig, wie z.B. BÖRNER et al. (2000) für den Major QTL „Pflanzenlänge“ beim Roggen zeigen konnten und lässt auch im Fall der analysierten Resistenzeffekte der Weinrebe auf Erfolg bei der züchterischen Nutzung hoffen.

Die Markerdichte in den QTL-Bereichen wird gegenwärtig weiter erhöht. Möglicherweise ergibt sich bei verbesserter Auflösung der Markerkarte in diesen Genomabschnitten ein noch klareres Bild, falls Einzeleffekte durch schärfere Abgrenzung deutlicher werden, jedoch spielt die Markerabdeckung des Genoms ab einer gewissen Markerdichte für die Praktikabilität der markergestützten Selektion nur noch eine untergeordnete Rolle (MELCHINGER, 2002).

## 5.4.2 Markergestützte Lokalisierung von Resistenzloci anderer Genotypen in ‘Regent’ x ‘Lemberger’ als Möglichkeit

Ein Beispiel für einen beschriebenen Resistenzlocus aus komplexen Wildarten und für damit verknüpfte Grundlagenstudien zur Mehlttauresistenz der Rebe ist der monogen vererbte *single Locus Run1* (Resistance Uncinula), der an *Muscadinia rotundifolia* untersucht wurde (BOUQUET et al., 2000). Die biochemische Basis dieses Locus ist allerdings noch nicht bekannt.

*Muscadinia rotundifolia* ist eine Gattung, die aufgrund ihrer von *Vitis vinifera* abweichenden Chromosomenanzahl für die Züchtung nicht ohne weiteres zur Verfügung steht (VILJOEN und SPIES, 1995). Komparative Markerstudien können in Zukunft jedoch herangezogen werden, um den *Run1* entsprechenden Bereich - im Falle seines Vorhandenseins - in weiteren Sorten wie z.B. ‘Regent’ zu lokalisieren, mit dort bereits identifizierten QTL abzugleichen und im Sinne der markergestützten Introgression (DEKKERS und HOSPITAL, 2002) für die Einkreuzung in neue Sorten verfügbar zu machen.

Über gemeinsame Marker könnte es auch gelingen, die Region eines *Plasmopara viticola* - Major-Resistenzlocus aus *Vitis quinquangularis*, einer Wildart des asiatischen Raumes, mit den in ‘Regent’ kartierten *Ph<sup>R</sup>*-QTL in Beziehung zu setzen, obwohl direkte Kartierungsversuche über einen eng gekoppelten RAPD/SCAR (LUO et al., 2001) bislang erfolglos waren (FISCHER et al., 2004).

## 5.5 Diskussion der QTL-basierten Fragmentanalysen

### 5.5.1 Auswahlkriterien

Marker in enger Beziehung zu QTL-Maxima wurden für Analysen auf Sequenzebene ausgewählt. Aus einem Polyacrylamidgel wurden insgesamt 15 Banden isoliert, jedoch konnte aus nachfolgend erläuterten Gründen nicht für alle Fragmente die Sequenz aufgeklärt werden.

Für die zentral im Bereich eines Major-QTL-Maximums mit Resistenz gegen *Uncinula necator* gelegenen Marker R9.167 und R9.173 war keine eindeutige Einzelbanden-reamplifikation möglich, was möglicherweise auf repetitive Segmente zurückzuführen ist. Um den zeitlichen Rahmen nicht zu sprengen, wurde für diese Dissertation nur mit denjenigen Fragmenten weitergearbeitet, die sich nach der Gelelution bereits im ersten Versuch als Einzelbande reamplifizieren ließen. Problematische Marker wie die bereits genannten R9.167 und R9.173 sowie eine Reihe weiterer Fragmente, die aufgrund ihrer

engen Korrelationen mit QTL und hoher LOD-Scores für die markergestützte Selektion interessant gewesen wären, müssten erst über Klonierung/*E.coli*-Passage und Einzelklonpräparation der Sequenzierung zugänglich gemacht werden. Bevor dann eine SCAR-Marker-Entwicklung in Frage kommt, wäre anschließend die Sequenz über den repetitiven Bereich hinaus zu erweitern, um für eine PCR unproblematische Primer-Zielsequenzen ableiten zu können.

### **5.5.2 AFLP-Fragmentsequenzen mit codierenden Segmenten**

Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen aus den untersuchten Markerfragmenten und codierenden DNA-Abschnitten aus Datenbankeinträgen, die mit den im Methodenteil angegebenen Bioinformatik-Programmen identifiziert wurden, umfassen meist nur eine kurze Sequenzstrecke bzw. einzelne Motive. Sie dienen als Anhaltspunkt, um einige Fragmente für weiterführende Untersuchungen auszuwählen.

#### **5.5.2.1 Analyse des AFLP-Markers R17.186 (Proteinase-/TF-Motiv)**

R17.186 kartiert auf Kopplungsgruppe R6, es handelt sich um einen starken Marker in zentraler QTL-Korrelation für Veraison und Beerenzahl. Die Sequenz enthält einen konservierten Bereich mit struktureller Verwandtschaft zur PfpI-Familie intrazellulärer Proteinase bzw. der araC-Familie von Transkriptionsfaktoren (TF). Der Bereich kann als Ausgangspunkt für ein Walking zur Erschließung der Fragmentumgebung dienen, um zu zeigen, ob das Motiv möglicherweise Teil eines Exons ist und funktionelle Bedeutung hat, zumal 96% Identität zu einem speziell in reifenden Beeren exprimierten EST besteht.

#### **5.5.2.2 Analyse des AFLP R8.266 (enthaltene Tag1-Homologie)**

Die Analyse des Resistenz-QTL-korrelierten AFLP R8.266 ergab in der BLASTN- und BLASTX-Analyse streckenweise Homologie zu einer Sequenz aus pflanzlichen Tag1-Transposons (FRANK et al., 1997). Es wäre aus mehreren Gründen interessant, das Vorhandensein eines Transposons dieses Typs in der Rebe zu untersuchen und das Retroelement gegebenenfalls zu klonieren:

- 1) Die aufgetretene Homologie verweist mit Tag1 auf einen der wenigen bislang beschriebenen Vertreter autonomer aktiver Transposons, die in *Nicotiana* und *Arabidopsis* somatische Excision zeigen (FRANK et al., 1997; DONG et al., 2001).
- 2) Es wäre aufschlussreich, zu sehen, ob das Element bei 'Regent' in einem funktionell relevanten Genombereich inseriert ist und ob das Element bei verschiedenen Sorten stets am gleichen Locus vorkommt.

3) In einer am Institut für Rebenzüchtung angelegten EST-Bank der Sorte 'Regent' ist ein Klon erfasst, der ein Insert mit Homologie zu Tag1 aus *Arabidopsis thaliana* enthält. Der Abgleich betrifft allerdings einen anderen Bereich von Tag1 als bei AFLP R8.266. Ließe sich vor dem Hintergrund eines Einzelbandennachweises im Southern Blot ein Zusammenhang zwischen dem Tag1-ähnlichen EST und AFLP R8.266 herstellen, so hätte man ein potentiell aktives singuläres Retroelement in einem polymorphen QTL-Bereich für Resistenz lokalisiert.

Ob die Markersequenz selbst sich unmittelbar für ein Screening bezüglich des Resistenz-QTL und einer Charakterisierung anderer Sorten eignet, ist jedoch noch fraglich - etwa, falls im Bereich der Retroelementsignatur Polymorphismen vorliegen würden. Für Tag1 aus *Arabidopsis* beispielsweise sind kurze variable Abschnitte in den subterminalen Bereichen, die mit dem Transpositionereignis im Zusammenhang stehen, typisch (DONG et al., 2001). Beim Ableiten von SCAR-Markern wäre dieser Punkt zu bedenken und variable Bereiche gegebenenfalls über Sequenzkontrolle von der Primerentwicklung auszuschließen. Vor einer SCAR-Primer-Entwicklung aus dem Marker wäre auch die Sequenzcharakterisierung weiterer Sorten am R8.266-homologen Locus sinnvoll.

### 5.5.3 AFLP-Fragmentsequenzen mit Motiven cis-regulatorischer Elemente

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Analogien zu cis-regulatorischen Motiven kommen häufig als Kernbestandteile elicitor- und/oder lichtinduzierbarer Arrangements vor. Sie wurden über NSITE und/oder BLAST identifiziert.

Für manche cis-regulative Boxen gilt, dass ihre relative Anordnung für ihre Wirkungsweise in einem bestimmten Kontext von Bedeutung ist, in anderen Fällen spielt dieser Punkt eine völlig untergeordnete Rolle. Es gibt Beispiele für Motive, die in verschiedenen Orientierungen die gleiche Funktion ausüben, andere wiederum wirken abhängig von ihrer Lage unterschiedlich. Eine Übersicht bieten WHITBRED und SCHULER (2000). Sind charakteristische regulatorische Boxen in kartierten Markersequenzen enthalten, so können sie einen Anlass bieten, die Fragmentsequenz durch PCR-Walking zu erweitern, um benachbarte Gene aufzufinden.

#### 5.5.3.1 Analyse des AFLP R2.177 (vierfache E-Box, G-Box, MADS-Box u.a.)

- *Sp1*-Bindungsstellen und das Vorkommen einer *USF* (Upstream Stimulating Factor) - Zielsequenz im Fragment weisen auf die Möglichkeit der relativen Nähe zu

einem Strukturgen hin. Putative TATA- und CAAT-Boxen (im Abstand von 35 nt) sind ebenfalls vorhanden.

■ Der Marker enthält ein vierfaches E-Box-Motiv. Die E-Box, ein pflanzliches elicitor-responsives Element, ist konserviert und in Nachbarschaft zur TATA-Box stress-induzierter Phenylpropanoidgene zu finden, so auch z.B. in pflanzlichen PAL-1-Promotorbereichen. E-Box bindende Transaktivatoren sind in kooperativ organisierten regulatorischen Komplexen eingebunden. Die Deletion der E-Box aus entsprechenden Promotoren, z.B. dem der CCoAOMT (Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase) bewirkt den Verlust ihrer Elicitierbarkeit (GRIMMIG und MATERN, 1997). Das E-Box-Motiv des Fragments R2.177 entspricht gemäß der Analyse mit NSITE der (dort in nur einer Kopie vorhandenen) E-Box des Caffeoyl-CoA-O-Methyltransferase-Promotors (CCoAOMT) der Petersilie (ebd.). Interessanterweise kommt die E-Box im AFLP-Fragment R2.177 in vierfacher Wiederholung (als Teil eines um 6 bp längeren Motivs) vor, wobei die erste Kopie mit einem zusätzlichen Nukleotid eine leichte Variante darstellt. Promotorstudien zeigten, dass leichte Variationen in der Nukleotidfolge tandemartig auftretender cis-regulatorischer Elemente sowie der relative Abstand der Einzelmotive zu benachbarten Repressor- oder Aktivatorbindesequenzen zu einer gewebespezifisch differentiell modulierbaren Expression führen (KRANER et al., 1999). Zu der Frage, ob es sich um repetitive Sequenzen mit zufälliger Ähnlichkeit zu diesem cis-regulatorischen Element handelt, lässt sich zum Stand der Untersuchungen lediglich feststellen, dass über Elicit-E-Boxen enthaltende Retroelemente, LTRs o.ä. explizit bislang nicht berichtet worden ist.

■ In Nachbarschaft der TATA-Box ist im AFLP R2.177 außerdem eine theoretische Bindungsstelle für *Mcm1*-Faktoren vorhanden. *Mcm1*-Homologe sind MADS-Box-Transkriptionsfaktoren, die durch Knicken der DNA die Bildung eines transkriptionsaktivierenden ternären Komplexes initiieren (LIM et al., 2003) und von denen man weiß, dass sie bei MAPK- wie auch cAMP-Kaskaden entscheidend beteiligt sind (ROTTMANN et al., 2003). Eine Kopplung der Genregulation an den Calciumstatus der Zelle ist über *Mcm1*-Homologe möglich (LOMBARDIA et al., 2002). Abrupt über spezielle spannungs- oder redoxempfindliche Channelproteine geänderte lokale Calciumkonzentrationen gehören zu den schnellsten und effizientesten Signalprozessen überhaupt; auch bei der Expression der Ionenkanal-Gene selbst spielen solche Faktoren erwiesenermaßen eine Rolle (ebd.).

Als weitere cis-regulatorische Elemente der AFLP2.177-Region sind zwei G-Box-Motive mit putativer Rolle bei der Stressantwort zu nennen, die hier zweifach (um ein Nukleotid gegeneinander verschoben in beiden Strängen) als Teil eines cAMP-Response-Elements in Erscheinung treten. Diese Anordnung ist für die Zielsequenz von Repressoren des Typs *Sko1p* beschrieben (WU und TRUMBLY, 1998). Ein solcher cAMP-Response-Element-bindender Repressor, seinerseits auf mehreren Ebenen reguliert, reprimiert unter Normalbedingungen (kein Stress) im Kern die cAMP-abhängige Genexpression. Auf ein Stresssignal hin wird dieser bZIP-Transkriptionsfaktor durch eine MAP-Kinase aktiviert und in dieser Form aus dem Kern vorübergehend ins Cytoplasma verbracht, sodass die Blockade cAMP-abhängiger Gene im Zellkern aufgehoben ist (PASCUAL-AHUIR et al., 2001). Die Response-Elementsequenz überschneidet sich im zitierten Literaturbeispiel mit einer *MSN4*-binding Site, mit *MSN4* als potentielltem Antagonist von *Sko1p* (WU und TRUMBLY, 1998). Im isolierten AFLP-Fragment fällt die ebenfalls vorhandene „*MSN4*-binding Site“ mit einer Upstream Stimulating Factor-Sequenz (*USF*, Typ ADH2) zusammen.

Im Fall des Fragments R2.177 wurde aufgrund des vom Zufall abweichenden Arrangements regulativer Elemente ein PCR-Walking angestrebt, um ein möglicherweise assoziiertes Gen zu finden. Das Vorhaben erwies sich jedoch aufgrund des repetitiven Charakters der Zielsequenz und ihrer Kürze als nicht ohne weiteres durchführbar.

### 5.5.3.2 G-Box-artige Motive [CA (A) CGTG]

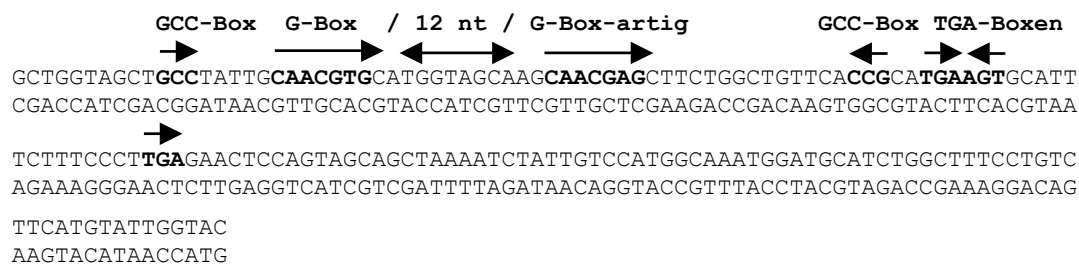
G-Boxen kommen außer in R2.177 noch in AFLP-Fragment R17.186 vor, einem Marker in Korrelation zu einem Major QTL für das Einsetzen der Reife und Beerenzahl, sowie auch in RL17.367 und R13.152, die beide mit Resistenz korrelieren.

Die G-Box-bindenden Faktoren (GBF) gehören zur Gruppe der bZIP-Proteine, einer Klasse von Transkriptionsfaktoren mit basischem Leucin-Zipper-Motiv. Sie sind typisch für stressresponsive Pflanzengene (PAUL und FERL, 1998). DNA-Zielstellen besitzen die Basenfolge CA(A)CGTG bzw. die Minimal-Konsensussequenz ACGTG. Kombinatorische und kompetitive Interaktionen über G-Boxen sind zur Kontrolle von Crosstalk geeignet (SCHINDLER et al., 1992) und so befinden sich in der Nähe oft Zielstellen für weitere DNA-bindenden Faktoren. Hierzu zählen typischerweise weitere G-Box-ähnliche Elemente (MENKENS et al., 1995), TGA-bindende Faktoren (in abscisinabhängigen Elementen; TUCKER et al., 2002) oder IBF (I-Box bindende Faktoren in lichtregulierten Elementen; BORELLO et al., 1993). Je nach Grad der



Abweichung von der Core-Sequenz und flankierender Bereiche kommen stärkere oder schwächere Interaktionen zwischen DNA und Protein zustande. In Abhängigkeit vom Promotorkontext können binäre G-Box-artige Elemente positive oder negative regulatorische Einheiten darstellen (MENKENS et al., 1995). BÜTTNER und SINGH (1997) berichten, wie bZIPs und EREBPs (ethylenresponsive Elemente bindende Proteine) über die G-Box und die GCC-Box in Wechselwirkung treten. Diese Kombination ist typisch für eine Reihe von PR-Genen und wurde beispielsweise bei der  $\beta$ -Glucanase und einer Chitinase der Tomate nachgewiesen (ebd.). Ein Beispiel für eine solche Konstellation findet sich in der Sequenz des AFLP-Fragments K17.186 (s. Abb. 5.1):

#### R17.186



**Abbildung 5.1** Ausschnitt aus der Fragmentsequenz R17.186  
Pfeile heben die Lage cis-regulatorischer Motive relativ zueinander hervor.

Die beiden G-Box-artigen Elemente des Fragments R17.186 sind durch genau 12 Basen getrennt. Binäre G-Boxen in dieser Anordnung wurden zunächst als Promotorelemente von Pflanzenpathogenen identifiziert. Sie gleichen den Ocs-Elementen (FELDBRÜGGE et al., 1994), Vertreter einer Familie stark positiv wirkender regulatorischer Sequenzen, die ursprünglich im regulatorischen Bereich der Octopinsynthese von *Agrobacterium* (daher ocs) beschrieben wurden (BOUCHEZ et al., 1989). Sehr ähnliche Arrangements kommen aber auch in pflanzlichen Promotorsequenzen vor (ELLIS et al., 1993), z.B. beim lichtinduzierbaren G-Box-ähnlichen Doppelement des Chalconsynthepromotors (FELDBRÜGGE et al.; 1994, 1996, 1997). Man vermutet, dass manche Schaderreger als spezielle Art der Anpassung in der Lage sind, über solche ocs-ähnlichen Elemente systematisch den Pflanzenstoffwechsel für sich nutzen (ELLIS et al., 1993).

#### 5.5.3.3 Zielmotive für Homöobox-Faktoren

Auch Ähnlichkeiten zu kurzen Homöobox-Elementen in QTL-korrelierten sequenzierten AFLP-Fragmenten und dem Trx-Genbereich des Walkings sind bei der Fragmentanalyse beobachtet worden, darunter Promotorelemente mit Ähnlichkeit zu Motiven der Typen

*Stripe*, *Fushi Tarazu*, *Hunchback*, *Even skipped* (*Drosophila*), *HOX* (*Zea mays*) u.a. (identifiziert durch NSITE-Analyse).

Homöobox- oder MADS-Box-Faktoren sind an vielen quantitativen/additiv regulierten Prozessen der Pflanzenentwicklung beteiligt. Dazu gehören auch die direkte oder indirekte Beeinflussung circadianer und lichtabhängiger Phänomene wie dem Einsetzen der Blüte und der Reife, sowie die Charakterisierung von homöostatischen/steady state-Zuständen der Zelle. Das „Monitoring“ des Entwicklungsstadiums und Rückkopplungsreaktionen auf Umwelteinflüsse über Homöoboxfaktoren ermöglicht das Erhalten eines balancierten Zustands oder, alternativ, eine gerichtete Fortentwicklung. Homöobox-Faktoren beeinflussen möglicherweise in erheblichem Maß die Ausprägung einzelner QTL. So sind mehrere QTL für circadiane Periodizität bei *Arabidopsis* eng mit einer Anzahl Loci gekoppelt, die den Zeitpunkt der Blüte kontrollieren (SWARUP et al., 1999). Die Datenlage von AXEISSON et al. (2001) erlaubt sogar den Rückschluss, dass bei *Arabidopsis* und *Brassica* sämtliche Blüte-relevanten Major QTL das Resultat von Duplikationsereignissen eines einzigen kartierten Homöoboxfaktor-Vorläufergens („CO“) sein könnte. HEPWORTH et al. (2002) beschreiben die Reprimierung der Wirkung von *HOX*-Faktoren über ein benachbartes *CAR*G-Zielmotiv. Ein *CAR*G-Box-Motiv befindet sich in der Nähe einer Zielstelle für ein *Zmhox1a*-Homolog in AFLP R17.186, einem starken Marker in zentraler QTL-Korrelation für Veraison und Beerenzahl.

#### 5.5.4 Identifikation repetitiver Motive mit MEME

Die Analyse der AFLP-Sequenzen mit dem Tool MEME für multiple Motivalignments wurde durchgeführt, um noch nicht charakterisierte repetitive Elemente zu finden. Dabei werden auch leichte Varianten eines Grundmotivs erkannt, was die Suche nach LTR- und anderen Transposonsignaturen unterstützt. Kenntnis über repetitive Bereiche kann Probleme bei der späteren SCAR-Marker-Entwicklung und –anwendung vermeiden helfen. Acht kurze Wiederholungsmotive bis 50 bp, bezeichnet als MEME1 bis MEME8, in beiden Orientierungen auftretend (spezifiziert als „+“ und „-“) und teilweise mit Retroelementsignaturen, wurden auf diese Weise in QTL-korrelierten AFLP-Markern identifiziert (vgl. Abb. 4.25 u. Tab. 4-10).

Die Identifikation ähnlicher Elemente in der Weinrebe, insbesondere in Korrelation mit interessanten Eigenschaften, wäre für die erweiterte Kartierung und für die Entwicklung unmittelbar informativer Marker von Nutzen. Von einer Gruppe ebenfalls kurzer repetitiver Signaturen der pflanzlichen Retroelement-Kategorie MITE weiß man z.B., dass sie mit Präferenz in der Nähe von Genen inseriert (CASA et al., 2000). In der

Umgebung von MEME-Repeat-Motiven tritt das ocr- (Octamer-) Motiv, das typischerweise in regulatorischen Introns von Pflanzen vorkommt (DONATH et al., 1995), verschiedentlich auf. Solche Elemente könnten eine Ausgangsbasis für die Entwicklung transposonbasierter Marker sein.

Die Genomstruktur der Rebe war zu Beginn der Dissertation kaum aufgeklärt. Retroelemente und Transposons machen vermutlich aber etwa 40% des Rebgenoms aus (THOMAS; pers. Mitt.). Außer solch vorsichtiger Schätzungen ist bisher nur wenig über die Verteilung und das Vorkommen mobiler Elemente bekannt. Auch wurden explizit noch keine aktiven Transpositionereignisse nachgewiesen, wenn dies auch für eine Gruppe von rebenspezifischen Ty1/Copia-ähnlichen Elementen vermutet wird (PELSY und MERDINOGLU, 2002). Da Retroelemente als Auslöser von Mutationen in Frage kommen, könnte ein genauerer Kenntnisstand über Transposition bei *Vitis vinifera* interessante Impulse für grundlegende Fragen der intravarietalen Diversität und damit für die Klonenzüchtung ergeben. Vergleichende Kartierung und Sequenzcharakterisierung sind zur Klärung solcher Zusammenhänge eine gute Ausgangsbasis, insbesondere, da es gegenwärtig Bemühungen gibt, transposonbasierte Marker in bestehende Karten zu integrieren (ebd.).

#### **5.5.4.1 Datenbankannotierte Sequenzmotive in den repetitiven Segmenten**

In einigen der durch das Tool MEME erkannten kurzen, repetitiven DNA-Abschnitten wurden Basenfolgen mit Ähnlichkeit zu LTR-artigen Bereichen, Retroelementsignaturen sowie Promotorboxen erkannt (vgl. Tab. 4-10). In einigen Fällen sind Enhancermotive enthalten, wie z.B. die von GREEN und TOBIN (1999) charakterisierte Aktivatorsequenz AA(A/C)AATCT in MEME6. Dieses Octamermotiv wird gebunden von dem pflanzlichen Transkriptionsfaktor CCA1, der dann seinerseits über die Aktivierung von Promotoren des Typs Lhcb auf die circadiane Genexpression einwirkt (ebd.). Dieses Sequenzmotiv kommt als AACAAATCT in AFLP R18.233, als AAAATCT in R17.186 und R017.250, sowie invertiert als TCTAAAA in R017.250 vor, es ist Teil der U7snRNA-Zielstelle und Teil eines Hitzeschockelements mit Ähnlichkeit zu hsp70 der Erbse (Ergebnisse der NSITE Analyse).

#### **5.5.4.2 Zwei vorsichtige Interpretationen der beobachteten Adh-Ähnlichkeiten**

Die Alkoholdehydrogenase (Adh) gilt als typisches bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck induziertes Reporterprotein. Es wird aufgrund dieser Eigenschaft in Experimenten, die

unter anaeroben Bedingungen stattfinden, häufig als „anaerobe response marker“ und Positivkontrolle in Redoxstress-Experimenten verwendet (MITTLER et al., 1996). Möglicherweise handelt es sich bei den zahlreichen beobachteten Adh-Homologien in den Markersequenzen (vgl. Abb. 4.11) um verbreitete oder konservierte sauerstoff-/ bzw. redoxresponsive Motive, zumal Adh-Gene und ihre Promotor-Komponenten gut untersucht und dementsprechend in Datenbanken stark repräsentiert sind.

Eine zweite Möglichkeit ist, die Verbreitung von Segmenten mit Ähnlichkeit zu Adh-verwandten Sequenzen im Rebgenom über Retroelement- oder Virussignaturen zu erklären: Der einzige bisher explizit publizierte spezifische Transposontyp der Weinrebe, VINE-1, integriert in Alkoholdehydrogenasegene (VERRIES et al., 2000). Die beobachteten fragmentarischen Adh-Homologien könnten dann eventuell als Spuren der Retroelement-Evolution im Verlauf ihrer Verbreitung im Rebgenom zurückgeblieben sein.

### **5.5.5 Sekundärstruktur motive auf Proteinebene**

Während der Fragmentanalysen auf DNA-Ebene wurden Sequenzabschnitte identifiziert, die auf Proteinebene mit hoher Wahrscheinlichkeit zu bestimmten Strukturmotiven führen können - vorausgesetzt sie kommen im Kontext des codierenden Bereichs eines Gens und als Teil einer kompatiblen Proteinarchitektur vor. Beispiele sind Transmembranhelixmotive und Coiled Coil-typische Motive, die mit HMMTOP sowie über den ExPasy-Server mit dem Tool COILS in der Sequenz des AFLP-Markers RL17.367 untersucht wurden. Aminosäuresequenzen, die die Ausprägung von Transmembranbereichen begünstigen, wurden auf diese Weise in AFLP-Fragment RL17.367 identifiziert und waren mit Ausschlag gebend dafür, dass ein PCR-Walking von diesem Fragment aus unternommen wurde. Zwei BLASTN-Ergebnisse mit Verweis auf kurze codierende Bereiche entfallen genau auf den Bereich einer der putativen Transmembranhelices (Ähnlichkeit zur FUS/TLS-Domäne lichtregulierter Proteine), bzw. auf ein benachbartes Coiled-coil-typisches Motiv in Exon E3. Coiled-coil-Motive bilden auf der Moleküloberfläche Kontaktstellen für Protein-Protein-Interaktionen (RAITT et al., 2000). Eindeutige Vorhersagen für die Ausprägung dieser speziellen funktionell relevanten Sekundärstruktur waren jedoch nicht möglich: die mit COILS ermittelte Signifikanz der Vorhersage lag jedoch mit 0,4 unter der üblichen Schranke von 0,5 und ist daher nicht aussagekräftig.

### 5.5.6 Analyse des AFLP-Markers RL17.367

Der Marker RL17.367 liegt in ‘Regent‘ heterozygot und in ‘Lemberger‘, rückschließend von den Segregationsdaten offenbar homozygot vor: er tritt in der Population als Intensitätsunterschied 1:1-verteilt polymorph in Erscheinung. Er kartiert in ‘Lemberger‘ endständig auf L20 und ist in ‘Regent‘ über Assignment auf R9, im Bereich eines Major-QTL für Resistenz gegen *Plasmopara viticola* platziert worden, wo er einen sprunghaften Anstieg der LOD-Werte (von 8 auf 18, vgl. Abb.4.12) markiert. Die genauere Untersuchung und Identifizierung konservierter Motive (Zielstellen für DNA-bindende Proteine und geordnete Struktur motive auf Translationsebene, die auf proteincodierende Sequenzen verweisen) lieferten den Anstoß zu einem PCR-Walking ausgehend von diesem Markerfragment.

### 5.5.7 Identifizierung eines Thioredoxin-Gens über markergestütztes PCR-Walking ausgehend von AFLP-Marker RL17.367

Nach einer Methode der Fa. Clontech (vgl. S. 70) wurde ein PCR-Walking in beiden Richtungen aus dem Markerfragment AFLP RL17.367 heraus durchgeführt. Es erlaubte die Aufklärung eines Genombereichs von 1740 Nukleotidpositionen, der im Genom von ‘Regent‘ in mindestens drei Varianten vorliegt. Dabei zeigte sich, dass das Markerfragment eine zentrale Position in einem Intron einnimmt, das zwischen zwei konservierten Exons eines putativen Thioredoxingens gelegen ist. Dieses polymorphe Intron hat möglicherweise regulatorische Bedeutung, denn es enthält ein auffälliges Arrangement cis-regulatorischer bzw. Promotor-Elemente. Der Polymorphismus, von dem die Schnittstelle des Enzyms *MseI* unmittelbar betroffen ist, stellt den Zusammenhang zur Kartierung des Markerlocus RL17.367 als Eco/Mse-AFLP her.

Freies Thioredoxin ist in der Regel ein recht kleines Protein von ungefähr 12 kDa. Als Äquivalent einer funktionellen Kerndomäne (mit Homologie zu verschiedenen pflanzlichen Thioredoxinen) ist Exon 2 mit dem stark konservierte C-G-P-C-Zentrum zu sehen (NISHIYAMA et al, 2001).

## 5.6 Aspekte zu der im PCR-Walking identifizierten Genstruktur

### 5.6.1 Die Thioredoxinsequenz der Rebe als mögliches Ortholog von T10P12.4 aus *Arabidopsis thaliana*

Aus den Walkingfragmenten wurden überlappende Walking-Fragmente ähnlich der Contiganalyse in Beziehung zueinander gesetzt und zu fortlaufenden Basenfolgen

angeordnet. Die hypothetischen Kombination zeigt in Homologiestudien die beste Übereinstimmung mit einem Trx-m-artigen Protein aus *Arabidopsis thaliana* und seinen Varianten, die sich dort auf Chromosom 1 befinden (T10P12.4 des Locus At1g43560; TrEMBL Q9XIG4, konservierte Trx1-Domäne).

Die Verfügbarkeit des *Vitis vinifera* Gene Index (VvGI) als öffentliche Datenbank ermöglichte schließlich erfolgreiche Recherchen im genetischen Hintergrund der Weinrebe. Die Übereinstimmung der theoretischen Walking-Sequenzkombination „Run8\_12“ zu einer ‘Pinot noir‘-mRNA [[>grape|CF607141](#)] untermauert, dass das putative Konstrukt in der Rebe tatsächlich eine reale mRNA als Gegenstück hat. Die auffällige Konservierung spricht für die Funktionalität: zusammenfassend besteht zu 98% Identität (483 v. 493 Pos.) zwischen beiden Nukleotidsequenzen sowie vollständige Übereinstimmung auf Aminosäureebene. Die genaue Entsprechung erlaubt den Rückschluss auf das zugehörige Startcodon in der Walking-Sequenz. Die Homologien im Alignment entfallen exakt auf die konservierten Thioredoxin-Exons E2 und E4 sowie auf einen Bereich *downstream* von E4, dessen Start zwar eine Splicing-Stelle markiert, dessen Aminosäuresequenz jedoch ebenso wie im Fall der ‘Pinot‘-Sequenz durch zahlreiche Stop-Codons unterbrochen ist, sodass der Abschnitt in dieser Form für ein abgeleitetes Protein wahrscheinlich keine Rolle spielt. Damit ist der proteincodierende Kernbereich des homologen Gens vollständig durch das Walking erfasst.

Die im Walking identifizierten konservierten Domänen entsprechen zwei essentiellen Exons, die in vielen Thioredoxinen vertreten sind und kommen als Ortholog des *Arabidopsis*-Gens T10P12.4 in Frage. Diese Hypothese wird durch die beobachtete Colinearität zwischen *Vitis* und *Arabidopsis* am betrachteten Locus in codierenden und exonflankierenden Bereichen gestützt. In der Datenbank „TIGR *Vitis vinifera* Gene Index (VvGI)“ gefundene Homologe sind jedoch noch unspezifisch als „unknown protein“ bezeichnet; die Rückschlüsse auf Thioredoxin ergeben sich momentan ausschließlich über den Vergleich mit annotierten Sequenzen anderer Pflanzen (häufigste Entsprechungen: *Arabidopsis* bzw. T10P12.4).

Folgendes ist über T10P12.4 bzw. AtTrx1 bekannt: es ist mit 26877 Da und 242 Aminosäuren ein eher kleines Protein. Man weiß, dass die Thioredoxin-Aktivität von T10P12.4 u.a. bei der Cytochrom-Biogenese eine Rolle spielt; diese Information liegt als Querverweis der Pfam-Datenbank zu „Pubmed“-Literaturquellen nach einer Suchanfrage mit dem GI-Index der Domäne vor. T10P12.4 gehört zu den Proteinen, die in

*Arabidopsis*-Sämlingen unmittelbar nach der Anzucht in Dunkelheit überexprimiert sind (SCHROEDER et al., 2002). Es wird der Thioredoxin1-Klasse zugeordnet (Pfam, PROSITE) und stellt in *Arabidopsis* die genetische Basis für verschiedene funktionelle Thioredoxinvarianten dar. Das Genprodukt von T10P12.4 kommt gemäß einer Reihe von Einträgen in der Datenbank TIGR AGI z.B. mit vorgeschalteter chloroplastidärer Signalsequenz oder ER-Signalsequenz bzw. mit Rezeptordomäne (PICOT, PKCQ-Interacting Glutharedoxinlike Thioredoxin; WITTE et al., 2000) vor, es kann als freies Matrixprotein oder oligomerisiert als selbst nicht membranassoziierte Domäne vorliegen (z.B. verbunden mit integralen Proteinen, in Datenbanken dann bezeichnet als „thioredoxinlike Protein“). Ein Beispiel für letzteres sind rezeptorartige Kinasen mit Thioredoxin-Domäne sowie Hitzeschockproteine mit Thioredoxin-Aktivität wie AtHIP (WEBB et al., 2001).

Bei T10P12.4 und der Mehrzahl der Thioredoxine mit Homologie zur Walkingsequenz tritt Exon E4 zusammen mit Exon E2 als konservierte Thioredoxineinheit auf, auch ohne Beteiligung von E1. Andererseits kommt ein Pendant zu Exon E1 auch in solchen Thioredoxinen vor, deren übrige Domänen (wie z.B. bei CITRX) abgesehen vom Aktiven Zentrum, nicht in offensichtlicher Beziehung zu den hier beschriebenen Exons E2 bis E4 (oder zu T10P12.4) stehen. Ob Exon E1 für die Thioredoxinaktivität selbst essentiell ist, ist unklar, zumal Belege für exprimierte Varianten des Gens (in Form von EST-Datenbankeinträgen) im genetischen Hintergrund von *Vitis vinifera* bisher nur für cDNAs, die mit Exon E2 beginnen, gefunden wurden.

### 5.6.2 Entstehung und Bedeutung von Gen- und Proteinfamilien am Beispiel Thioredoxin

Die Ergebnisse des Walking lassen die Möglichkeit offen, dass der hier untersuchte Thioredoxinlocus in Allelen und in paralogen Varianten auftritt oder, dass es sich um verstreut vorkommende Sequenzen handelt. Die Ähnlichkeit zwischen ihren Introns stützt die Annahme, dass die dokumentierten Varianten in evolutionärer Beziehung zueinander stehen, vielleicht tandemartig in relativer Nähe zueinander liegen, wie es bei drei Trx1-Kopien von *Trichodesmium* der Fall ist<sup>21</sup>. Variantenbildung geschieht auf Genomebene (Exonshuffling, Duplikation und Diversifikation), auf mRNA-Ebene (Splicing) und Proteinebene (post-translationale Modifikation und Oligomerisierung).

<sup>21</sup> Rückschließend von einer genomischen Shotgun-Sequenz [[>gi|23039472|ref|NZ\\_AAAU01000002.1](#)] und Ergebnissen mit BLAST; vgl. Abb. 4.31 u. Tab. 4-14.

Exonshuffling wie auch flexible Splicing-Mechanismen (alternatives Splicing, lichttemperatur- oder redoxabhängiges Splicen (SCHRODA et al., 2001), suppressor- oder aktivatorgelenktes Splicen, autonome Introns, durch mRNA-Editing neu generierte Splicing-Sites (SEYFFERT, 2003: S. 68ff) sind Mechanismen, durch die sich das Spektrum von Proteinvarianten, die nebeneinander existieren oder organspezifisch/stimulusbezogen exprimiert werden können, erweitert. GEBHARDT und VALKONEN (2001) halten evolutionäre Prozesse der lokalen Genduplikation und funktionellen Diversifikation eines gemeinsamen Vorläufers auch für den zentralen Mechanismus, der zum geclusterten Auftreten qualitativer und quantitativer Resistenzgene führt. Zusätzliche Möglichkeiten der Diversifikation ergeben sich für verwandte Proteine dadurch, dass den Sequenzen der aktiven Domänen verschiedene Leader- bzw. Signalpeptide vorgeschaltet werden können, die ihr Targeting beeinflussen.

Am N-terminalen Ende im Bereich von Exon E1 ähnelt die hier identifizierte Aminosäuresequenz der Weinrebe am ehesten - stärker noch als der *Arabidopsis*-Sequenz - einer Blaualgenvariante von Thioredoxin (vgl. Abb. 4.30, S. 145). Variabilität am N-Terminus ist für Thioredoxin-Precursor typisch: MESTRES-ORTEGA und MEYER (1999) orteten im Genom von *Arabidopsis* selbst, belegt durch phylogenetische Clusteranalyse, neben vier „pflanzlichen“ Varianten von Thioredoxin-m auch ein „prokaryotisches“ Thioredoxin; alle unterschieden sich in ihren N-terminalen Extensionen. WEDEL et al. konnten bereits 1992 zeigen, dass bei Spinat alle Thioredoxin-m-Varianten auf einen einzigen Open Reading Frame und post-translationale Modifizierung zurückgehen.

Während der Homologiestudien mit der Run6-Variante des Walkings zeichnete sich eine gewisse Ähnlichkeit zwischen dem ersten Intron und Exon E1 ab (vgl. Abb. 4.30), die BLAST in ein direktes Alignment beider Bereiche umsetzte. Dies ist offenbar kein Zufall, denn ein paralleler Befund von SAHRAWY et al. (1996) liefert eine plausible Erklärung, die gleichzeitig als Illustration der oben geschilderten Mechanismen der Variantenbildung dienen kann: Ihre Untersuchungen zur Evolution pflanzlicher Thioredoxine erlaubte es, über das Vorhandensein eines einzigen Introns zwischen Transitpeptid und funktioneller Domäne auf einen prokaryontischen Ursprung des N-Terminus zurückzuschließen. Sie stellten außerdem Ähnlichkeit zwischen diesem Intron und der Sequenz des Transitpeptids fest und schlossen auf Exonshuffling als Ursprung.

Transkripte putativer T10P12.4-ähnlicher Gene werden in der Rebe möglicherweise ebenfalls in Varianten exprimiert und mit variablen N-terminalen Extensionen versehen.



### 5.6.3 Transposonsignaturen in der Walkingsequenz

Transposons sind in vielen Fällen ursächlich an Duplikationsereignissen und Mutationen beteiligt (GEBHARD und VALKONEN, 2001). AT-reiche Strecken, die sich typischerweise im Bereich von thioredoxinverwandten Gensequenzen befinden, begünstigen Transposoninsertionen (LEE et al., 2002). Der AT-Gehalt des hier analysierten Walking-Bereichs beträgt 63%, ist also überdurchschnittlich. Dazu passt die Beobachtung, dass, wie in den Thioredoxin-Genen anderer Spezies auch, in der identifizierten Thioredoxinsequenz der Weinrebe Retroelementsignaturen vorkommen (Beispiel: ein LTR-typisches Motiv an Pos. 66). Der Thioredoxinlocus T10P12.4 als möglichem Ortholog des hier identifizierten Thioredoxins auf Chromosom 1 von *Arabidopsis thaliana* ist beidseitig von Retroelementen flankiert (vgl. Tab. 4-15).

Transponierbare Elemente spielen eine wichtige Rolle in der Evolution von Resistenzgenen (MICHELMORE und MEYERS, 1998; RICHTER und RONALD, 2000) und Resistenzgen-Clustern (CHIN et al., 2001), wobei zwei Elemente derselben Familie innerhalb einer Resistenzgenregion bereits die Grundlage für eine Genduplikation durch ungleiches Crossing Over bilden. Transposoninsertionen können auch in typischer Weise unterbrochene Resistenzgen-Arrangements verursachen, dies ist z.B. für Homologe der Cluster RPP5 (*Arabidopsis*), N (Flachs), Hm1 (Mais), und Xa21 (Reis) beschrieben (SONG et al., 1997; MULTANI et al., 1998; NOEL et al., 1999; DODDS et al., 2001).

### 5.6.4 Vorhersage topologischer Unterschiede und Untersuchung physikalischer Parameter mit PSORT und HMMTOP

Topologische Untersuchungen sollte erste Hinweise geben, inwieweit unterschiedliche Splice-Kombinationen aus Teilsequenzen des Walking sich auf die Vorhersage physikalischer Proteineigenschaften und des Bestimmungsorts in der Zelle auswirken.

Von Interesse ist beispielsweise, ob das Protein membranverankert oder frei vorkommt, denn für die Ausübung bestimmter Funktionen ist die Löslichkeit wichtig (Beispiel: die Interaktion cytoplasmatischer *R*-Proteine mit Avirulenzfaktoren, die über die Haustorien des Pilzes ins Cytoplasma der Wirtspflanze eingeschleust werden; BALLVORA et al., 2002).

Im Fall der Membranständigkeit ist interessant, ob Aktives Zentrum und/oder interagierende Domänen im Kompartiment eingeschlossen sind oder nach außen weisen, denn ihre Ausrichtung bezüglich einer Membran – und auch relativ zueinander - kann für

Aktivierungs- und Modifizierungsreaktionen sowie für Interaktionen mit anderen Proteinen eine Rolle spielen.

Durch Analysen mit PSORT und HMMTOP konnte für die im Walking identifizierten Exon- und Orf-Varianten gezeigt werden, dass verschiedene Splice-Kombinationen zu verschiedenen Lokalisierungsprognosen und Domänenorientierungen führen. Polymorphismen könnten demnach Voraussetzung für organ- oder zellkompartimentspezifische Aufgabenteilung sein und die zelluläre Lokalisierung der Genprodukte steuern. Ein Teil der in den codierenden Segmenten der Walkingvarianten beobachteten Unterschiede könnte statt zu funktionellen Proteinen aber auch zu dysfunktionellen Gen-, mRNA- oder Peptidvarianten führen. Mögliche topologische Auswirkungen der beobachteten Unterschiede auf Sequenzebene in den Trx-Orf-Varianten wurden aufgrund der geschilderten Implikationen exemplarisch mit Tools zur Strukturvorhersage untersucht.

***Chloroplast*** und ***Thylakoidmembran*** werden offenbar dann erreicht, wenn Exon E1 in vollständiger Form vorhanden ist. Eine mögliche Funktion für Exon E1 ist das Targeting der Trx-Funktion in die *Chloroplasten* (als Transitpeptid). Dies würde die Vermutungen bestätigen, die sich aus den Homologiestudien ergeben haben.

In der Topologiestudie zeigte sich auch, dass die Splice-Elemente der Varianten Run6 und Run8 Unterschiedliches auslösen können. So lokalisieren Kombinationen aus E2, E3 und E4 ins *Cytoplasma*, wenn E3 der Run6-Variante entspricht und ins *Peroxisom*, wenn E3 der Run8-Variante entspricht. Als putative Funktionen von Exon E3 kommen die Ausprägung von Transmembranhelices und das Targeting der kombinierten Thioredoxindomänen E2 und E4 in die *Peroxisomen* in Frage.

Die *innere Membran der Mitochondrien* wird - zumindest in der Theorie- als Zielort durch Kombination mit einem hypothetischen Peptid aus Orf10 prognostiziert; andere Membranen werden durch verkürzte Peptide erreicht. Diese Ergebnisse haben jedoch mangels Datenbankhomologie momentan keine weitere praktische Bedeutung, als dass sie auch als Hinweis dafür gelten können, was die topologische Analyse insgesamt ergeben hat: Elemente, die zu den zentralen Thioredoxindomänen E2 und E4 hinzutreten, dienen offenbar dem Targeting der Enzymaktivität in verschiedene Kompartimente.

## 5.7 Aspekte zu Regulation und Funktion

### 5.7.1 Thioredoxinvarianten als Redox-/ROS-Sensoren und Stoffwechsel-Checkpoint

Thioredoxinvarianten wirken am jeweiligen Ort ihres Vorkommens als Sensoren, sie ermöglichen aber auch die koordinierte Abstimmung kompartimentierter Schlüsselreaktionen des Stoffwechsels (etwa zwischen Mitochondrien/Atmung und Chloroplasten/Photosynthese) als rasche Reaktion auf den gerade lokal vorherrschenden Redox- und Energiestatus.

BALMER et al. (2004), kommen aufgrund von Arraystudien zu dem Ergebnis, dass Thioredoxinvarianten an zwölf zellulären Prozessen und ihrer Abstimmung aufeinander beteiligt sind: Photorespiration, Citratzyklus, Lipidmetabolismus, Elektronentransport, ATP-Synthese und –transformation, Membrantransport, Translation, Proteinfaltung, Stickstoffmetabolismus, Schwefelmetabolismus, Hormonsynthese und Stressreaktionen – darunter Housekeeping-Funktionen und Funktionen eines modulierten Metabolismus in Reaktion auf äußere Reize. Insbesondere Mitochondrien und Chloroplasten „kommunizieren“ über Thioredoxine und den Flux an modifizierten Molekülen miteinander (ebd.) – in dem Sinne, dass sie das wechselseitige Angleichen plastidärer Stoffwechselaktivitäten an den vorherrschenden Redoxstatus vermitteln.

Die im Rahmen dieser Arbeit abgeleiteten Thioredoxinvarianten könnten ihre Aufgabe den topologischen Vorhersagen zufolge jeweils im Cytoplasma, den Peroxysomen sowie den Chloroplasten und Mitochondrien ausüben oder über das ER den sekretorischen Weg einschlagen.

### 5.7.2 Hypothetische differentielle Regulation des Thioredoxingens der Weinrebe durch Licht, oxidativen Stress und Pathogenelicatoren

Die Thioredoxinreduktase TrxR1 existiert in 21 exprimierten Varianten, die nicht nur auf alternatives Splicen in der 5'-Region sondern auch auf stimulus- und gewebeabhängige alternative Promotornutzung und den Einfluss unterschiedlich genutzter cis-regulatorischer Elemente zurückzuführen sind (RUNDLOF et al., 2004). Ob auch Thioredoxinvarianten einer ähnlich komplexen Regulation unterstehen, ist ähnlich detailliert noch nicht gezeigt worden. Bekannt ist jedoch, dass ein typischer Trx-Promotor auf Licht reagiert und eine Reihe von stressresponsive Elementen enthält. Thioredoxin (mRNA, Proteinsynthese und Sekretion) wird wie viele weitere stresskorrelierte Proteine durch oxidative Stimuli induziert (HIROTA et al., 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierte Thioredoxin-Sequenz weist, abgesehen von distalen und proximalen Promotormotiven, eine Reihe redox- und stress-sensitiver cis-regulatorischer Motive in teilweiser Überlagerung im Bereich des Markers RL17.367 auf. Es handelt sich um ethylenresponsive Elemente (ERE), anaerobe Response-Elemente (ARE), licht-sensitive Elemente (LRE) oder Bindungsstellen für Hitzeschockproteine. Fünf TTGAC(C/T) - Elemente, sogenannte „W-Boxen“ wurden in 5'-Richtung der Thioredoxin-Exons E2 und E4 identifiziert. Solche W-Boxen kommen – oft mehrfach und verstreut – typischerweise in differentiell regulierten Promotoren von Genen der Pathogenabwehr vor (DONG et al., 2003). Sie werden von WRKY-Proteinen erkannt und gebunden. Bei diesen DNA-bindenden Faktoren handelt es sich um eine Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die durch Salicylsäure oder, davon abgekoppelt, im Verlauf der hypersensitiven Reaktion induziert werden (YODA et al., 2002). Es existieren auch Beschreibungen von R-Genen des NBS-LRR-Typs, die als C-terminale Extension eine WRKY-DNA-bindende Domäne besitzen (LAHAYE, 2002) sowie WRKY-Proteine, die wie die Ethylenresponsive-Element-Binding Proteins (EREBP) durch den Botenstoff Geraniol induziert werden (ASHIDA et al., 2002).

Die Verteilung von W-Boxen ermöglicht in *Arabidopsis* mehrgleisige Signaltransduktion („funktionelle Redundanz“) und die Vernetzung verschiedener Reaktionswege bei der spezifischen Abwehr von *Peronospora parasitica* (KALDE et al., 2003). Untersucht wurde die Regulation über W-Box-Elemente z.B. an Thioredoxin h5 aus *Arabidopsis thaliana*. Für dieses cytosolische Thioredoxin bestehen zwei Möglichkeiten der Induktion:

- (1) allgemein über oxidativen Stress (bei Seneszenz, Abszision, Verwundung und hypersensitiver Reaktion auf inkompatible Schaderreger) und
- (2) W-Box-vermittelt, in unmittelbarer Reaktion auf Pathogenelicitoren, wobei einem WRKY-Transkriptionsfaktor regulative Schlüsselfunktion zukommt (LALOI et al., 2004). Alles spricht dafür, dass Trxh5 in *Arabidopsis thaliana* generell an der Reaktion auf Stress, insbesondere aber bei der Schaderregerabwehr eine Rolle spielt. Die beschriebene Art der Regulation gilt bisher noch als Einzelfall und Besonderheit der Thioredoxin-h-Gruppe. Dass zwei Möglichkeiten der Induzierbarkeit existieren, wird von den genannten Autoren nicht als Redundanz, sondern als Speziation dieser Multigenfamilie gedeutet (ebd.).

Möglicherweise unterliegt das im Rahmen dieser Arbeit betrachtete Thioredoxin der Weinrebe einer ähnlich mehrgleisigen Regulation auf DNA-Ebene durch äußere Stimuli.

Hinzu kommt als Möglichkeit eine organspezifisch differentielle Regulation, wie folgendes Beispiel verdeutlicht: *Plasmopara viticola* ist eine Infektionserkrankung, von der charakteristischerweise Beere und Blatt der Weinrebe als oberirdische Pflanzenorgane befallen werden, die unter natürlichen Bedingungen durch die Sporen erreichbar sind. Was sich an *Arabidopsis* in vergleichenden Infektionsstudien mit *Peronospora parasitica* an Blatt und Wurzel belegen ließ, entsprach dieser Logik auf den ersten Blick: die Wurzeln ließen keinerlei Anzeichen aktiver Abwehr erkennen, während sich bei den Blättern der gleichen Pflanze die erwarteten Symptome der hypersensitiven Reaktion zeigten. Doch stellte sich heraus, dass sich in beiden Organen Transkripte des Resistenz vermittelnden RPP1-Genprodukts sowie der R-Gen-vermittelten Signalwege nachweisen ließen, die bislang als Auslöser aller Effekte galten (HERMANN et al. 2003). Zur Induktion der HR in der Wurzel reicht die Anwesenheit dieser Transkripte offensichtlich nicht aus; es scheint weitere Wechselwirkungen zu geben, die eine HR (und u.U. weitere Reaktionen) organspezifisch blockieren oder reprimieren können.

In diesem Zusammenhang ist die essentielle Beteiligung von Thioredoxin an der Ausprägung der HR (ISSAKIDIS-BOURGUET et al., 2001; GARRIDO und GRANT, 2002) und das Vorhandensein eines durch NSITE als „root specific element“ charakterisierten Motivs in einem regulatorischen Bereich der Walking-Sequenz interessant, das sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer W-Box befindet und die Bindung wurzelspezifisch regulatorischer Proteine beeinflussen könnte.

### **5.7.3 Thioredoxin als Schlüsselkomponente bei oxidativem Stress, Zelltod und Erhaltung der Vitalität**

Ein funktionelles Thioredoxinsystem (Trx-S<sub>2</sub>, Thioredoxinreduktase, NADPH+H<sup>+</sup>) erweist sich bereits bei Prokaryonten als unerlässlich für Resistenz gegen oxidativen wie nitrosativen Stress und ist überlebenswichtig (COMTOIS et al., 2003). Die zentrale Rolle von Thioredoxin als Elektronendonator der Thioredoxin-Peroxidase in eukaryotischen Zellkulturen unter Stress ist ebenfalls erwiesen (ANDOH et al., 2003): Sie stehen als Bindeglied zwischen einer stressinduzierten cGMP-abhängigen Proteinkinasekaskade und der Aktivierung stimulusbezogener Transkriptionsfaktoren mit dem direkten Effekt der Reduktion aktiver Sauerstoffspezies in der Zelle sowie der Hemmung redoxsensitiver apoptoseauslösender Caspasen (ANDOH et al., 2003; UEDA et al., 2002) bis hin zum Block des programmierten Zelltods (KATOH et al., 2004). Im Säugersystem sind Thioredoxine andererseits unmittelbar an der Aktivierung von NF-kappa B (und damit

seiner Translokation vom Cytoplasma in den Kern) als Schlüsselfaktor der inflammatorischen Reaktion und p53, einem positiven Regulator des Zelltods, beteiligt.

■ *NF-kappa B* In der hier identifizierten Thioredoxinsequenz der Weinrebe kommen drei Zielstellen vom Typ NF-kappa B in Run8\_12 (Genprodukt: peroxysomal) vor: (1) überlappend mit promotorhomologen Bereichen vor Exon E2, das das aktive Zentrum enthält, (2) vor Exon E3, der putativen Transmembran- oder Rezeptordomäne, (3) vor Orf17, so dass eine wechselseitige Regulation zwischen Faktoren vom Typ NF-kappa B und Trx-Genprodukten über (negatives/kompetitiv hemmendes?) Feedback denkbar ist. Im Vergleich zeigt sich, dass die Positionen der NF-kappa B-Sites in den Walking-Varianten polymorph sind: In Run6\_10 (Genprodukt: cytoplasmatisch) fehlen die drei Zielstellen für einen Transkriptionsfaktor dieser Bindungsspezifität komplett, seinerseits weist einzig Run6\_10 ein Motiv aus apoptoseinhibitorischen Proteinen (AIP) auf (in E1). In der Variante Run2 ist die zweite NF-kappa B-Site so stark abgewandelt, dass sich in der NSITE-Analyse Entsprechung zu einem neuen cis-regulatorischen Motiv ergibt: einem „Defense-related ethylen responsive element“ (vgl. ALONSO und ECKER, 2001). Spezifische differentielle Kontrolle der Varianten, z.B. über einen Faktor vom Typ NF-kappa B scheint also theoretisch möglich.

■ *p53* Das Resveratrol der Weinrebe induziert in Gegenwart von p53 in Zellkultur Apoptose über Membranpotentialänderungen und Komponenten der Caspase-Kaskade (DORRIE et al., 2002), es stoppt außerdem das Zellwachstum durch reversible Arretierung des Zellzyklus (KUO et al., 2002; PARK et al., 2001).

Die divergierenden Funktionen bezüglich ROS und Zelltod könnten durch ein System erklärbar werden, bei dem Thioredoxin an punktuellen nekrotischen Reaktionen zur Abschottung eines lokalen Infektionsereignisses beteiligt und durch seine Mitwirkung an der Detoxifizierung von ROS (HERBETTE et al., 2002) auch gleichzeitig angrenzendes Gewebe zu schützen imstande ist. Es würde in diesem Fall im frühen Stadium einer Pathogeninfektion eine Schlüsselposition einnehmen. Funktionelle und räumliche Kompartimentierung könnten eine Rolle spielen. TALER et al. (2004) weisen den Peroxysomen eine zentrale Rolle in der enzymatischen Resistenzaktivierung der Blätter von Wildarten der Melone (*Cucumis melo*) gegen den Erreger des Falschen Mehltau zu, SONG et al. (2004) zeigten, dass im Cytoplasma und den Chloroplasten resistenter Genotypen von *Cucumis* aktivierende und hemmende Faktoren der enzymatischen Phytopathogenresistenz in abgestimmter Weise wirken.

#### 5.7.4 Differentielle Funktionalität von Thioredoxin-Isoformen

Drei Isoformen des chloroplastidären Trx-m aus *Arabidopsis thaliana* verbesserten in einem Komplementationsassay mit Trx-defizienter Hefe die Toleranz gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und können direkt als Antioxidans wirken. Unerwarteterweise löste eine der getesteten Isoformen (Athm3) allerdings Hypersensitivität bei oxidativem Stress/Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus (ISSAKIDIS-BOURGUET et al., 2001). Dieser Befund kann zeigen, dass Thioredoxin offenbar über Isoformen differentielle Rollen in der zellulären Homöostasis einnehmen bzw. diese sogar durchbrechen und zum Auslöser des lokalen Zelltods werden kann.

#### 5.7.5 Alternative Induktionswege für Thioredoxin münden ebenfalls in Zellschutz

Thioredoxin wird auch ohne einen massiven Stresstimulus durch cAMP, Steroidhormone/Östrogene/Prostaglandine sowie GGA (Geranylgeranylacetone) als kürzlich beschriebenen spezifischem Elicitor induziert (HIROTA et al., 2002). Für das antifungale Phytoöstrogen Resveratrol gilt eine eigene aktive Rolle im antioxidativen Zellschutz als erwiesen, inwieweit es als Regulator pflanzlicher Trx-Expression in Frage kommt, ist jedoch nicht bekannt.

GGA, ein Derivat von Geranylgeranylpyrophosphat GGPP, ist das gemeinsame Zentralmolekül der Synthesewege des Isoprenoidmetabolismus, aus dem sich Pflanzenhormone, Aromakomponenten, Pigmente (z.B. Carotinoide, Gibberelline, Chlorophylle, Terpene) und Abwehrsubstanzen ableiten. Als Substrat der GGTase dient es zur posttranslationalen Geranylgeranylierung von Proteinen. GGA baut über die Induktion von Thioredoxin und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren einen aktiven Zellschutz auf. Dieser Schutz dient zunächst der Pflanze selber, soll aber seine Wirksamkeit auch im menschlichen Organismus ausüben können (HIROTA et al., 2002).

Es ist nach der Auffassung der Autoren sogar denkbar, dass eine eingehende Analyse der Trx-Aktivierung dazu beitragen kann, der molekularen Basis des „French Paradox“ auf die Spur zu kommen. Der Begriff beinhaltet, dass Alkoholkonsum zwar grundsätzlich gesundheitliche Risiken birgt, Rotweingenuss in Maßen, wie es in Mittelmeerländern zur Lebensart gehört, jedoch als gesund für das kardiovaskuläre System erachtet wird (ebd.). Resveratrol soll mit diesem Effekt in besonderem Maße im Zusammenhang stehen. Führt man in humaner Zellkultur künstlich eine Entzündung herbei, so lässt sich beobachten, dass Resveratrol die zellschädigende Wirkung reaktiver Sauerstoffverbindungen reduziert, den apoptotischen Zelltod jedoch stimuliert (MARTIN

et al., 2004), während Thioredoxin ebenfalls ROS detoxifiziert, dabei aber apoptotischen Zelltod offenbar hemmt.

## 5.7.6 Thioredoxin und Resistenz

### 5.7.6.1 Thioredoxin-Peroxiredoxinsysteme, Beeinflussung durch Pathogene und Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Thioredoxinabhängiges Peroxiredoxin Q kann verschiedene Peroxide reduzieren und als pathogenresponsives Antioxidans wirken. Die Expression des Enzymsystems der Pappel wird bei kompatibler Interaktion unterdrückt, während der hypersensitiven Reaktion hingegen stimuliert. Sequenzbasierte Lokalisierungsanalysen verwiesen auf die Chloroplasten als Zielorganellen; GFP-Immunolokalisierung erlaubte darüber hinaus die Spezifizierung auf die Chloroplasten der Schließzellen als Hauptwirkorte (ROUHIER et al., 2004). Dies ist insoweit interessant, als dass Spaltöffnungen potentielle Eintrittspforten für pilzliche Schaderreger darstellen.

Ein Peroxidoredoxin aus *S. pombe* zeigt bezüglich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine besondere Art der abgestuften Regulation: Serielle Trunkierung am C-Terminus, beobachtet *in vitro* und *in vivo*, erlaubte die Inaktivierung, Aktivierung und erneute Inaktivierung dieser Thioredoxin-Peroxidase. Die aktiven bzw. reaktivierten Varianten zeigen bei gleichbleibender Kinetik deutlich abnehmende Affinität zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis hin zu völlig unterbleibender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bindung (KOO et al., 2002).

### 5.7.6.2 Das Thioredoxin CITRX -ein negativer Regulator pflanzlicher Pilzresistenz?

RIVAS et al. (2004) identifizierten über ein Yeast-2-Hybrid-System das cytoplasmatische Thioredoxin CITRX (Cf-9-interacting thioredoxin) aus *Nicotiana benthamiana*, das spezifisch das gegen den pathogenen Pilz *Cladosporium fulvum* gerichtete R-Gen Cf-9 erkennt. Gezieltes Silencing der CITRX-Expression führte zu beschleunigter Cf-9/Avr9-vermittelter HR, verstärkter Akkumulation von ROS, geänderter Proteinkinaseaktivität und allgemeiner Induktion von PR-Genen. CITRX-Reprimierung erwies sich unter experimentellen Bedingungen also als ausreichender Faktor zur Erzeugung erhöhter Resistenz gegen *Cladosporium fulvum* in zuvor anfälligen Kultivaren, was die Autoren bewog, in CITRX einen negativen Regulator der *Pilzresistenz* zu sehen.

Am Fall eines weiteren negativen Regulators der HR, LSD1, lässt sich erläutern, was zunächst paradox erscheint: LSD1 bewirkt in *Peronospora*-infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen eine Eindämmung der Abwehrsignalverstärkung und damit der durch RPP5



ausgelösten HR (RUSTÉRUCCI et al., 2001; vgl. S. 46). Damit wäre LSD1 - wie im oben geschilderten Fall CITRX - als negativer Regulator der Pilzresistenz zu sehen. Im feedback-kontrollierten Zusammenspiel mit den positiven Regulatoren EDS1 und PAD4 bewirkt jedoch gerade die durch LSD1 ortsspezifisch ausgeübte negative Kontrolle der HR ein insgesamt positives Gesamterscheinungsbild der Pflanze, das im Sinne von „Pathogentoleranz“ oder „Resistenz“ gewertet werden könnte.

Der Befund, dass ein Thioredoxin in *Nicotiana* und *Lycopersicon* als Regulator spezifischer Pilzresistenz wirkt, wenn auch *negativ*, weist ihm eine klare Schlüsselstellung in der Pathogenabwehr zu und wirft im Rahmen der vorliegenden Dissertation die neue Frage auf, ob in der Weinrebe ein ähnlicher – möglicherweise *negativer* - Zusammenhang zwischen Thioredoxin und Abwehrreaktionen bestehen könnte. Eine Verbindung zu LSD1, einem GATA-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor (DIETRICH et al., 1997) ließe sich in der Theorie über zwei GATA-Bindungsmotive vor den konservierten Thioredoxinexons E2 und E4 (in Überlappung oder Nachbarschaft zu Antioxidant Response Elementen) konstruieren.

### 5.7.6.3 Möglichkeiten natürlicher negativer Regulation von Thioredoxin

#### 1) Negative Regulation über eine putative Antisense-RNA

Der Marker AFLP RL17.367 entfällt unmittelbar auf einen Genomabschnitt mit Homologie zu einer mRNA aus ‘Cabernet Sauvignon‘ [>grape|CB972430], die in Bezug auf die codierenden Bereiche des Walkings allerdings gegenläufig orientiert ist. Könnte man die Transkription und Existenz einer verwandten mRNA tatsächlich auch in ‘Regent’ nachweisen, würde dies interessante Fragen hinsichtlich einer zusätzlich denkbaren Ebene der Regulation über einen Antisense-Mechanismus aufwerfen.

Natürliche Antisense-RNA kann die Genexpression über Initiationsinhibierung, über die Steuerung der unmittelbaren Degradierung der Ziel-mRNA sowie über Ribosomeninterferenz beeinflussen. Das Spezielle am Mechanismus der Translationsreprimierung ist seine Reversibilität: die mRNA bleibt über eine bestimmte Zeitspanne hinweg zwar geblockt, jedoch intakt und geschützt. Für die Zellen des Gewebes bedeutet dies, in Bereitschaft für einen plötzlichen „Expression Switch“ in Reaktion auf Reize von außen zu stehen (GOOD, 2003).

Der Ursprung natürlicher Antisense-RNA wird in Duplikationsereignissen mit anschließender Inversion gesehen. (KORNEEV und O'SHEA 2002) - in der Regel ausgelöst durch Transposons (PUIG et al., 2004).

## 2) Trunkierung und abgestufte Aktivität von Trx

Trunkierte und dennoch funktionelle Versionen von Thioredoxin kommen bei zahlreichen Spezies vor. Am besten untersucht sind sie bei menschlichen Zellkulturen, wo ihnen erhöhte Stabilität gegenüber  $H_2O_2$ , modifizierte Aktivität bezüglich ihrer Beeinflussung der Apoptose und kompetitives Verhalten zugeschrieben wird (ISSAKIDIS-BOURGUET et al., 2001). Ein Beispiel ist humanes Trx80, das als trunkierte Form von Trx1 auf das gleiche Gen zurückgeht. Ob trunkierte Versionen eines Thioredoxins der Weinrebe *in vivo* eine Rolle spielen, bleibt noch zu zeigen.

## 3) Rolle der zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandenen Menge von Trx-mRNA-Varianten

Bei der differentiellen Steuerung zellulärer Prozesse durch den Einfluss von Thioredoxin ist der mRNA-Level verschiedener Trx-Formen offenbar eine Schlüsselgröße. Durch alternatives Splicing entstandene Human-Trx1-Varianten, denen zwei Exons fehlen, werden zeitweise in der Zelle angehäuft, aber nicht zu Proteinen umgesetzt. In Anwesenheit dieser mRNA-Varianten wird das Vorhandensein von „korrekten“ Trx1-mRNAs zu fast 75% unterdrückt. Infolgedessen kann man das alternative Splicing als Mittel interpretieren, über den Level an translatierbarer Trx1-mRNA bestimmte Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptosehemmung oder Sensitivität zu modulieren (BERGGREN und POWIS, 2001). Für Pflanzen ist ein solcher Zusammenhang bisher nicht nachgewiesen. Auf der Basis der nun für ein putatives Trx1-Homolog der Rebe vorliegenden Sequenzdaten ist diese Möglichkeit jedoch grundsätzlich denkbar.

## 5.8 Thioredoxindomänen als modulare Elemente

Auch auf der Ebene letztlich exprimierter Proteine und abgesehen von Kriterien der Autoregulation ist bei Thioredoxin Variantenbildung wichtig. Thioredoxindomänen können als wesentliche Elemente eines Redox-Modulsystems verstanden werden. Zahlreiche multifunktionelle Enzyme enthalten Thioredoxin-Coremotive (ein CxxC-Zentrum plus einige konservierte Aminosäuren im gleichen Exon). Thioredoxindomänen mit Homologie zu autonomen Thioredoxin-Formen sind häufig konservierte C-terminale Untereinheit natürlich vorkommender bifunktionaler Proteine, während der N-Terminus variabel ist. Beschrieben sind z.B. chimäre oder modulare Proteine aus einem *Arabidopsis*-Thioredoxinmodul des Typs T10P12.4 und Kinase-, Reduktase- oder Hsp70-Chaperonuntereinheit (WITTE et al., 2000, VIGNOLS et al., 2002). Auch für die Rebe ist bereits ein modulares Thioredoxin beschrieben: VIHIP- bzw. Hsp70-interacting

protein/thioredoxin chimera [Vitis labrusca]; gb|AAK64512.1|, für das, parallel zu dem hier untersuchten Trx/T10P12, ebenfalls ein *Arabidopsis*-Ortholog (AtHIP) existiert (WEBB et al. 2002). VIHIP und das hier identifizierte Trx1 der Rebe weisen, abgesehen von ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe der thioredoxinartigen Proteine, keine auffällige Ähnlichkeit auf Sequenzebene auf.

Transmembrandomänen als Module könnten bei dem hier beschriebenen Trx1 der Weinrebe für die Expression von membrangebundenen Varianten relevant sein. Thioredoxin galt lange als prinzipiell cytoplasmatisches Protein, bis zwei Trx-1-cDNAs (89% Identität) aus einer Membranprotein-Expressionlibrary der Sojabohne isoliert werden konnten (SHI und BHATTACHARYYA, 1996). Die Transmembranhelix befindet sich dort in der N-terminalen Region, unmittelbar hinter dem Transkriptionsstart. Anfang 2003 wurde ein weiteres Protein mit Thioredoxinfunktion sowie Transmembranbereich über die Isolation einer cDNA entdeckt und charakterisiert: das ‘Thioredoxin-related transmembrane protein 21‘ des Menschen (MENG et al., 2003).

### 5.9 Kritische Betrachtungen zur Bedeutung des identifizierten Thioredoxingens

Thioredoxine, die Homologe oder Orthologe des im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und Trx1 der Rebe darstellen könnten, nehmen erwiesenermaßen eine Schlüsselstellung bei zellulären Prozessen ein, die zur Überlebensfähigkeit von Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien essentiell sind. Auch die hypersensitive Reaktion zählt dazu, die, wie schon im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt wurde, für die natürliche Pilzresistenz der Weinrebe zentrale Bedeutung hat. Einiges spricht dafür, das zunächst nur exemplarisch als Vertreter eines QTL-korrelierten Gens behandelte Thioredoxin unter diesem Aspekt *in vivo* zu untersuchen. Doch sind vorerst auch einige Kritikpunkte zu beachten.

- Der Marker lässt sich dem zentralen Maximumbereich eines Resistenz-Major-QTL zuordnen. Dennoch kann man noch nicht kategorisch ausschließen, dass das Thioredoxingen zufällig getroffen wurde. Die Charakterisierung des Locus bei anderen Sorten und die Suche nach exprimierten Thioredoxinformen und verwandten Sequenzen im Genom der Rebe können weiteren Aufschluss darüber geben, ob dieser Locus mit Resistenz im Zusammenhang steht und wie seine Rolle dabei einzuschätzen ist.
- Sequenzvarianten beeinflussen in Computersimulationen die Topologie und die Vorhersage subzellulärer Lokalisierung; in der Realität können tatsächlich aber bereits geringste strukturelle Variationen erhebliche Aktivitätsunterschiede bis hin zum Funktionsverlust verursachen. Auch wirken cis-regulatorische Elemente in manchen

Fällen *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich – oder zeigen u.U. gar keinen Effekt. Letztlich kann also erst der Nachweis, die Isolierung und die funktionelle Charakterisierung der abgeleiteten Proteine, evtl. ergänzt durch Komplementationsstudien, Aufschluss über die Bedeutung der identifizierten Sequenzen und ihrer Varianten *in vivo* geben. Dass in ‘Lemberger‘ der Marker RL17.367 offenbar homozygot vorliegt, bedeutet möglicherweise, dass ‘Lemberger‘ bestimmte in ‘Regent‘ exprimierte Varianten nicht bilden kann.

Festhalten lässt sich, dass der heterozygote Genotyp über die zusätzlichen Möglichkeiten des Trans-Splicing die vielfältigsten Möglichkeiten der Thioredoxin-Variantenbildung bietet. Zwar weist ‘Regent‘ als Vertreter des heterozygoten Typs gute Resistenz auf, während ‘Lemberger‘ als homozygoter Markerträger pilzanfällig eingestuft ist, doch ist dies nicht ausreichend, um auf eine unmittelbare funktionelle Verbindung zum Markerlocus zu schließen, dessen Rolle an der phänotypischen Resistenzprägung erst noch exakt zu belegen wäre.

Unabhängig von möglichen Spekulationen ist es gelungen, auf der Basis einer zunächst entwickelten genetischen Markerkarte in enger Kopplung zu einem Major-QTL-Maximum für Resistenz ein putatives T10P12.4-Ortholog der Weinrebe zu identifizieren, das als Kandidat für die Beteiligung an der Pathogenantwort in Frage kommt.

## **5.10 Ergänzende Betrachtungen**

Die von molekularen Markern der Weinrebe in Korrelation zu QTL ausgehenden Analysen auf DNA- und Proteinebene haben den Blick auf über weite phylogenetische Distanzen hinweg konservierte genetische Systeme gelenkt. Die folgenden Überlegungen widmen sich einigen Aspekten dieser Zusammenhänge.

### **5.10.1 Wie aussagekräftig ist die QTL-Kartierung, wenn man auf die Identifikation von Genen abzielt?**

Dass die QTL-Kartierung sich als erster Schritt zur Identifizierung von Genen, die quantitative Merkmalsausprägung bedingen können, sehr gut eignet - besonders, wenn erst wenig über Kandidatenloci bekannt ist (MITCHELL-OLDS und PEDERSEN, 2001), bestätigte sich. Das Auflösungsvermögen der QTL-Methode hängt naturgemäß von Parametern wie der Qualität der Merkmalerfassung, dem Populationsumfang, der Genomgröße und der Markerdichte ab, reicht jedoch im Normalfall nicht aus, um für einen QTL definitive Aussagen über die Zahl beteiligter Gene zu treffen. Ebenso ist auch

die Anzahl an ermittelten QTL als Näherung zu sehen, bis die Genomregionen, die für den kumulativen Effekt in der Phänotypenausprägung verantwortlich sind, untersucht und voneinander differenziert sind (MACKAY und FRY, 1994; ZENG, 1994). Bezugnehmend auf die Ergebnisse dieser Arbeit ist z.B. auch die Bedeutung einer Anzahl schwächerer QTL mit LOD-Werten um 2-3 sowie möglicher Interaktionen zwischen verschiedenen QTL noch offen. Auf dem Weg von der QTL-Analyse zur Charakterisierung zugehöriger Genombereiche wurde an der Basis eines Major-QTL für *Plasmopara viticola*-Resistenz ein putatives Thioredoxin identifiziert. Innerhalb codierender Bereiche ausgeprägte Polymorphismen stehen möglicherweise für verschiedene Allele oder Paraloge und führen eventuell zu diversen Splice-Varianten zugehöriger Genprodukte. Weitere Polymorphismen liegen in Segmenten mit regulatorischem Charakter. In wieweit ist es jedoch gerechtfertigt, Sequenzvariation in codierenden oder regulativen Regionen als ursächlich für die QTL-Ausprägung zu diskutieren?

MITCHELL-OLDS und PEDERSEN (2001) liefern einen guten Interpretationsrahmen für mutmaßliche Zusammenhänge zwischen individuellen Unterschieden auf DNA-Ebene und quantitativen Effekten in einer Population. Anhand ihrer gezielten *in vivo*-Aktivitätsstudien an Ökotypen von *Arabidopsis* in Kombination mit QTL-Kartierung ließen sich zentrale Fragen zur Natur von QTL beantworten: demnach trifft es sowohl für Enzymbeispiele des Zentralstoffwechsels als auch der Abwehr grundsätzlich zu, dass einzelne QTL ganz bestimmte Reaktionssysteme beeinflussen. Ihre geschickte Auswahl der Genotypen erlaubte es, Unterschiede auf der Ebene der Enzymaktivität eindeutig auf Polymorphismen in regulatorischen, nicht-codierenden Genombereichen zurückzuführen. Auch allelische Variation regulatorischer Elemente machte sich als quantitativer Effekt bemerkbar.

Positive Korrelation ist häufig so deuten, dass Enzyme, die über ihre metabolische Funktion in enger funktioneller Beziehung zueinander stehen, auch durch gemeinsame Loci gesteuert werden, als gemeinsamer QTL in Erscheinung treten und – konkret - ihre Expression durch ein gemeinsames Regulatorprotein stimuliert wird.

Die Studien belegten des weiteren, dass der Sekundärmetabolismus einer Pflanze im Schnitt doppelt so stark durch QTL-Effekte beeinflusst wird, wie ihre Housekeeping-Funktionen. Resistenzeffekte eignen sich aus dieser Sicht für die QTL-Analyse besonders. Insgesamt betonen die Autoren den hohen Stellenwert der funktionellen Analyse regulatorischer Elemente und Einheiten bei der Interpretation von QTL.

Ein unmittelbarer Nutzen der QTL-Analyse besteht darin, einzelne besonders stark ausgeprägte Effekte kenntlich zu machen und den entsprechenden Genombereich „handhabbar“ zu machen. In der Praxis beinhaltet dies die Möglichkeit, die Introgression eines Locus zu überwachen oder QTL-tragende Chromosomenabschnitte eines Donorelterns in der Nachkommenschaft durch konservierte Muster molekularer Marker nachzuweisen, um Zuchtmaterial zu selektieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation erlauben ein solches Vorhaben bereits.

### **5.10.2 Interpretation quantitativer Resistenzausprägung und der Begriff des Kandidatengens**

Das Gesamterscheinungsbild eines resistenten Phänotyps wird letztlich durch ein Zusammenspiel gleichsinnig wirkender oder auch komplementärer Faktoren verursacht. Die quantitative Natur eines Merkmals schließt nicht aus, dass es sortenspezifische Hauptdeterminanten einer Anlage wie der Resistenz gibt oder, dass eventuell Monogene mit „Bottleneck“-Funktion an Schnittstellen der Regulation für pleiotrope Effekte verantwortlich sind. Auch die Klärung solcher Fragen kann von einer QTL-Studie über Untersuchungen auf DNA-Ebene zu Lokalisierung von Kandidatengen führen. Im Fall von ‘Regent’ als Resistenzträger kann man nun gezielt testen, ob sich Kandidatengene (z.B. über CAPS-Kartierung) mit identifizierten QTL in Beziehung setzen lassen.

MITCHELL-OLDS und PEDERSEN (1998) erweiterten den klassischen Begriff des Kandidatengens unter Aufgreifen eines Konzepts von HOLTON und CORNISH (1995): Neben der Kategorie der „Strukturgene“, der sie in klassischer Weise proteincodierende Loci zuordnen, fassten sie unter dem abstrakten Begriff der „regulatorischen Gene“ alle kontingenten Elemente wie Transkriptionsfaktoren und ihre Bindungsstellen, Promotor- und Enhancerelemente, den Einfluss von Hormonsynthese, von Proteinkinase- und Phosphatasesystemen, allosterische Wechselwirkungen etc. zusammen und belebten so das abstrakte Modellkonzept „Gen“ wieder mit neuen „realen“ Inhalten.

Ein „Kandidatengen für Resistenz“ könnte demnach beispielsweise für ein bestimmtes PR- oder R-Gen, für die besonders effiziente Variante eines Genprodukts, aber auch für einen aktivierenden Faktor oder ein Arrangement effektiv wirkender cis-regulatorischer Elemente in der regulatorischen Region eines ansonsten konservierten Strukturgens stehen. WONG et al. (2004), die Schlüsselenzyme der Carotinoidbiosynthese als Kandidatengene im Zentrum von Major QTL lokalisierten, entschieden sich ebenso wie

schon THORUP et al. (2000) unter Verweis auf die lebenswichtige Integrität und Funktionalität der Carotinoidstrukturgene für diese Interpretation.

Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Thioredoxinlocus könnte einen regulierenden „Faktor“ repräsentieren, der seinerseits komplex kontrolliert ist. Von CITRX (Cf-9-interacting thioredoxin) weiß man bereits mit Gewissheit, dass es in *Nicotiana benthamiana* mit einem Resistenzgen interagiert und sich im Experiment als Resistenz-Regulator zeigt (vgl. RIVAS et al., 2004).

### 5.10.3 Überlegungen zu pflanzlicher Pilzresistenz

Resistenz kann nach dem augenblicklichen Stand der Forschung als Vereinbarkeit einer effektiven lokalen Pathogenantwort mit der Erhaltung der Vitalität interpretiert werden.

Qualitative Resistenz kann durch Schlüsselstrukturgene ermöglicht werden, die dominant (z.B. 13 gegen Falschen Mehltau gerichtete *R*-Gene aus *Lactuca sativa*; MICHELMORE et al., 1985), rezessiv (z.B. *mlo* – vermittelte Resistenz gegen Echten Mehltau in *Hordeum vulgare*), intermediär (z.B. das gegen Falschen Mehltau wirksame P45 aus *Cucumis melo*; ECKARDT, 2004 und Referenzen darin) in additiver oder komplementärer Weise wirken (ebd.). Quantitativ variierende Resistenz könnte durch das Zusammenwirken solcher Gene in Interaktion mit vorhandenen positiven und negativen Modulatoren sowie dem Einfluss regulatorischer Elemente erklärbar sein. Simultan müssen in benachbarten Geweben oder sogar Zellen Homöostasis und Extrem, lebenserhaltende Funktionen und gesteuerter Zelltod ablaufen können. Dies erfordert Flexibilität.

Pflanzen müssen generell durch ein breites Spektrum an Abwehrmöglichkeiten und eine große Bandbreite der Stoffwechselmodulation die Nachteile der Standortfixierung ausgleichen. Dazu gehören im Fall erfolgreicher Pathogenabwehr

- die Bereitstellung von Vorstufen abwehraktiver Komponenten und Effektormolekülen (was in einer Art systemischer **Prädisposition** münden würde),
- die **Variantenbildung** und die **beschleunigte Evolution** betreffender Genombereiche, um der Anpassungsfähigkeit eines Schaderregers schnell entgegenwirken zu können,
- die Entwicklung von effizienten **Modulsystemen** zur Schonung von Ressourcen,
- **differentielle Regulationsmechanismen**, um Signaltransduktionswege auf verschiedenen Ebenen zu aktivieren, zu optimieren und pathogeninduzierte Blockaden zu umgehen.

In diesen skizzierten Rahmen passt auch, was über Thioredoxine bekannt ist, bzw. sich im Verlauf der Dissertation abgezeichnet hat.

#### **5.10.4 Übergreifende Gemeinsamkeiten im Organismenreich**

Viele grundlegende Stoffwechsellinstrumentarien sind über enorme evolutive Spannen hinweg konserviert, denn Stimuli wie oxidativer Stress sind universell. So steuern bei Pflanze und Tier ähnliche wirksame Prinzipien die Reaktion auf Verwundung und Entzündung. Die gesundheitsfördernde Wirkung vieler pflanzlicher Heilmittel, darunter polyphenolhaltige Extrakte, lässt sich damit verständlich machen. Kompatible Wechselwirkungen erstrecken sich bis auf die Ebene der Genregulation: Beispielsweise kann das Resveratrol der Weinrebe in Säugerzellsystemen die Wirkungsweise des Östrogens entfalten und sogar weit übertreffen (BHAT et al., 2001); pflanzliche Homöoboxtranskriptionsfaktoren wie *Zmhox1* besitzen Untereinheiten, die separat agierenden Wirbeltiertranskriptionsfaktoren entsprechen (BELLMANN und WERR, 1993) und anti-apoptotische Gene aus Tieren bewirken in transgenen Pflanzen multiple Resistenz (DICKMAN et al. 2001).

Die Parallelen zwischen Signalkomponenten bei Pflanze und Tier, z.B. solchen der Entzündungsantwort, bestehen also nicht nur auf der Ebene von Sequenzhomologien, sondern auch funktionell. Sie werden noch vorsichtig als „Analogien“ bezeichnet (BERGEY et al., 1996), etwa wenn das Immunsystem der Tiere mit der (systemischen) Resistenz der Pflanzen verglichen wird. Die Klassifizierung mit Begriffen der vergleichenden Genetik (homolog, ortholog etc.), die sich auch über weite taxonomische Spannen hinwegsetzt, findet jedoch immer mehr Akzeptanz. Organismenübergreifende Ähnlichkeiten können, wie in den oben aufgeführten Beispielen, Anregung liefern, um ein neu entdecktes oder nur unvollständig charakterisiertes System zu untersuchen und verstehen zu lernen.

#### **5.10.5 Besonderheiten von Pflanzen**

Trotz vieler Gemeinsamkeiten darf man Unterschiede zwischen Pflanze und Tier wie auch Unterschiede von Pflanze zu Pflanze nicht aus dem Blick verlieren. Der Stoffwechsel der Pflanze als sessilem Organismus muss in komplexer und flexibler Weise auf Umweltfaktoren reagieren können, um den Mangel an Mobilität zu kompensieren. Als logische Konsequenz lässt sich bei Pflanzen eine Stoffwechselfersatilität beobachten, die sich selbst bei verwandten Taxa in erheblichen



Unterschieden äußern kann. Daher hat sich bei der Bewertung der Übertragbarkeit mancher Metabolismusfunktionen und ihrer Regulation Ernüchterung eingestellt. Ein Beispiel für ein System, das sozusagen „aus dem Rahmen fällt“, ist die endogene Gibberellinwirkung der Rebe: anders als bei den meisten Pflanzen, auch *Arabidopsis*, wo dieses Phytohormon die Blüte fördert, hemmt es die Entwicklung von Infloreszenzen („Gescheinen“) bei *Vitis* (BOSS und THOMAS, 2002).

#### **5.10.6 Ausblick**

Die vorgestellten Resultate bieten eine gute Grundlage für die vertiefende Charakterisierung der Pilzresistenz von ‘Regent‘ wie auch für intervarietale Studien. Vergleiche bisheriger QTL-Kartierungen geben Anlass zu der Vermutung, dass Pilzresistenzen der Rebe spezifisch über wenige „Resistenzträgerchromosomen“ vererbt werden (ZYPRIAN et al., 2003, MARINO et al., 2003; FISCHER et al., 2004). Ein Beleg dieser These wäre von unmittelbarer Relevanz für die moderne Rebenzüchtung. Weiterführende Arbeiten könnten die Feinkartierung von QTL-Bereichen, zusätzliche Walking-Experimente sowie die Entwicklung und Validierung übertragbarer SCAR-Marker einschließen. Gelingt es, aussagefähige SCAR-Marker in enger Kopplung zu Schlüssel-Loci zu entwickeln, so lässt sich das Durchmustern einer großen Anzahl von Sämlingen künftig weiter vereinfachen und auch präzisieren. Zum Stand dieser Dissertation ist die direkte Ableitung von SCAR-Markern aus AFLPs deshalb noch etwas schwierig, weil sich in Frage kommende Markersequenzen durch repetitive Elemente der Primerentwicklung für die Routineanwendung entziehen. Gegenwärtig besteht allerdings schon die Möglichkeit, spezifische Markerprofile aus der QTL-Analyse zu screenen und – z.B. über Batch-Verfahren - mit qualitativer Resistenz zu korrelieren. Die genauere Untersuchung des identifizierten Thioredoxinlocus und die Charakterisierung möglicher Genprodukte erscheinen ebenfalls interessant.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

153 Nachkommen einer Kreuzung aus der pilzresistenten Rebsorte ‘Regent’ und ‘Lemberger’ als pilzsensitiver Sorte zeigen quantitative Merkmalsvariation bezüglich der Resistenz gegen *Plasmopara viticola* und *Uncinula necator* sowie für Eigenschaften die z.B. das Eintreten der Beerenreife betreffen.

Auf dem Weg über die genetische Kartierung mit molekularen Markern und der Lokalisierung von QTL-Effekten konnten Hinweise auf weinbaulich relevante Genomregionen gewonnen werden; dies liefert z.B. die Basis für markergestützte Selektion bei Zuchtvorhaben mit dem Resistenzträger ‘Regent’ (vgl. auch FISCHER et al., 2004). Ein Major-QTL für die Resistenz gegen den Echten Mehltau *Uncinula necator* sowie zwei Major QTL für die Resistenz gegen den Erreger des Falschen Mehltau, *Plasmopara viticola*, traten mit hoher Signifikanz auf drei verschiedenen Kopplungsgruppen von ‘Regent’ auf. Auch Regionen mit Relevanz für das Eintreten der Beerenreife wurden beschrieben.

Über die Isolierung, Sequenzierung und anschließende Analyse einzelner Markerfragmente ist es gelungen, ein putatives T10P12.4-Ortholog der Weinrebe in enger Kopplung zu einem Major-QTL-Maximum für *Plasmopara viticola*-Resistenz zu identifizieren, das als Kandidat für die Beteiligung an der Pathogenantwort in Frage kommt. Es konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die eingesetzten Methoden der Kartierung und QTL-Analyse unter Verwendung PCR-basierter Markertypen wie SSR und AFLP und einer beschleunigten Analyse über computergestützte Kapillargelelektrophorese in vertretbarem Zeitrahmen bis zur Isolation potentieller Schlüsselgene führen können. Die grundsätzliche Eignung der QTL-Analyse als effizientes Werkzeug gezielter Züchtungsplanung für den Weinbau bestätigte sich. Ihre Anwendung im Rahmen der vorliegenden Dissertation hat die Basis für die Nutzung von QTL-Information bei dem Vergleich etablierter und der Entwicklung neuer Sorten gelegt und zum Verständnis von Prozessen beigetragen, die den betrachteten Eigenschaften wie der Pilzresistenz möglicherweise zu Grunde liegen. Ein großer Teil der gewonnenen Daten bringt auch die Untersuchungen anderer Kultivare voran und ist intervarietal übertragbar. Darüber hinaus haben sich Chancen für vergleichende Studien zwischen der Weinrebe einerseits und der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sowie weiteren Kulturpflanzen andererseits abgezeichnet.

Die Hinweise auf die zentrale Rolle und universelle Natur des Redox-Signalling haben interessante Perspektiven zum Verständnis organismenübergreifender physiologischer Zusammenhänge eröffnet. Dies betrifft z.B. auch die Reaktion auf Verwundung oder die Pathogenantwort. Es handelt sich möglicherweise um eines der frühesten in der Evolution etablierten und konservierten Reiz-Reaktionsmuster überhaupt, das selbst für die artifiziiellen Methoden moderner Pflanzenzüchtung nicht an Relevanz verliert.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Agrawal DC, Eibach R, Zyprian E (2003) Genetische Diversität in *Vitis aestivalis* Nachkommen. Deutsches Weinbau-Jahrbuch 54: 79-84
- Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics; 132(4):1131-9
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M: Introductory Mycology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996
- Allard RW: Principles of Plant Breeding., New York, London: John Wiley & Sons, 1960
- Alleweldt G (2000): Die Geschichte der Resistenzzüchtung von Reben in Deutschland. Mitteilungen des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof 28/2: 24-30
- Alonso JM, Leisse TJ, Barajas P, Chen H, Cheuk R, Gadrinab C, Jeske A, Karnes M, Kim CJ, Parker H, Prednis L, Shinn P, Zimmerman J, Ecker JR (2001): SALK: A Sequence-Indexed Library of Insertion Mutations in the *Arabidopsis* Genome
- Alonso JM, Ecker JR (2001) The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. Sci STKE 2001 Feb 20;2001(70):RE1
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410
- Alvarez ME, Pennell, RI, Meijer PJ, Ishikawa, A, Dixon, RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92:773-84
- Ambrosi H, Dettweiler-Münch E, Rühl EH, Schmid J, Schumann F: Farbatlas Rebsorten. Stuttgart: Ulmer, 1998
- Aradhya MK, Dangl GS, Prins BH, and Simon CJ (2002) Genome diversity in cultivated grape, *Vitis vinifera* L., as revealed by microsatellite polymorphism. Presented at the Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference, January 12-16, 2002
- Auh C, Murphy TM (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. Plant Physiol 107, 1241-1247
- Averýanov AA, Lapikova VP, Nikolaev ON, Stepanov AI (2000) Active oxygen –associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. Biochemistry 65(11): 1292-8
- Axeisson T, Shavorskaya O, Lagercrantz U. (2001) Multiple flowering time QTLs within several *Brassica* species could be the result of duplicated copies of one ancestral gene. Genome 44(5):856-64
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Mol Plant Microbe Interact. 16(12):1118-28
- Bailey TL and Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 28-36. Menlo Park, California: AAAI Press, 1994
- Bailey TL and Gribskov M (1998) Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. Bioinformatics 14(48-54)
- Bais AJ, Murphy PJ, and IB Dry (2000) The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. Aust J Plant Physiol 27:425-433
- Ballvora A Ercolano MR, Weiß J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F and Gebhardt C (2002) The R1 gene for potato resistance to late blight belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. Plant J 30(3): 361-371
- Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schurmann P, Droux M, Buchanan BB (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(8):2642-7
- Balergue S, Dubreucq B, Chauvin S, Le-Clainche I et al. (2001) Improved PCR-Walking for large scale isolation of plant T-DNA borders. BioTechniques 30:496-504
- Beavis WD (1994) The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. Proceedings of the 49<sup>th</sup> Ann. Corn and Sorghum Industr. Res. Conf. (Chicago) 49:250-266
- Beckmann JS, Soller M (1990) Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology 8(10):930-2

- Bellmann R, Werr W (1993) Zmhox1a, the product of a novel maize homeobox gene, interacts with the Shrunken 26 bp feedback control element. *Plant J* 4(1):137-50
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *PNAS* 93: 12053-12058
- Bergey DR, Ryan CA (1999) Wound and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol Biol* 40: 815-823
- Berggren MM, Powis G (2001) Alternative splicing is associated with decreased expression of the redox proto-oncogene thioredoxin-1 in human cancers. *Arch Biochem Biophys* 389(1):144-9
- Bezier, A, Lambert B, Baillieul F (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 108(2) 111-120
- Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (2001) Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res.* 15;61(20):7456-63
- Borello U, Ceccarelli E, Giuliano G (1993) Constitutive, light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different I box elements in plant light-regulated promoters. *Plant J* 4(4):611-9
- Börner A, Korzun V, Voylokov AV, Worland AJ, Weber WE (2000) Genetic mapping of quantitative trait loci in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 116: 203-209
- Boss PK, Thomas MR (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416(6883):847-50
- Botella MA, Parker JE, Frost LN, Bittner-Eddy PD, Beynon JL, Daniels MJ, Holub EB, Jones JD (1998) Three genes of the Arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* 10 (11): 1847-1860
- Bouchez D, Tokuhisa JG, Llewellyn DJ, Dennis ES, Ellis JG (1989) The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J* 8:4197-4204
- Bouquet A, Pauquet J, Adam-Blondon AF, Torregrosa L, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S (2000) [Towards the obtention of grapevine varieties resistant to powdery and downy mildews by conventional breeding and biotechnology] *Titel (orig.): Vers l'obtention de variétés de vigne résistantes à l'oidium et au mildiou par les méthodes conventionnelles et biotechnologiques. Bulletin de l'O.I.V. France* 73 (833-834) 445-452
- Bowers JE, Dangl GS, Vignani R and Meredith C (1996) Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) *Genome* 39, 628-633
- Bowers, JE, Dangl, GS and Meredith C (1999) Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Vitic* 50 (3), 243-246
- Bowles D (1998) Signal transduction in the wound response of tomato plants. *Phil Trans R Soc Lond B* 353: 1495-1510
- Bowles D (1997) The wound response of tomato plants: analysis of local and long-range signalling events. In: *Essays in Biochemistry*, Vol. 32: 161-169
- Breiteneder H, Ebner C (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 106(1 Pt 1):27-36
- Brendel V, Kleffé J, Carle-Urioste JC and Walbot V (1998): Prediction of splice sites in plant pre-mRNA from sequence properties. *J. Mol. Biol.* 276(1), 85-104.
- Budewig S und Léon J (2002) Nutzung von Wildformen zur Verbesserung quantitativer Merkmale. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 54, 513-516
- Burge CB. Modeling dependencies in pre-mRNA splicing signals. In: Salzberg S, Searls D and Kasif S, eds. *Computational Methods in Molecular Biology*. Amsterdam, Elsevier Science, 1998: pp. 127-163.
- Buck S and Zyprian E (2000) First approaches of molecular mapping in a model population derived from the crossing of „Regent“ x „Lemberger“. *Acta Hort.* 528, ISHS 2000, Vol 1, 203-207
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J et al. (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705
- Büttner M and Singh KB (1997) *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*: 94(11):5961-6
- Caballero A and PD Knightley (1994) A pleiotropic nonadditive model of variation in quantitative traits. *Genetics* 138:883-900

- Cai Q, Guy CL, Moore GA (1994) Extension of the genetic linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl Genet* 89:606-614
- Casa AM, Brouwer C, Nagel A, Wang L, Zhang, Q, Kresovich S Wessler SR (2000) The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in maize. *PNAS* 97(18):10083-10089
- Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, van Wijk R, Motto M (1999) AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor Appl Genet* 99:425-431
- Chin DB, Arroyo-Garcia R, Ochoa OE, Kesseli RV, Lavelle DO, and Michelmore RW (2001) Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genetics* 157, 831–849
- Comtois SL, Gidley MD, Kelly DJ (2003) Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 149 (Pt 1):121-9
- Coutos-Thevenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R, Boulay M (2001) *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. *J Exp Bot.* 52(358): 901-10
- Cuisset C, Boursiquot JM and This P (1995) Genetic diversity in grapevine (*Vitis vinifera*) assessed by microsatellite markers. Plant Genome IV Conference, San Diego, CA, January, 1995
- Dalbó MA (1998) Genetic mapping, QTL analysis and marker-assisted selection for disease resistance loci in grapes. Ph.D. Thesis, Cornell Univ. Ithaca, NY
- Dalbó, MA, Ye GN, Weeden NF, Steinkellner H, Sefc KM, and Reisch BI (2000) Gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43:333-340
- Dangl J and Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833
- Davies C and Robinson SP (2000) Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal for Grape and Wine Research* 6, 175-188
- Dekkers, JCM, and Hospital F (2002) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Genet. Rev.* 3, 22-32
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002) A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*;111(4):471-81
- Denekamp M, Smeekens SC (2003) Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiol* 132(3):1415-23
- Dettweiler E, Jung A, Zyprian E, Töpfer R (2000) Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true to type descent. *Vitis* 39(2): 63-65
- Dettweiler E (2001) EU-Projekt zur Erhaltung und Charakterisierung der genetischen Ressourcen der Weinrebe. *Mitteilungen des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof* 29/2: 11-20
- Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA and Dangl JL (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77:565-577
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, and Dangl JL (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88:685-694
- Di Gaspero G, Peterlunger E, Testolin R, Edwards KJ, Cipriani G (2000) Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theor Appl Genet* 101 (1-2) 301-308
- Di Gaspero G and Cipriani G (2002) Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). DOI 10.1007/s00122-002-1062-6
- Di Gaspero G and Cipriani G (2003) Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol Gen Genomics* 269:612-623
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Srinivasa Reddy MS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3(5), 371-390
- Dodds, PN, Lawrence, GJ, and Ellis, JG (2001) Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax. *Plant J.* 27, 439–453
- Dolferus R et al. (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh genes. *Plant Physiol* 105(4): 1075-87

- Doligez A, Bouquet A, Danglot Y, Lahogue F, Riaz S, Meredith CP, Edwards KJ and This P (2002) Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor Appl Genet* 105: 780-795
- Don RH, Cox P-T, Wainwright BJ, Baker K and Mattick JS (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008
- Donald TM, Pellerone F, Adam-Blondon AF, Bouquet A, Thomas MR, Dry IB (2002) Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet* 104(4): 610-618
- Dong L, Mack A, Wang R, Galli M, Belk J, Ketpura NI, Crawford NM (2001) Functional dissection of the cis-Acting Sequences of the *Arabidopsis* Transposable Element Tag1 reveals dissimilar subterminal sequence and minimal spacing requirements for transposition. *Genetics* 157: 817-830
- Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ (2001) Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 15;61 (12):4731-9
- Dudley JW (1993) Molecular Markers in plant improvement: Manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci* 33:660-668
- Ebel J, Scheel D. Elicitor recognition and signal transduction; in: Genes involved in plant defense. Boller T and F Meins, Eds. Wien, New York: Springer, 1992.
- Ebner C, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H (2001) Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy* 56 Suppl 67:43-4
- Eckardt NA (2004) Aminotransferases confer „enzymatic resistance“ to downy mildew in melon. *Plant Cell* 15, 1-4
- Eibach R, Diehl H, Alleweldt G (1989) Investigation on the heritability of resistance to *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* in grapes. *Vitis* 28:209-228
- Ellis JG, Tokuhisa JG, Llewellyn DJ, Bouchez D, Singh K, Dennis ES, Peacock WJ (1993) Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes ? *Plant J.* 4: 433-443
- Fabianek RA, Hennecke H, Thony-Meyer L (2000) Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev.* 24(3):303-16
- Feldbrugge M, Sprenger M, Dinkelbach M, Yazaki K, Harter K, Weisshaar B (1994) Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell* 6(11):1607-21
- Feldbrugge M, Hahlbrock K, Weisshaar B (1996) The transcriptional regulator CPRF1: expression analysis and gene structure. *Mol Gen Genet* 251(6):619-27
- Feldbrugge M, Sprenger M, Hahlbrock K, Weisshaar B (1997) PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J* 11(5):1079-93
- Fenton SE, Groce NS, Lee DC (1996) Characterization of the mouse epidermal growth factor promoter and 5'-flanking region. Role for an atypical TATA sequence. *J Biol Chem.* 271(48):30870-8
- Fischer BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Topfer R and Zyprian EM (2004) Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor Appl Genet* 108:501-515
- Fischer D, Bachmann K (1998) Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *Biotechniques* 24(5):796-800, 802
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. 4th. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54:357-74
- Flor HH (1955) Host-parasite interactions in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Rev Phytopathol* 9, 275-296
- Frank MJ, Liu D, Tsay YF, Ustach C, Crawford NM (1997) Tag1 is an autonomous transposable element that shows somatic excision in both *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* (10):1745-56
- Frisch M and Melchinger E (2001) The length of the intact donor chromosome segment around a target gene in marker assisted backcrossing. *Genetics* 157:1343-1356
- Fu H, Zheng Z, Dooner HK (2002) Recombination rates between adjacent genic and retrotransposon regions in maize vary by 2 orders of magnitude. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 99(2):1082-7

- Garrido EO, Grant CM (2002) Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol* 43(4):993-1003
- Gebhardt C and Valkonen JPT (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu Rev Phytopathol* 39, 79-102
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94; 14138-14143
- Gish W (1996-2000) <http://blast.wustl.edu>
- Glazebrook J, Zook M, Mert F, Kagan I, Rogers EE, Crute IR, Holub EB, Hammerschmidt R, Ausubel FM (1997) Phytoalexindeficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146(1): 381-392
- Good L. (2003) Translation repression by antisense sequences. *Cell Mol Life Sci.* 60(5):854-61
- Goodman RN and Novacky AJ (1994) The hypersensitive response reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. St. Paul, MN: American Phytopathology Society Press
- Grando MS, Bellin D, Edwards KJ, Pozzi C, Stefanini M and Velasco R (2003) Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. *Theor Appl Genet* 106: 1213-1224
- Grant JJ, and Loake GJ (2000) Role of active oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiol* 124:21-29
- Grant M and Mansfield J (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2:312-319
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxydative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23(4): 441-50
- Grattapaglia D and Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137
- Greenberg JT, Ailan G, Klessig DF and Ausubel FM (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77, 551-563
- Grimmig, B, Matern U (1997) Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive cis-acting element. *Plant Mol. Biol.* 33:323
- Gross P, Julius C, Schmelzer E and Hahlbrock K (1993) Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected cultured parsley cells. *EMBO J.* 12, 1735-1744
- Gullino ML, Gilardi G, Stefanelli G, Mescalchin E, Garibaldi A (2001) Presenza di popolazioni di *Plasmopara viticola* resistenti ai fungicidi inibitori della respirazione mitocondriale (QoI STAR) in vigneti dell'Italia nord-orientale [Detection of populations of *Plasmopara viticola* resistant to fungicides inhibiting mitochondrial respiration (QoI STAR) in vineyards located in North Eastern Italy: *Informatore Fitopatologico* 51 (12) 86-87
- Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH, et al (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361(6408):153-6
- Hajdu E (2000) Die Geschichte der Resistenzzüchtung in Ungarn. *Mitteilungen des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof* (2000) 28/2: 31-42
- Haldane JBS (1919) The Combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *J Genet* 8:299-309
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290: 2110-3
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J* 21(16):4327-37
- Herbergs J, Siwek RP, Crooijmans RPMA, Van der Poel JJ, Groenen MAM (1999) Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). *Animal Genetics* 30, 274-285
- Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid

- hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur J Biochem* 269(9):2414-20
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 27, 297-300
- Hillebrand W, Lorenz D, Louis F. Rebschutz. Mainz: Fachverlag Fraund, 1998.
- Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J (2002) Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Ann N Y Acad Sci* 957:189-99
- Holton TA and Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyan biosynthesis. *Plant Cell* 7:1071-1083
- Hoos G (1988) Untersuchungen über den Metabolismus von Stilbenen an Zellkulturen von *Vitis*. Dissertation Universität Karlsruhe
- Hovring PI, Matre V, Fjeldheim AK, Loseth OP, Gautvik KM (1999) Transcription of the human thyrotropin-releasing hormone receptor gene-analysis of basal promoter elements and glucocorticoid response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 257(3):829-34
- Hückelhoven R, Trujillo M, Kogel KH (2000) Mutations in Ror1 and Ror2 genes cause modifications of hydrogen peroxide accumulation in *mlo* barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol* 1: 287-292
- Huntley et al. (1966) Heritability of intelligence. In: Meade, J.E., Parkers, A. S. (eds.) Genetic and environmental factors in human ability, pp. 201-218. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1966
- Husfeld B (1932) Über die Züchtung plasmoparawiderstandsfähiger Reben. *Gartenbauwissenschaft* 7:15-92
- Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, Miginiac-Maslow M (2001) Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *Plant J* 25(2):127-35
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Acad Sci USA* 94:4800-4805
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M (2002) Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem*. 50(10):2731-41
- Jones CJ et al. (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390
- Kalde M, Barth M, Somssich IE, Lippok B (2003) Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact*. 16(4): 295-305
- Kao CY, Cocciolone SM, Vasil IK, McCarty DR (1996) Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the C1 gene of maize. *Plant Cell* 8(7): 1171-9
- Katoh I, Tomimori Y, Ikawa Y, Kurata S (2004) Dimerization and processing of procaspase-9 by redox stress in mitochondria. *J Biol Chem* 279(15):15515-23
- Katz VA, Thulke OU, Conrath U (1998): A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* 117(4):1333-9.
- Kemmink J, Darby NJ, Dijkstra K, Nilges M, Creighton TE (1997) The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr Biol* 7(4):239-45
- Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, Niino M, Tashiro K (2002) Effect of geranylgeranyl-aceton on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res*. 69(3):373-81
- Kiraly Z; Barna B; Ersek T (2001) Hypersensitivity as a consequence, not the cause, of plant resistance to infection. *Nature (London)* 239:456-458
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M (2004) Oxidative stress sensor keap1 functions as an adaptor for cul3-based e3 ligase to regulate proteasomal degradation of nrf2. *Mol Cell Biol*. (16):7130-9
- Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N (2001) Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci* 160(3):543-550



- Kolattukudy PE, Rogers LM, Li D, Hwang CS, Flaishman MA (1995) Surface signalling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(10):4080-7
- Kombrink E, Schmelzer E (2001) The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 107: 69-78
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4(2):403-10
- Koo KH, Lee S, Jeong SY, Kim ET, Kim HJ, Kim K, Song K, Chae HZ (2002) Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch Biochem Biophys* 397(2):312-8
- Koolman J und Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, New York: Thieme, 1994
- Korneev S, O'Shea M (2002) Evolution of nitric oxide synthase regulatory genes by DNA inversion. *Mol Biol Evol*. 19(8):1228-33
- Kortekamp A, Wind R, Zyprian E (1998) Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105, 475-488
- Kortekamp A, Wind R, Zyprian, E (1997) The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two -susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis* 36 (2) 103-104
- Kortekamp A and Zyprian E (1999) Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew on grape. *Journal of Phytopathology* 147 (7-8) 453-459
- Kortekamp, A and Zyprian, E (2003) Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using *in vitro* plants. *Plant Physiol* 160 (11): 1393-1400
- Kosambi DD, Raghavachari S (1952) Seasonal variation in the Indian birthrate. *Ann Eugen* 16:165-97
- Kuo PL, Chiang LC, Lin CC (2002) Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci* 72(1):23-34
- Lahaye T (2002) The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene - uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends Plant Sci*. 7(10):425-7
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP (2004) Stress and its W-Box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol*. (2004) [Epub ahead of Print].
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001) Identification and Characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *PNAS* 98(24):14144-14149
- Lamb C and Dixon E (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251-275
- Lande R, Thompson R (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124(3):743-56
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199
- Lander E, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daley M, Lincoln S, and Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computerpackage for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181
- Lee YJ, Kim D, Park EH, Lim CJ (2002) The 5'-flanking AT-rich sequence of thioredoxin gene involved in high-frequency transformation of the fission yeast. *Mol Cells* 13(2):347-50
- Lefebvre V, Palloix A. (1996) Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper – *Phytophthora Capsici* Leonian: Theoret. Appl. Genet. 93: 503-511
- Lefort F, Kyvelos KJ, Zervou M, Edwards KJ and Roubelakis-Angelakis KA (2002) Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids. *Molecular Ecology Notes* 2:20-21
- Leibenguth F. Die genetischen Grundlagen der Pflanzen- und Haustierzüchtung. Stuttgart; New York: Thieme, 1982
- Lim FL, Hayes A, West AG, Pic-Taylor A, Darieva Z, Morgan BA, Oliver SG, Sharrocks AD (2003) Mcm1p-induced DNA bending regulates the formation of ternary transcription factor complexes. *Mol Cell Biol* 23(2):450-61
- Lodhi MA, Reisch BI and Weeden NF. Genetic Linkage Maps of *Vitis* and QTL Detection by Interval Mapping. Plant Genome II Conference, Town & Country Conference Center, San Diego, CA, 1994

- Lodhi MA, Weeden NF and Reisch BI (1997) Characterization of RAPD Markers in *Vitis*. *Vitis* 36(3):133-140
- Lombardia LJ, Becerra M, Rodriguez-Belmonte E, Hauser NC, Cerdan ME (2002) Genome-wide analysis of yeast transcription upon calcium shortage. *Cell Calcium* 32(2):83-91
- Lorenz RJ: Grundbegriffe der Biometrie. Stuttgart, Fischer: 1988
- Loudet O, Chaillou S, Krapp A, Daniel-Vedele F (2003) Quantitative Trait Loci analysis of water and anion contents in interaction with nitrogen availability in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 163(2):711-22
- Luo SL, He PC, Zhou P, Zheng XQ (2001) Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistant genes in grape. *Acta Genet Sin [Yi Chuan Xue Bao]* 28(1):76-82
- Lupas A, Van Dyke M and Stock J (1991) Predicting Coiled coils from protein sequences. *Science* 252: 1162-1164
- Mackay TFC and Fry JD (1996) Polygenic mutation in *Drosophila melanogaster*: genetic interactions between selection lines and candidate quantitative trait loci. *Genetics* 144:671-688
- Marino R, Sevini F, Madini A, Vecchione A, Pertot I, Serra AD, Versini G, Velasco R, Grando MS (2003) QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. In: Proceedings of the VIIIth International Conference on Grape Genetics and Breeding. *Acta Hortic* 603:527-533
- Martin AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA (2004) Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol.* 67(7):1399-410
- Martin ME, Chinenov Y, Yu M, Schmidt TK, Yang XY (1996) Redox regulation of GA-binding protein-alpha DNA binding activity. *J Biol Chem* 11;271(41):25617-23
- Masih EI, Alie I, Paul B (2000) Can the grey mould disease of the grapevine be controlled by yeast? *FEMS Microbiology Letters* 189 (2) 233-237
- Masih EI, Paul B (2002) Secretion of beta-1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Curr Microbiol USA* 44 (6) 391-395
- Masoje P (2002) The application of molecular markers in the process of selection. *Cell Mol Biol Lett.* 7(2A):499-509
- Mather K (1941) Variation and Selection of polygenic characters. *J Genet.* 41:159-193
- Mather K: The measurement of linkage in heredity. Methuen, London: 1941
- McCombie WR, Adams MD, Kelley JM, FitzGerald MG, Utterback TR, Khan M, Dubnick M, Kerlavage AR, Venter JC, Fields C (1992) *Caenorhabditis elegans* expressed sequence tags identify gene families and potential disease gene homologues. *Nat Genet* 1(2):124-31
- McCord BR; McClure DL; Jung JM (1993) Capillary electrophoresis of polymerase chain reaction amplified DNA using fluorescence detection with an intercalating dye. *J. Chromatog. A.* 652: 75-82
- McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub EB, Dangl JL (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10 (11): 1861-1874
- Melchinger AE und Utz HF (2002) Einsatz von Markern für die Selektion in der Pflanzenzüchtung: Theorie und praktische Beispiele. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 54, 11-21
- Mendel G (1866) Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn, IV. Band,* 3-47
- Meng X, Zhang C, Chen J, Peng S, Cao Y, Ying K, Xie Y, Mao Y (2003) Cloning and identification of a novel cDNA coding thioredoxin-related transmembrane protein 21. *Biochem Genet* 41(3-4):99-106
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci.* 20(12):506-10
- Mestres-Ortega D, Meyer Y (1999) The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* 240(2):307-16
- Miao ZH, Lam E (1995) Construction of a trans-dominant inhibitor for members of the TGA family of transcription factors conserved in higher plants. *Plant J.* 7(6):887-96
- Michelmore RW, and Meyers BC (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res.* 8, 1113-1130
- Michelmore RW, Iltott T, Hulbert SH, Farrara B (1988) The downy mildews. *Adv Plant Pathol* 6, 53-79

- Miedaner T, Susic Z, Geiger HH (2002) Erweiterung der Diversität von selbstfertilen Roggenpopulationen durch Introgression genetischer Ressourcen. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 54, 81-88
- Millardet A. Notes sur les Vignes Americaines – Serie III. Ed. Masson-Feret (7883), 1886
- Mireau H, Lancelin D and Small ID (1996) The same Arabidopsis gene encodes both cytosolic and mitochondrial alanyl-tRNA synthetases. *Plant Cell* 8(6):1027-39
- Mitchell-Olds T, Pedersen D (1998) The molecular basis of quantitative genetic variation in central and secondary metabolism in Arabidopsis. *Genetics* 149:739-747
- Mittler R, Shulaev V, Seskar M and Lam E (1996) Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *Plant Cell* 8: 1991-2001
- Monckton DG, Jeffreys AJ (1993) DNA profiling. *Curr Opin Biotechnol*; 4(6):660-4
- Moore GA (2001) Clues to the Taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends in Genetics* 108
- Morgan TH et al. (1915) The mechanism of Mendelian heredity. Reprinted with an Introduction by Garland E. Allen. New York: Holt Rinehart & Winston, Johnson Reprint Corporation, 1978.
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7:277–318.
- Moser C, Segala C, Fontana P, Salakhutdinov I, Gatto P, Pindo M, Zyprian E, Toepfer R, Grando MS and Velasco R (2003) Expressed sequence tags from different organs of *Vitis vinifera*; GenBank GI:37187788 CF607141.1; direct database submission
- Multani, D.S., Meeley, R.B., Paterson, A.H., Gray, J., Briggs, S.P., and Johal, G.S. (1998) Plant-pathogen microevolution: Molecular basis for the origin of a fungal disease in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1686–1691
- Mur LA, Brown IR, Darby RM, Bestwick CS, Bi YM, Mansfield J, Draper J (2000) A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant J* 23(5): 609-21
- Nakai K, Kanehisa M (1991) Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11(2):95-110
- Naqvi NI, Chattoo BB (1996) Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. *Genome* 39(1):26-30
- Neinhuis C, Koch K, Barthlott W (2001) Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* 213(3):427-34
- Niemetz R, Gross GG (2003) Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. Enzyme belongs to the laccase-type phenol oxidases (EC 1.10.3.2) *Phytochemistry* 62(3):301-6
- Nishiyama A, Masutani H, Nakamura H, Nishinaka Y, Yodoi J (2001) Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life* 52(1-2):29-33
- Noel L, Moores TL, van der Biezen EA, Parniske M, Daniels MJ, Parker JE, and Jones JDG (1999) Pronounced intraspecific haplotype divergence at the RPP5 complex disease resistance locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11, 2099–2111
- Nunan KJ, Davies C, Robinson SP, Fincher GB (2001) Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214(2):257-64
- Olmo HP: The Origin and Domestication of the *Vinifera* Grape, in: PE McGovern et al. (Eds.), *The Origins and Ancient History of Wine*. Amsterdam: Gordon & Breach Publs., 1996: pp. 31-43
- Olmo HP (1937) Chromosome number and its relation to evolution of the genus *Vitis*. In: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Genetics, Bellagio, Italy
- Ostrander EA, Jong PM, Rine J, Duyk G (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(8):3419-23.
- Otte O, Barz W (2000) Characterization and oxidative *in vitro* cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry* 53:1-5
- Park JW, Choi YJ, Jang MA, Lee YS, Jun DY, Suh SI, Baek WK, Suh MH, Jin IN, Kwon TK (2001) Chemopreventive agent resveratrol from grapes reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett* 163(1):43-9
- Pascual-Ahuir A, Posas F, Serrano R, Proft M (2001) Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem.* 276(40):37373-8.

- Paterson AH, DeVerna JW, Lanini B, Tanksley SD (1990) Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124(3):735-42
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian Factors by using a complete linkage map of restriction fragment polymorphism. *Nature* 335: 721–726
- Paterson AH (2002) What has QTL mapping taught us about plant domestication? Tansley review no. 137. In: *New Phytologist* 154:591-608
- Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF (2001) Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet* 103 (8) 1201-1210
- Pelsy F, Merdinoglu D (2002) Development of grapevine molecular markers based on retrotransposons. Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference, January 12-16, 2002, Town & Country Convention Center, San Diego, CA
- Pelsy, F, Merdinoglu, D (2002) Complete sequence of *Tvv1*, a family of Ty1 copia-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. *Theor Appl Genet* 105 (4) 614-621
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Metraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-23
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Metraux JP, Broekaert WF (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2103-13
- Pfisterer P, Konig H, Hess J, Lipowsky G, Haendler B, Schleuning WD, Wirth T (1996) CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells under the control of Oct2. *Mol Cell Biol* (11):6160-8
- Pieterse CMJ, Ton J, Van Loon LC (2001) Crosstalk between plant defense signalling – boost or burden? *AgBiotechNet* Vol.3. June, ABN 068
- Pratt C, Goffinet MC, Welser MJ (1984) Powdery mildew of *Vitis*: Papillae (wall appositions) as a host response to infection. *Vitis* (23) 225-229
- Puig M, Caceres M, Ruiz A (2004) Silencing of a gene adjacent to the breakpoint of a widespread *Drosophila* inversion by a transposon-induced antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(24):9013-8
- Raines CA, Lloyd JC, Longstaff M, Bradley D, Dyer T (1988) Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene. *Nucleic Acids Res* 16(16):7931-42
- Raitt DC, Johnson AL, Erkinen AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH (2000) The *Skn7* response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with *Hsf1* *in vivo* and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11(7):2335-47
- Repka V, Fischerova I (2001) New findings to the role of tunikamycin in grapevine: Disease defense response. *Vitis* 40 (4) 169-174
- Reuber TL, Plotnikova JM, Dewdney J, Rogers EE, Wood W, Ausubel FM (1998) Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J* 16: 473-85
- Reustle G. Gentechnische Züchtung als Strategie zur Erzeugung neuer virusresistenter Reben. In: *Deutsches Weinbau-Jahrbuch 2004*, Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer: S. 144-149
- Reynolds AE, Chesnick JM, Woolford J, Cattolico RA (1994) Chloroplast encoded thioredoxin genes in the red algae *Porphyra yezoensis* and *Griffithsia pacifica*: evolutionary implications. *Plant Mol Biol* 25(1):13-21
- Riaz S, Meredith CA (1999) Developing Linkage Map of *Vitis vinifera*. Plant & Animal Genome VII Conference (1999), San Diego, CA
- Riaz S, Garrison K, Dangl G, Meredith C (2001) Microsatellite Markers for the differentiation of clones of ancient grape cultivars. Poster presentation at the International Plant and Animal Genome IX Conference (2001) San Diego, CA
- Riaz S, Dangl GS, Edwards KJ, Meredith CP (2004) A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet*. 108(5):864-72
- Richter TE, and Ronald PC (2000) The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol* 42, 195–204
- Romeis T (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol* 4(5):407-14

- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JD (1999) Rapid *Avr9*-and *Cf-9*-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell* 11: 273-88
- Romero-Perez AI, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, de La Torre-Boronat MC (2001): Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J Agric Food Chem.* 49(1):210-5.
- Rossel JB, Wilson IW, Pogson BJ (2002) Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130(3):1109-20
- Rottmann M, Dieter S, Brunner H, Rupp S (2003): A screen in *Saccharomyces cerevisiae* identified CaMCM1, an essential gene in *Candida albicans* crucial for morphogenesis. *Mol Microbiol* 47(4):943-59.
- Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot JP (2004) Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol.* 134(3):1027-38
- Roux C, Bilanz J, Theunissen BH, Perrot-Rechenmann C (1998) Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. *Plant Mol Biol* 37: 358-9
- Rückrich K (2000) Rebenzüchtung aus der Sicht des Weinbaus. *Mitteilungen des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof* 28/2: 44-51
- Rundlof AK, Janard M, Miranda-Vizuete A, Arner ES (2004) Evidence for intriguingly complex transcription of human thioredoxin reductase 1. *Free Radic Biol Med* 36(5):641-56
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 266: 11632-11639
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J* 15:5690-5700
- Rustérucci C, Aviv DH, Holt BF, Dangl JL, Parker JE (2001) The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2211-2224
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt, MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-19
- Ryan CA (2000) The systemin signalling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 112-121
- Sahrawy M, Hecht V, Lopez-Jaramillo J, Chueca A, Chartier Y, Meyer Y (1996) Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J Mol Evol* 42(4):422-31
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117(2):465-72
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T: *Molecular cloning* (a laboratory manual, 2nd edition). Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- Sanchez AC, Brar DS, Huang N, Li Z, Khush GS (2000) Sequence tagged site marker assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. *Crop Sci* 40: 792-797
- Sanger F, Milkin S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sankar AA, Moore GA (2001) Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor Appl Genet* 102:206-214
- Savocchia S, Stummer B, Wicks T, Van Heeswijck R, Scott E (2000) Resistance of grapevine powdery mildew to DMI fungicides in Australian vineyards. *Australian Grapegrower and Winemaker Australia* (440) 41-44
- Schaller A and Oecking C (1999) Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11: 263-272
- Scheideler M, Schlaich NL, Fellenberg K, Beissbarth T, Hauser NC, Vingron M, Slusarenko AJ, Hoheisel JD (2002) Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J Biol Chem.* 277(12):10555-61

- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci USA 97(21):11655-60
- Schindler U, Beckmann H, Cashmore AR (1992) TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. Plant Cell 4(10): 1309-19
- Schoffl F, Prandl R, Reindl A (1998) Regulation of the heat-shock response. Plant Physiol 117(4):1135-41
- Schopfer P, Plachy C, Frahry G (2001) Release of reactive Oxygen intermediates (Superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin and abscisic acid. Plant Physiol 125:1591-1602
- Schouten A, Wagemakers L, Stefanato FL, van der Kaaij RM, van Kan JA (2003) Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. Curr Opin Plant Biol. 6(4):320-6
- Schulze-Lefert P, Dangl JL, Becker-Andre M, Hahlbrock K, Schulz W (1989) Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. EMBO J 8: 651-656
- Schulze-Lefert P and Vogel J (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. Trends in Plant Science 15(8): 343-348
- Sefc KM, Regner F, Turetschek E, Glössl J, and Steinkellner H (1999) Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. Genome/Génome 42(3): 367-373
- Shahmuridov KA, Kolchanov NA, Solovyev VV, Ratner VA (1986) Enhancer-like structures in middle repetitive sequences of the eukaryotic genomes. Genetics 22: 357-368
- Shetty BV (1959) Cytotaxonomic studies in the *Vitaceae*. Bibl Genet XVIII:167-272
- Shi J, Bhattacharyya MK (1996) A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. Plant Mol Biol 32(4):653-62
- Shiraishi T, Yamada T, Saitoh K, Kato A, Toyoda K, Yoshioka H, Kim HM, Ichinose Y, Tahara M, Oku H (1994) Suppressors: determinants of specificity produced by plant pathogens. Plant Cell Physiol 35:1107-19
- Siebert, P.D.; Chen, S. and Kellogg, D.E. (1995) The Human GenomeWalker DNA Walking Kit: A new method for walking in uncloned genomic DNA. Clontechniques X(II): 1-3
- Solovyev VV, Kolchanov NA (1994) Search for functional sites using consensus In Computer analysis of Genetic macromolecules. (eds. Kolchanov NA, Lim HA), World Scientific, p.16-21
- Solovyev VV (2002) Structure, Properties and Computer Identification of Eukaryotic genes. In: Bioinformatics from Genomes to Drugs. V.1. Basic Technologies. (ed. Lengauer T.), pp. 59-111
- Song WY, Pi LY, Wang GL, Gardner J, Holsten T, and Ronald PC (1997) Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family. Plant Cell 9, 1279–1287
- Song JT, Lu H, Greenberg JT (2004) divergent roles in *Arabidopsis* development and defense of two homologous genes, AGD2 and ALD1, encoding novel aminotransferases. Plant Cell, in Press.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J of NIH Research 8: 55-64
- Swarup K, Alonso-Blanco C, Lynn JR, Michaels SD, Amasino RM, Koorneef M, Millar A (1999) Natural allelic variation identifies new genes in the *Arabidopsis* circadian system. Plant Journal 20: 67-77
- Taler D, Galperin M, Benjamin I, Cohen Y, Kenigsbuch D (2004) Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. Plant Cell 16(1):172-84
- Tattersall DB, van Heeswijck R, Hoj PB (1997) Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. Plant Physiol 114(3):759-69
- Tenhaken R, Rübel C (1998) Cloning of putative subunits of the soybean plasma membrane NADPH oxidase involved in the oxidative burst by antibody expression screening. Protoplasma 205:21-28
- Thomas MR, Matsumoto S, Cain P and Scott NS (1993) Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. Theor Appl Genet 86: 173-180
- Thomas MR and Scott N (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor Appl Genet 86: 985-990

- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP (2001) The complexity of disease signalling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* 13:63-68
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* 216(2):193-202
- Thomson TM, Lozano JJ, Loukili N, Carrió R, Serras F, et al. (2000) Fusion of the human gene for the polyubiquitination coeffector UEV1 with *Kua*, a newly identified gene. *Genome Res* 10: 1743-1756
- Thorup TA, Tanyolac B, Livingstone KD, Popovsky S, Paran I, Jahn M (2000) Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11192-11197
- Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cook RJ, Donini P, Lee D, Law JR, Lowe C, Moule C, Trick M and Edwards KJ (2003) The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus L.*) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 1091 - 1101
- Tucker ML, Whitelaw CA, Lyssenko NN, Nath P (2002) Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors. *Plant Physiol.* 130(3):1487-96
- Tusnády GE and Simon I (1998) Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction. *J. Mol. Biol.* 283, 489-506
- Tusnády GE and Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850
- Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J (2002) Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 4(3):405-14
- Vandepoele K, Simillion C and Van de Peer Y (2002) Detecting the undetectable: uncovering duplicated segments in *Arabidopsis* by comparison with rice. *Trends in Genetics*, 18(12):606-608
- Van Ooijen JW and Jansen RC eds. (1994) *Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers*. Proc 9<sup>th</sup> Meeting Eucarpia Section Biometrics. CPRO-DLO, Wageningen
- Van Ooijen JW and Voorrips RE (2001) JoinMap<sup>®</sup>3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands
- Van Ooijen JW, Boer MP, Jansen RC, Maliepaard C (2000) MapQTL<sup>®</sup> Version 4.0. Userfriendly power in QTL mapping. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands
- Veenstra-Vander Weele J, Hanna GL, Leventhal, BL, Cook EH (1997) Coupling of optimized multiplex PCR and automated capillary electrophoresis for efficient genome wide searches. Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Baltimore, MD. *Am J Hum Genet* 61:A299, 1997. 27
- Verries C, Bes C, This P, Tesniere C (2000) Cloning and characterization of Vine-1, a LTR-retrotransposon-like element in *Vitis vinifera L.*, and other *Vitis* species. *Genome* 43 (2), 366-376
- Vignani R, Bowers JE, Meredith CP (1996) Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* 'Sangiovese'. *Scientia Horticulturae* 65: 163-169
- Vignols F, Mouaheb N, Thomas D, Meyer Y (2002) Redox control of Hsp70/co-chaperone interaction revealed by expression of a Thioredoxin-like *Arabidopsis* protein. *J Biol Chem* [epub ahead of print]
- Viljoen TA, Spies JJ (1995) Cytogenetical studies of three *Vitis* species. *Vitis* 34 (4) 221-224
- Vogt E und Götz B: Weinbau. Stuttgart: Verlag Ulmer, 1987
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Rijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Wagner P, Furstner R, Barthlott W, Neinhuis C (2003) Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *J Exp Bot.* 54(385):1295-303
- Warren RF, Henk A, Mowery P, Holub EB and Innes RW (1998) A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell*, 10, 1439-1452
- Webb MA, Cavaletto JM, Klanrit P, Thompson GA (2001) Orthologs in *Arabidopsis thaliana* of the Hsp70 interacting protein Hip. *Cell Stress Chaperones*. 6(3):247-55
- Weeden NF, Hemmat M, Lawson DM, Lodhi M, Bell RL, Manganaris AG, Reisch BI, Brown SK and Ye GN (1994) Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops. *Euphytica* 77:71-75
- Weeden, NF. Approaches to Mapping in Horticultural Crops. In: *Plant Genome Analysis*, PM Gresshoff (ed.). Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press, 1994: pp 57-68

- Weiss E. Kupferabschlussspritzung und Böckserbildung im Wein. In: Deutsches Weinbau-Jahrbuch 43. Stuttgart: Verlag Ulmer, 1992: S. 169-172
- Wedel N, Clausmeyer S, Herrmann RG, Gardet-Salvi L, Schurmann P (1992) Nucleotide sequence of cDNAs encoding the entire precursor polypeptide for thioredoxin m from spinach chloroplasts. *Plant Mol Biol* 18(3):527-33
- Weber WE (2002) Gene als Träger des Zuchtfortschritts: Markierung durch Marker, Maskierung durch Umwelt. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 54: 23-28
- Whitbred, JM, Schuler MA (2000) Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiol* (124)47-58
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1989): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531-6535.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, and Tingey VT (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth Enzym* 218: 704-740
- Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N, Altman A (2000) Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J Biol Chem* 275(3):1902-9
- Wolf T, Ries R, Eimert K. Sortenreinheit und Sortenechtheit von Unterlagen–Kontrolle durch RAPD-PCR. In: Deutsches Weinbau-Jahrbuch 2000. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 2000
- Wong JC, Lambert RJ, Wurtzel ET, Rocheford TR (2004) QTL and candidate genes phytoene synthase and carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theor Appl Genet* 108:349-359
- Wu J, Trumbly RJ (1998) Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site. *Yeast*. 14(11):985-1000
- Wu KS, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241: 225-235
- Xu M, Korban SS (2002) AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the Vf locus in the apple genome. *Plant Mol Biol* 50(4-5):803-18
- Young ND (1996) QTL Mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol* 34:479-501
- Zabeau M and Vos P (1992) Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application EPO
- Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468
- Zyprian E, Eibach R, Töpfer R (2003) Comparative molecular mapping of fungal disease resistance factors in segregating populations of grapevine. In: Proceedings of the VIIIth International Conference on Grape Genetics and Breeding. *Acta Hort* 603:73-77



ANHANG**Anhang I****Sequenzen isolierter AFLP-Fragmente aus je zwei Individuen (schwarz/blau) im Abgleich.**

Abweichende Nukleotide sind rot/rosa hervorgehoben. Die Zuchtstämme bzw. Individuen der Kreuzungspopulation, aus denen die Fragmentsequenz ermittelt wurde, sind in eckigen Klammern angegeben.

R8.266 [91-011-0103] Überlappender Bereich: 221 Pos.  
R8.266 [91-011-0133] Abweichend: 2 nt (0,9%)

CGAT] CCTGCATGGGAGCATGTTTCTAAAGAAAGATATGCAAATGGAAGAAAAAC  
CCTGCATGGGAGCATGTTTCTAAAGAAAGATATGCAAATGGAAGAAAAAC

TC TGATTTGTTTGTATTGTAAAAA--TTACAAAAGGTGGGGGTATTTCATA  
TCTGATTTGTTTGTATTGTAAAAAGATTACAAAAGGTGGGGGTATTTCATA

GAATGAAACAACATCTTGCTGGAGTGAAAGGAGATATTGGTCCATGTAAA  
GAATGAAACAACATCTTGCTGGAGTGAAAGGAGATATTGGTCCATGTAAA

TCGATTTCTCTTGATGTCAGATTTTGAATGGAAAATTCCTTTACAAGAGTT  
TCGATTTCTCTTGATGTCAGATTTTGAATGGAAAATTCCTTTACAAGAGTT

TGTGAATTGGTACGCAGACAG  
TGTGAATTGGTACGCAGACAT

R17.186.[91-011-0016] Überlappender Bereich: 147 Pos.  
R17.186.[91-011-0303] Abweichend: 18 nt (12%)

GCATGCAAGCAA----CGAGCTTCTGGCAT  
GCTGGTAGCTGCCTATTGCAACGT] GCATGGTAGCAAGAAACGAGCTTCTGGC-T

GTTACCCGCTATGAAGGGGCATTAAAGTTTCCCTTGAGAACTCCAGTAGCA  
GTTACCCGC-ATGAAGT-GCATTT-CTTCCCTTGAGAACTCCAGTAGCA

GACTAAAATCCTATTGGCCATGGGCAAATGGGATGCATCTGGCTTTCCTG  
G-CTAAAATC-TATTGTCCATG-GCAAATG-GATGCATCTGGCTTTCCTG

TCTTCATGAATTGGTAC [TGAATGTCACCATGCTC  
TCTTCATGTATTGGTAC

R017.250.[91-011-0009] Überlappender Bereich: 215 Pos.  
R017.250.[91-011-0018] Abweichend: 3 nt (1,4 %)

G] TTTAGTACTGCCTCCTTGACAGTGGACCTTTTTTGGGTTGTCTGAAACTC  
GGTAGTACT-CCTCCTTGACAGTG-ACCTTTTTTGGGTTGTCTGAAACTC

AAACCGGAGTTGCATTATCCTTTCTCTTGATGATGCAGAGAAGATTTTCT  
AAACCGGAGTTGCATTATCCTTTCTCTTGATGATGCAGAGAAGATTTTCT

CTAAGGCGGACCATGCCGCATGAGAAGTTTGGTGGCCGATTATCTAGCTC  
CTAAGGCGGACCATGCCGCATGAGAAGTTTGGTGGCCGATTATCTAGCTC

ATTATTTCTGGTGTGAGTGAGGAATAGAGCCAACCTGAGTATCATCCTATC  
ATTATTTCTGGTGTGAGTGAGGAATAGAGCCAACCTGAGTATCATCCTATC

ATACCTTCTCCAGTG  
ATACCTTCTCCAGTG [ATTAAATTGGTACAACAGTCA

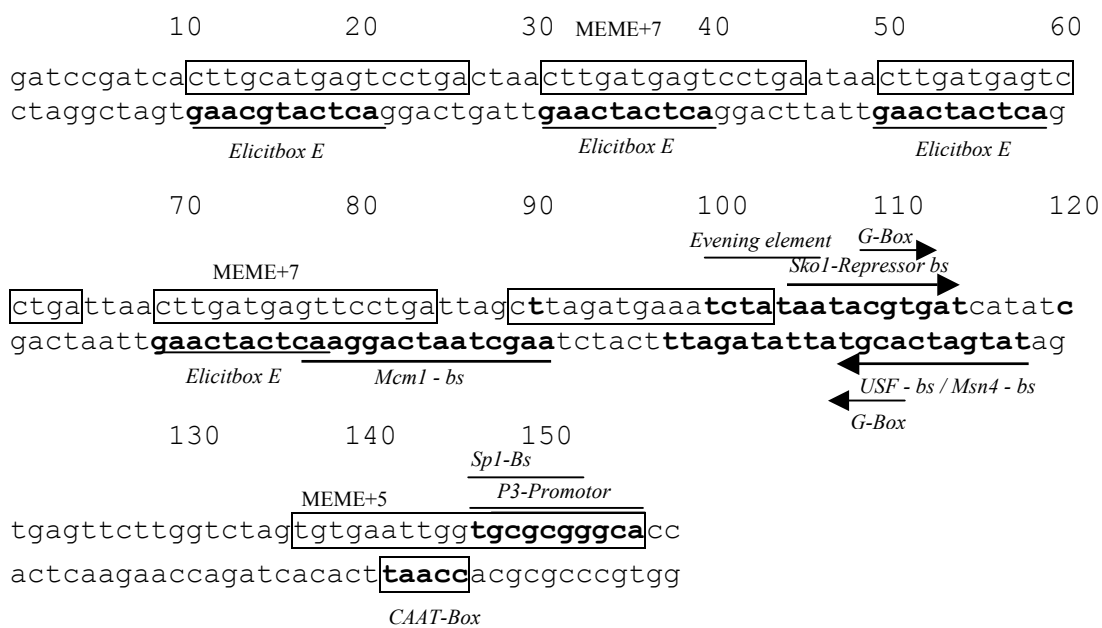
## Anhang II

### Sequenzen der isolierten AFLP-Fragmente, ergänzt durch die Ergebnisse der Motivrecherche und Homologieanalyse mittels der Analyseprogramme MEME, NSITE und BLAST.

Gefundene Motive sind durch Balken und Pfeile (zusätzliche Angabe der Orientierung des Motivs) hervorgehoben.

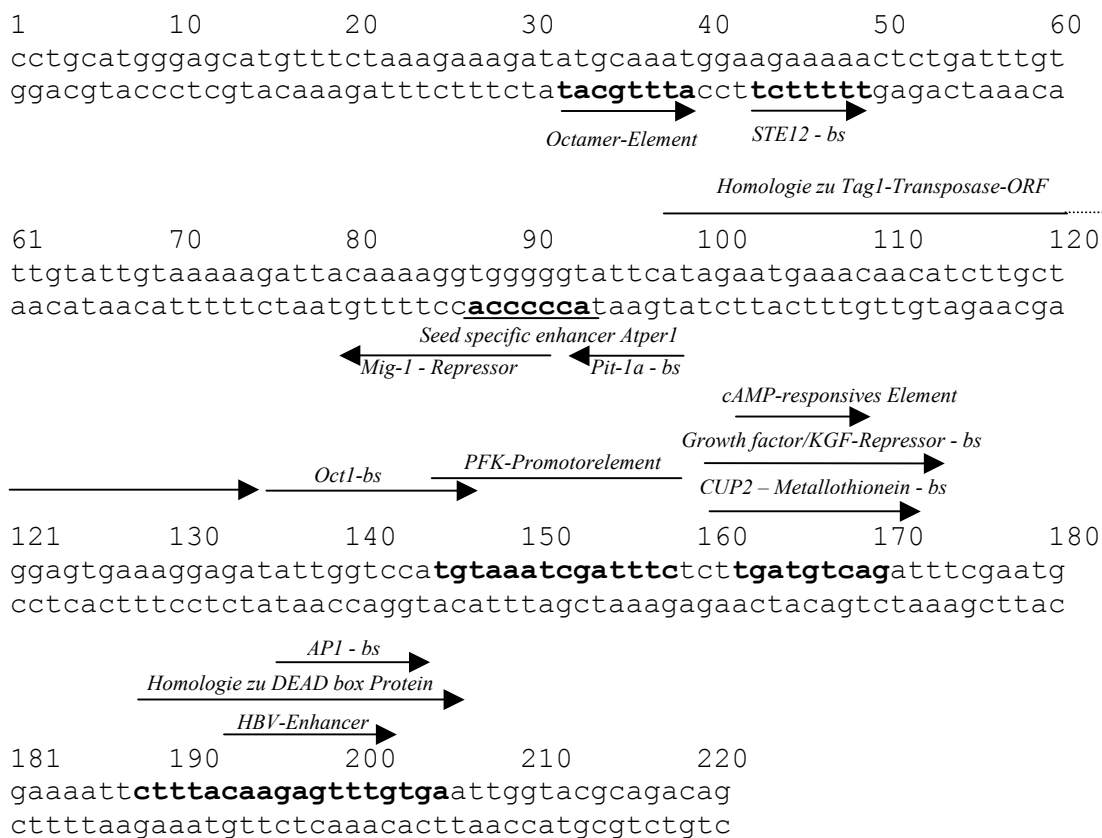
#### AFLP-Fragment R2.177

Kopplungsgruppe: R1 (IGGP16)  
 QTL-Korrelationen: Major QTL für Beerenreife; QTL für *Botrytis cinerea*-Toleranz



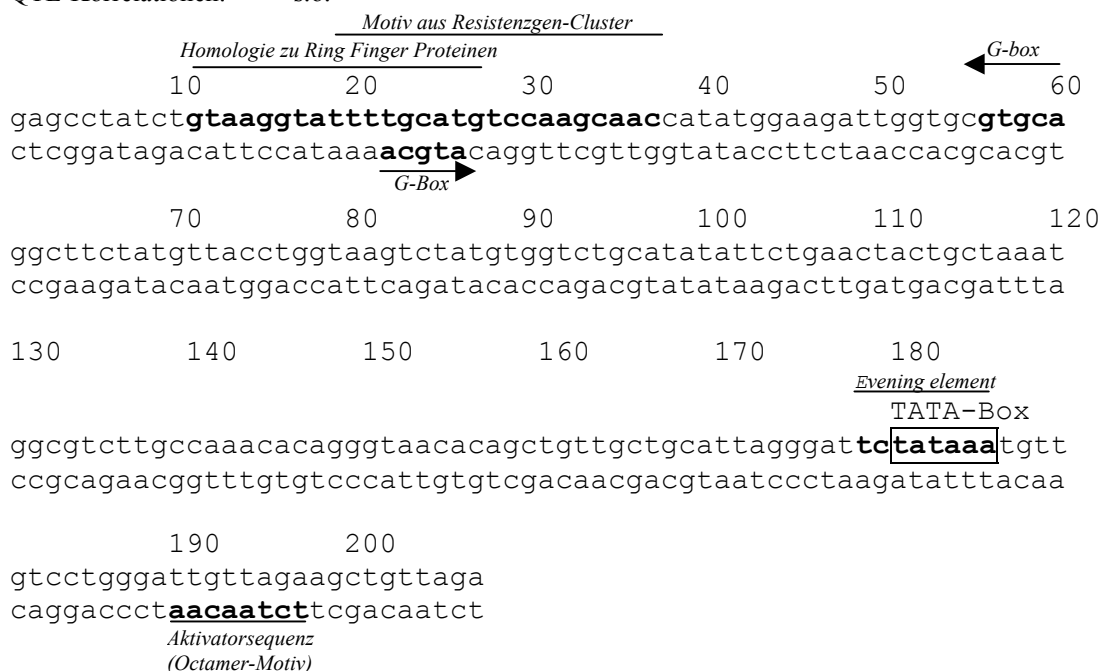
**AFLP-Fragment R8.266**

Kopplungsgruppe: R16 (IGGP15)  
 QTL-Korrelation: Major-QTL für *Uncinula necator*-Resistenz an Blatt und Beere, QTL für *Botrytis cinerea*-Toleranz und für Beerenzahl pro Traube



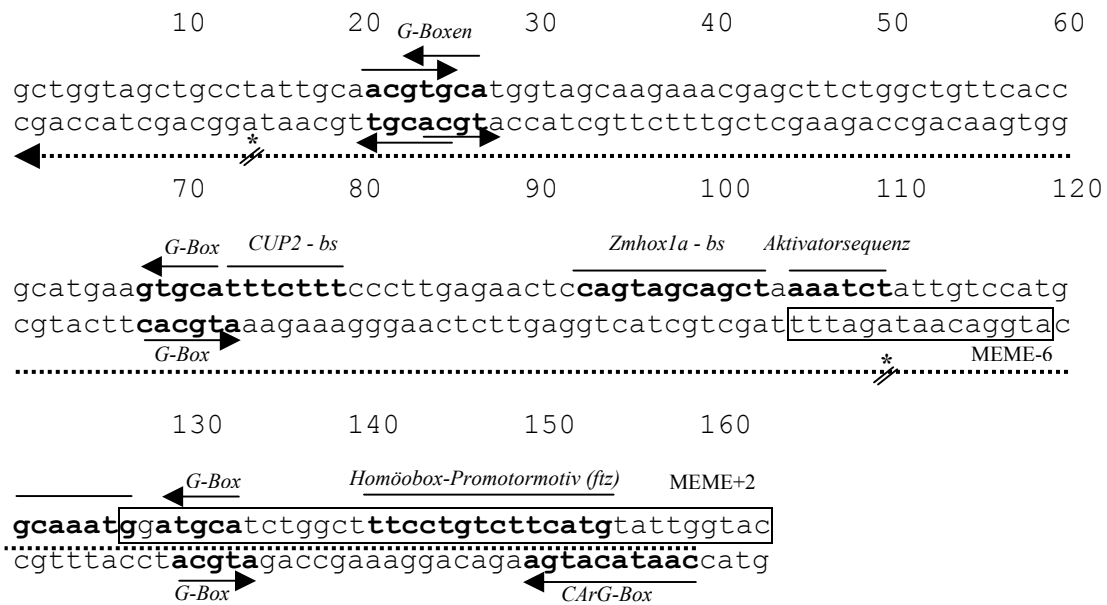
**AFLP-Fragment R18.233**

Kopplungsgruppe: R16 (IGGP15)  
 QTL-Korrelationen: s.o.



**AFLP-Fragment R17.186**

Kopplungsgruppe: R6 (IGGP 7)  
 QTL-Korrelation: Major-QTL für Beginn der Beerenreife, QTL für *Botrytis cinerea*-Toleranz, Beerengröße, Axillartriebbildung



**Erläuterungen:**

\* bezeichnet Stop-Codons, die den Bereich mit Homologie zu Proteinasen (.....) unterbrechen.



---

## Anhang III

### Sequenzen der gen- bzw. fragmentspezifischen Primer für das PCR-Walking ausgehend von AFLP-Fragment RL17.367:

#### Äußere fragmentspezifische Primer:

**GSP1:** in Leserichtung der Trx-Sequenz (zur 3'-Border)

5' TGGTTTTACACACGTTTGACTCTATTGAATTATACTTTTTTCACGGG 3'

**GSP3:** in Gegenrichtung der Trx-Sequenz (zur 5'-Border)

5' AGTACAGTGAAAACCAAGATAACCATTTGACTATGGTGCC 3'

#### Innere fragmentspezifische Primer („nested“):

**GSP2:** in Leserichtung der Trx-Sequenz (zur 3'-Border)

5' TCTACAGAATTTTCTTCTGCATTTATAACAATGCATGGTTGGGC 3'

**GSP4:** in Gegenrichtung der Trx-Sequenz (zur 5'-Border)

5' ACCATTTGACTATGGTGCCACTGTACATACCTGAGGCC 3'

#### Anmerkung:

Die Sequenzen der inneren und äußeren Adaptorprimer wurden unverändert aus dem GenomeWalker™ Kits User Manual PT1116-1 (Clontech, Palo Alto, USA, 1999) übernommen.

*Den rechten Handschuh könnte man an die linke Hand ziehen,  
wenn man ihn im vierdimensionalen Raum umdrehen könnte...*

*(Ludwig Wittgenstein)*

## **Danksagung**

Ich möchte meinen Gutachtern, allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof, meiner Familie und meinen Freunden herzlich danken.

Das Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

## **Hinweis**

Teile der Dissertation sind als Fachpublikation erschienen:

Fischer BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Topfer R and Zyprian EM (2004)  
Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine.  
Theor Appl Genet 108:501-515



## LEBENS LAUF

Name: Birgitta Margaretha Fischer

Geburtsdatum: 16. 12. 1970

Geburtsort: Ottweiler

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung und beruflicher Werdegang

1977 – 1981: Grundschule Nikolaus Obertreis, St. Wendel

1981 – 1990: Staatl. Gymnasium Wendalinum, St. Wendel

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Mai – Okt. 1990 Auslandsaufenthalt in Bournemouth, Großbritannien

Okt. 1990

Immatrikulation an der Universität des Saarlandes

1. Studiengang Diplom, Studienfach Biologie

Hauptfach: Genetik. Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie

Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie

Thema: „*Struktur- und Faltungsstudien an Adrenodoxinmutanten unter Verwendung von Tryptophan als Fluoreszenzreportersystem*“

1997

Abschluss als Diplombiologin

2. Studiengang Magister, Studienfach Englische Philologie

Nebenfächer: Informationswissenschaft, Amerikanistik

1996

Zwischenprüfung

Apr. 1998

Vereidigung als Übersetzerin

Mai 1998 – Juli 2002

wissenschaftliche Tätigkeit mit dem Ziel der Promotion an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen.

Thema der Dissertation:

„*Genetische Kartierung und QTL-Analyse agronomischer Eigenschaften der Weinrebe unter besonderer Berücksichtigung der Pilzresistenz.*“

2000

Zulassung als Doktorandin im Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,

Institut für Molekulargenetik, Gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung).

Seit März 2002

Lehrtätigkeit (Molekularbiologie, Fachenglisch) am Naturwissenschaftlichen Technikum Dr. Künkele (NTK) in Landau als Mitglied der Genossenschaft zur Förderung naturwissenschaftlich-technischer Bildung e.G.; Tätigkeit als freie Übersetzerin