
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

**Entwicklung und Evaluierung von Methoden zur
zeitnahen Identifizierung weinrelevanter
Mikroorganismen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Anna Petri

geboren am 12.02.1981 in Zweibrücken

Mainz, Januar 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2009 bis November 2013 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Helmut König durchgeführt.

Ich erkläre, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken, gegebenenfalls auch elektronischen Medien, entnommen sind, sind von mir durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Anna Petri

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2014

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden teilweise in folgenden Posterpräsentationen und Publikationen veröffentlicht:

Posterpräsentationen

Wirth K, Petri A, Sebastian P, Blättel V, Pfannebecker J, Fröhlich J und König H (2011) **Differentiation of microorganisms associated with wine by DNA-fingerprinting analysis**. VAAM Jahrestagung, Karlsruhe.

Sebastian P, Petri A und König H (2010) **Isolation and identification of biogenic amines producing lactic acid bacteria from German wines**. VAAM Jahrestagung, Hannover.

Publikationen

Blättel V, Petri A, Rabenstein A, Kuever J, König H (2013) **Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using biomolecular fingerprinting methods**. Appl Microbiol Biotechnol 97: 4597-4606.

König H, Kaschak E, Sebastian P, Petri A, Blättel V, Wirth K, Claus H, Pfeiffer P (2013) **Biogene Amine: analytische, mikrobiologische und gesundheitliche Aspekte**. In: Kulturgut Rebe und Wein. König H, Decker H (Hrsg.). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 207-220.

Petri A, Christ E, Blättel V, Rabenstein A, Kuever J, König H (2013) **Differenzierung von Weinhefen der Gattung *Saccharomyces*: Relevanz für die Verwendung von Starterkulturen**. In: Schultz HR und Stoll M (Hrsg.). Deutsches Weinbaujahrbuch 2014. Ulmer Verlag, Stuttgart, 163-172.

Petri A, Pfannebecker J, Fröhlich J, König H (2013) **Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR**. Food Microbiol 33: 48-54.

Petri A, Rabenstein A, Kuever J, König H **Application of MALDI-TOF-MS and nested SAPD-PCR for discrimination of *Oenococcus oeni* isolates at the strain level**. Manuskript in Vorbereitung.

ALLGEMEINE ANMERKUNGEN

Die Abbildungen 1.1 und 1.2 wurden wissenschaftlichen Publikationen entnommen. Aus rechtlichen Gründen wurden diese Abbildungen in ihrer Originalsprache dargestellt. Die entsprechenden Lizenznummern können Kapitel 9 Druckgenehmigungen entnommen werden.

Die genetische Nomenklatur von Prokaryoten und Eukaryoten ist nicht einheitlich geregelt. Für die Gattung *Saccharomyces* wurde im Rahmen dieser Arbeit die von der *Saccharomyces* Genome Database empfohlene genetische Nomenklatur verwendet. Eukaryotische Gene wurden dementsprechend mit Großbuchstaben und kursiv dargestellt. Im Gegensatz hierzu wurden bakterielle Gene, wie von Demerec et al. (1968) vorgeschlagen, mit Kleinbuchstaben und kursiv gekennzeichnet.

ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACPY	2-Acetyl-1-pyrrolin
ACTPY	2-Acetyltetrahydropyridin
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
APS	Ammoniumpersulfat
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>CAT8</i>	Gen des Zink-Cluster Transkriptionsaktivators
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
cm	Zentimeter
<i>COX2</i>	Gen der Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase
<i>CYR1</i>	Gen der Adenylat-Cyclase
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	desoxy Nukleotid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
ETPY	2-Ethyltetrahydropyridin
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
<i>GSY1</i>	Gen der Glycogen-Synthase
h	Stunde
H ₂ O _{deion.}	deionisiertes Wasser
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz
ISA	Instituto Superior de Agronomia, Lissabon
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kap.	Kapitel
KBE	koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lachancea</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
M	Molar

MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry
<i>MET6</i>	Gen der Cobalamin-unabhängigen Methionin-Synthase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPA	Amtliche Materialprüfungsanstalt, Bremen
MRI	Max Rubner Institut, Karlsruhe
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NCYC	National Collection of Yeast Cultures, Norwich
nm	Nanometer
nSAPD	nested Specifically Amplified Polymorphic DNA
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>OPY1</i>	Overproduction-induced Pheromone-resistant Yeast (Gen unbekannter Funktion)
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
<i>rpoB</i>	Gen der β -Untereinheit der RNA Polymerase
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SAPD	Specifically Amplified Polymorphic DNA

SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
T	Typstamm
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
var.	Varietät
v. Chr.	vor Christus
vergl.	vergleiche
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
<i>W.</i>	<i>Weissella</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Hefen in der Weinbereitung	1
1.2	Die Gattung <i>Saccharomyces</i>	3
1.2.1	Die Bedeutung von Hefen der Gattung <i>Saccharomyces</i>	5
1.2.2	Methoden zur Identifizierung der Saccharomyceten	6
1.3	Bakterien in der Weinbereitung	9
1.3.1	Die Rolle der Milchsäurebakterien während der Vinifikation	11
1.3.2	Identifizierung und Differenzierung von Milchsäurebakterien	14
1.4	Ziele dieser Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Verwendete Materialien und Mikroorganismen	20
2.1.1	Chemikalien und Nährmedienbestandteile	20
2.1.2	Biochemikalien, Kits und Enzyme	20
2.1.3	Geräte und Hilfsmittel	21
2.1.4	Wasser für molekularbiologische Arbeiten	22
2.1.5	Weinproben	22
2.1.6	Oligonukleotide	23
2.1.7	Nährmedien	25
2.1.8	Mikroorganismen	26
2.2	Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1	Kultivierung und Stammhaltung der Mikroorganismen	29
2.2.2	Bestimmung von koloniebildenden Einheiten	30
2.2.3	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	30
2.2.4	Isolierung von Milchsäurebakterien aus Weinproben	30
2.2.5	Vereinzelung von Hefezellen mittels Mikromanipulation	31
2.3	Molekularbiologische Methoden	33

2.3.1	DNA-Isolierung	33
2.3.2	Entwicklung artspezifischer Primer mit Hilfe der SCAR-PCR-Methode	33
2.3.3	PCR-Methoden	35
2.3.3.1	Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA	35
2.3.3.2	Amplifikation der ITS-Region von Hefen	36
2.3.3.3	Nested Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR	36
2.3.3.4	Colony-PCR transformierter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	38
2.3.3.5	Sequence Characterized Amplified Region-PCR zur Überprüfung der Primerspezifität	38
2.3.3.6	Multiplex-PCR	39
2.3.3.7	PCR zur Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese	41
2.3.3.8	Reamplifikation von DNA-Fragmenten aus der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese	41
2.3.3.9	Amplifikation verschiedener genetischer Marker von <i>Saccharomyces</i> -Arten	41
2.3.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	42
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.3.6	Aufreinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion	43
2.3.7	Klonierung	44
2.3.8	Sequenzierung	45
2.3.9	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese	45
2.4	Bioinformatische Methoden	47
2.4.1	Cluster-Analyse	47
2.4.2	Datenbanken, Webadressen und Programme	47
2.5	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry	48
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Gattung <i>Saccharomyces</i>	50
3.1.1	Anwendung der SAPD-PCR mit anschließender Cluster-Analyse	50

3.1.2	Differenzierung verschiedener <i>Saccharomyces</i> -Arten mittels MALDI-TOF-MS	55
3.1.3	Identifizierung von <i>Saccharomyces</i> -Arten und interspezifischer Hybride anhand Sequenzierung und RFLP-Analyse verschiedener genetischer Marker	57
3.2	Identifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien	63
3.2.1	Entwicklung einer Multiplex-PCR basierten Methode zur Schnellidentifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien	63
3.2.1.1	Screening nach artspezifischen Markern	65
3.2.1.2	Entwicklung artspezifischer SCAR-Primer	65
3.2.1.3	Anwendung artspezifischer SCAR-Primer in einer Multiplex-PCR	66
3.2.1.4	Ermittlung der Nachweisgrenze des Multiplex-PCR-Systems	68
3.2.1.5	Praktische Anwendung der Schnellidentifizierungsmethode	70
3.2.2	Nachweis und Differenzierung weinrelevanter Milchsäurebakterien unter Verwendung der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese	74
3.2.3	Stamm-Differenzierung von <i>Oenococcus oeni</i> mittels nSAPD-PCR und MALDI-TOF-MS	76
4	DISKUSSION	82
4.1	Differenzierung von Hefen der Gattung <i>Saccharomyces</i>	82
4.1.1	Vergleich von Methoden zur Aufklärung der taxonomischen Stellung verschiedener <i>Saccharomyces</i> -Arten	84
4.1.2	Eignung der angewandten Methoden zur Detektion und Charakterisierung interspezifischer Hybride	88
4.2	Entwicklung und Anwendung von Techniken zur Kontrolle der Population von Milchsäurebakterien im Verlauf der Vinifikation	92
4.2.1	Entwicklung einer Schnellidentifizierungsmethode zum direkten Nachweis wichtiger Milchsäurebakterien-Arten während der Weinbereitung	93
4.2.2	Kontrolle der bakteriellen Population während der Weinbereitung mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese	97
4.2.3	Vergleich von Methoden zur Differenzierung von <i>Oenococcus oeni</i> auf Stamm-Ebene	99
5	AUSBLICK	102

6	ZUSAMMENFASSUNG	104
7	LITERATURVERZEICHNIS	106
8	ANHANG	121
8.1	Nukleotid-Sequenzen	121
8.1.1	Sequenzen der ITS-Region (ITS1-5,8S rDNA-ITS2) von Arten der Gattung <i>Saccharomyces</i>	121
8.1.2	Sequenzen der <i>COX2</i> -Region von Arten der Gattung <i>Saccharomyces</i>	124
8.1.3	Sequenzen der SCAR-Marker verschiedener Milchsäurebakterien	128
8.1.4	16S rDNA-Sequenzen der Isolate aus verschiedenen Jungweinen	130
8.1.5	Sequenzen des <i>rpoB</i> -Gens verschiedener Milchsäurebakterien-Arten	132
8.1.6	Nukleotid-Sequenzen reamplifizierter Banden der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese	139
8.2	SAPD-PCR-Bandenmuster	140
8.3	Datenmatrizen zur Cluster-Analyse	144
8.4	Restriktionsverdau verschiedener Genregionen von Arten der Gattung <i>Saccharomyces</i>	146
9	DRUCKGENEHMIGUNGEN	151
10	DANKSAGUNGEN	152
11	LEBENS LAUF	154

1 EINLEITUNG

Wein gehört zu den ältesten Kulturgütern der Menschheitsgeschichte und archäologische Funde deuten darauf hin, dass in China bereits 7000 v. Chr. fermentierte Getränke hergestellt wurden (McGovern et al., 2004). Der Beginn des aktiven Weinbaus wird von Historikern auf etwa 6000 v. Chr. datiert. Aus dieser Zeit gibt es im früheren Mesopotamien erste Belege dafür, dass Trauben speziell für die Weinbereitung gepresst wurden (McGovern et al., 1997). Die Erforschung der biochemischen und mikrobiologischen Grundlagen der Weinherstellung begann jedoch erst viele Jahrtausende später. Der chemische Ablauf der alkoholischen Gärung konnte im Zeitraum zwischen dem Ende des 18. und Anfang des 19. Jahrhunderts insbesondere durch Arbeiten von Antoine Laurent de Lavoisier (1789) und Joseph Louis Gay-Lusac (1815) aufgeklärt werden (Barnett, 1998). Erst einige Jahre später konnten Charles Cagniard-Latour (1838), Friedrich Traugott Kützing (1837) und Theodor Schwann (1837) unabhängig voneinander nachweisen, dass Hefen für diesen Prozess verantwortlich sind. Vor allem die Untersuchungen von Louis Pasteur lieferten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung der Mikroorganismen während der Fermentation (König et al., 2013a). Ausgehend von diesen und weiteren Arbeiten in der Vergangenheit stellt sich die Weinbereitung heutzutage als ein Prozess dar, an welchem eine komplexe mikrobielle Flora aus Hefen und Bakterien beteiligt ist.

1.1 Hefen in der Weinbereitung

Der Traubenmost als Ausgangssubstrat der Weinherstellung stellt aufgrund der hohen Zuckerkonzentration, des niedrigen pH-Werts und des Gehalts phenolischer Verbindungen ein anspruchsvolles Habitat für Mikroorganismen dar. Weiterhin ändert sich die Zusammensetzung des Mosts im Verlauf der Fermentation. Neben der schnell eintretenden Verminderung des Sauerstoffgehalts nimmt im Zuge der alkoholischen Gärung der Zuckergehalt ab, während Ethanol gebildet wird. Viele Hefen weisen eine Toleranz gegenüber diesen Umweltbedingungen auf und haben daher einen Wachstumsvorteil, wodurch sie die dominierende Gruppe an Mikroorganismen während der Weinbereitung bilden (Bisson & Joseph, 2009). Bisher konnten etwa 100 verschiedene Hefearten, die über 20 unterschiedlichen Hefegattungen zuzuordnen sind, auf Trauben, im Most und im Wein identifiziert werden (König et al., 2013a; Renouf et al., 2007). Die Zusammensetzung der Hefeflora variiert zum einen deutlich in den verschiedenen Phasen der Weinherstellung, zum anderen haben aber auch weitere Faktoren einen großen Einfluss auf die Diversität der Hefen. So sind das Klima und der

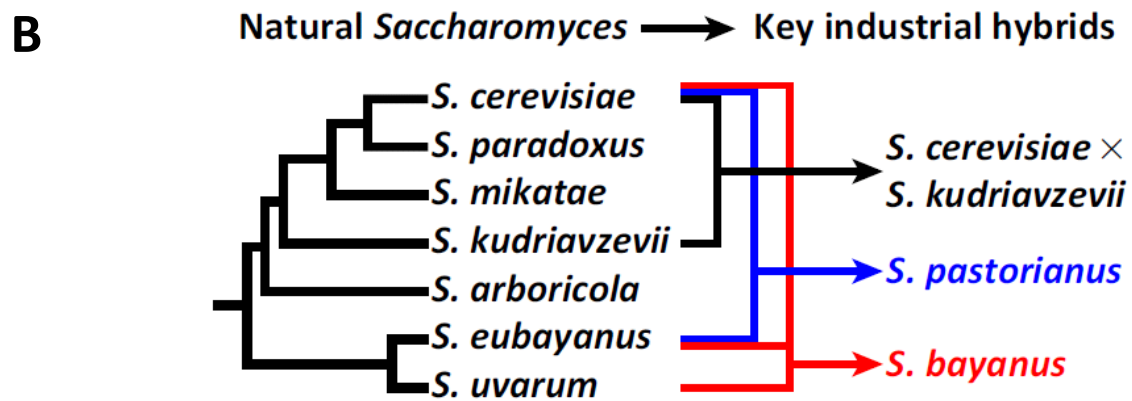
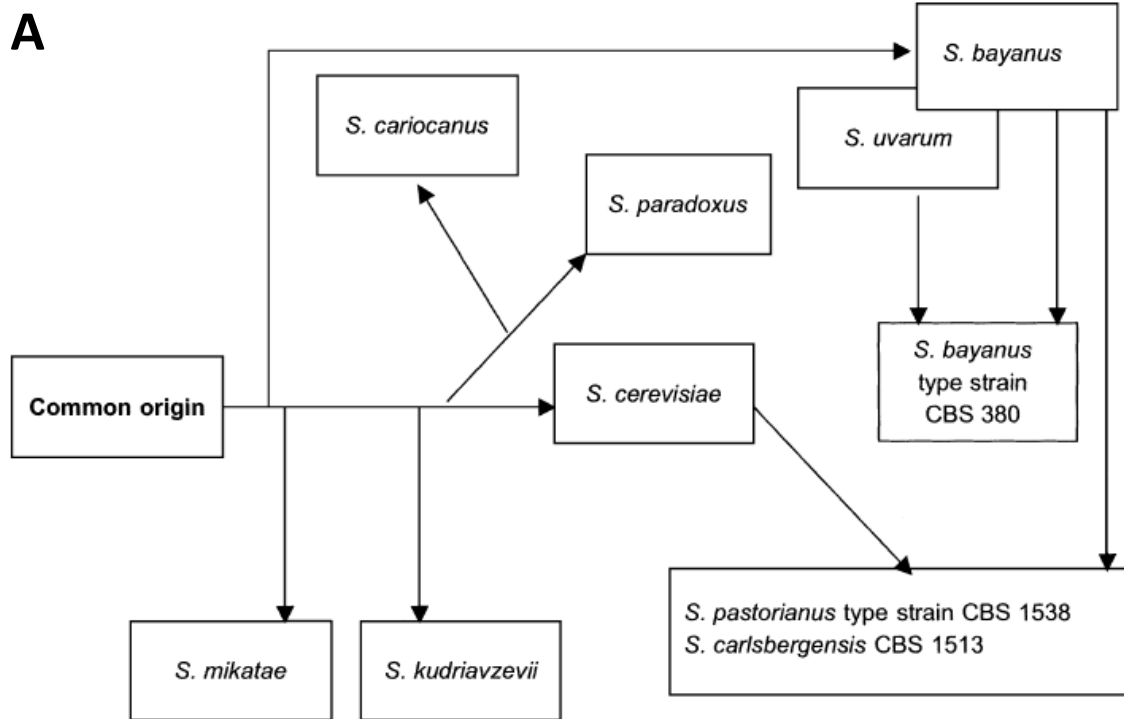
Zustand der Trauben im Weinberg, die Hygiene und Beschaffenheit der Geräte und Fässer im Weinkeller, sowie die Verwendung kommerzieller Starterkulturen während der Fermentation diesbezüglich wichtige Einflussgrößen (Bisson & Joseph, 2009).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich weltweit mit der Vielfalt der im Weinberg auf den Weintrauben vorkommenden Hefen. Auf unreifen Trauben kommt nur eine geringe Zahl an Hefen vor ($10 - 10^3$ KBE/g). Die Population steigt jedoch während des Reifungsprozesses auf $10^4 - 10^6$ KBE/g an (Fleet, 2003). Die dominierenden Hefen auf der Oberfläche von Trauben lassen sich den Arten *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum* und *Metschnikowia pulcherrima* zuordnen (Bisson & Joseph, 2009). Ferner wird das Vorkommen vieler weiterer Arten, die unter anderem den Gattungen *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulasporea* und *Zygosaccharomyces* angehören, beschrieben. Dabei scheint die Zusammensetzung der Hefeflora neben weiteren Einflüssen vom Reifegrad und Gesundheitszustand der Trauben abhängig zu sein (Barata et al., 2012a; Prakitchaiwattana et al., 2004). Arten der Gattung *Saccharomyces*, die während der alkoholischen Gärung von Bedeutung sind, kommen auf Trauben nur in geringer Zellzahl vor ($< 10 - 100$ KBE/g) und konnten in einigen Studien gar nicht nachgewiesen werden (Fleet, 2003).

Nach der Lese kann es bei der Verarbeitung der Trauben zu einer Kontamination mit weiteren Mikroorganismen kommen. Hefen, die auf Geräten, in Leitungen und Fässern im Weinkeller vorkommen, werden als Kellerflora bezeichnet und stellen eine wichtige Infektionsquelle für den Most dar (Bisson & Joseph, 2009). Hier spielen vor allem *Saccharomyces*-, aber auch *Candida*-, *Cryptococcus*- und *Brettanomyces*-Arten eine entscheidende Rolle (Renouf et al., 2007; Martini, 2003; Loureiro & Querol, 1999). Folglich besitzt der Most zu Beginn der Fermentation eine komplexe Hefeflora, die sich aus den Hefen der Trauben, der Kellerflora und gegebenenfalls zugesetzten Starterkulturen zusammensetzt. Hierbei werden sogenannte „wilde“ Hefen (Nicht-Saccharomyceten) und „echte“ Weinhefen (Saccharomyceten) unterschieden. Die Wildhefen kommen im frisch gepressten Most in deutlich größerer Zellzahl vor als die Weinhefen, wobei ihr Zelltiter bis zu tausendfach höher sein kann (Dittrich & Großmann, 2005). Aus diesem Grund leiten sie zunächst die Gärung ein und können bis zu einer Zelldichte von $10^6 - 10^7$ KBE/ml heranwachsen (Fleet, 2003). Im Verlauf der Gärung sinkt ihre Population jedoch infolge des steigenden Ethanolgehalts, wenn dieser eine Konzentration von etwa 4 % überschreitet. Saccharomyceten können sich nun aufgrund ihrer hohen Ethanoltoleranz durchsetzen und die Fermentation fortführen. Sie stellen bis zum Ende der alkoholischen Gärung die dominierende Gattung dar und oft können zu diesem Zeitpunkt kaum noch andere Hefearten isoliert werden (Bisson & Joseph, 2009).

1.2 Die Gattung *Saccharomyces*

Die Entwicklung neuer Differenzierungsmethoden, sowie die Isolierung neuer Stämme haben dazu geführt, dass im Verlauf der letzten 100 Jahre zahlreiche taxonomische Veränderungen innerhalb der Gattung *Saccharomyces* stattfanden. Die verschiedenen Arten weisen untereinander sehr enge Verwandtschaftsverhältnisse auf, weshalb sie bis vor einigen Jahren als *Saccharomyces sensu stricto* - Komplex (lat. im strengen Sinne, urspr. bezogen auf den direkten Zusammenhang mit Fermentationsprozessen) bezeichnet und einer zweiten Gruppe, dem *Saccharomyces sensu lato* - Komplex (entfernt verwandt mit *S. cerevisiae*) gegenüber gestellt wurden (Rainieri et al., 2003). Die Arten des ehemaligen *S. sensu lato* - Komplexes wurden aufgrund neuer Erkenntnisse in andere Gattungen eingeordnet. So wurde beispielsweise *S. kluyveri* der Gattung *Lachancea* sowie *S. castellii* der Gattung *Naumovozyma* zugewiesen, während *S. exiguus* und *S. servazzii* derzeit der Gattung *Kazachstania* angehören (Hittinger, 2013; Kurtzman, 2003). Daher besteht die Gattung *Saccharomyces* gegenwärtig aus den Vertretern des ehemaligen *S. sensu stricto* - Komplexes. Die taxonomische Stellung der einzelnen Arten dieser Gattung zueinander wird jedoch auf der Grundlage aktueller Forschungsergebnisse nach wie vor diskutiert (Abb. 1.1). Vaughan-Martini und Martini (2011) beschrieben acht akzeptierte Spezies, die der Gattung *Saccharomyces* zugeordnet werden können: *Saccharomyces arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* und *S. pastorianus*, wobei das Auftreten zweier Varietäten der Art *S. bayanus* (var. *bayanus* und var. *uvarum*) erwähnt wird. Bei *S. pastorianus* handelt es sich um einen Hybriden, der genetisches Material von *S. cerevisiae* und einer weiteren *Saccharomyces*-Art besitzt. Auf der Grundlage vieler Studien wurde angenommen, dass *S. bayanus* die zweite parentale Spezies darstellen könnte (Nakao et al., 2009) (Abb. 1.1A). Mit der Entdeckung der neuen Art *S. eubayanus* wurde die Frage nach der zweiten Elternspezies erneut aufgeworfen. Eine durchgeführte Genomstudie lieferte Hinweise, dass es sich bei *S. pastorianus* um einen Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. eubayanus* handeln könnte (Libkind et al., 2011). Zudem stellten Libkind et al. (2011) aufgrund ihrer Erkenntnisse die Hypothese auf, dass *S. bayanus* ein komplexer domestizierter Hybrid aus *S. eubayanus*, *S. uvarum* und *S. cerevisiae* sei (Abb. 1.1B), der an natürlichen Standorten nicht vorkommt und sich innerhalb des Umfelds der Brauereiindustrie entwickelt hat. Weiterhin ist die Klassifizierung von *S. cariocanus* Gegenstand einiger Studien, die untersuchen, ob es sich bei dieser Hefe tatsächlich um eine eigenständige Art oder eine von *S. paradoxus* abgeleitete Mutante handelt (Hittinger, 2013).



TRENDS in Genetics

Abb. 1.1: Schematischer Überblick über die taxonomische Beziehung der Arten der Gattung *Saccharomyces* und wichtiger interspezifischer Hybride aufgrund von Erkenntnissen vor (A) und nach der Beschreibung von *S. eubayanus* (B). Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass *S. pastorianus* ein Hybrid aus *S. bayanus* und *S. cerevisiae* sei (A) deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass *S. cerevisiae* und *S. eubayanus* die Elternspezies dieser Hybrid-Stämme darstellen (B, blaue Pfeile). Zudem scheint es sich bei *S. bayanus* um einen komplexen Hybriden, welcher sich aus drei parental Spezies zusammensetzt, zu handeln (B, rote Pfeile). Im Rahmen der Wein- und Bierherstellung sind *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* Hybrid-Stämme von Bedeutung (B, schwarze Pfeile). (Abbildung nach Hittinger, 2013 (B); Rainieri et al., 2003 (A); mit der Genehmigung zum Druck durch das Copyright Clearance Center).

1.2.1 Die Bedeutung von Hefen der Gattung *Saccharomyces*

S. cerevisiae und *S. bayanus* sind die bekanntesten und häufigsten Vertreter der Gattung *Saccharomyces* bei der Weinbereitung. Sie gehören zu den stark gärenden Hefen und sind maßgeblich für die alkoholische Gärung verantwortlich. Da sie sich zudem durch die Bildung positiver Nebenprodukte auszeichnen, werden sie häufig als Starterkultur verwendet (Dittrich & Großmann, 2005). Auch das Vorkommen von Hybriden dieser beiden Arten im Wein wurde des Öfteren beschrieben (Le Jeune et al., 2007; Masneuf et al., 1998). Im Bereich der Lebensmittelindustrie ist *S. cerevisiae* an zahlreichen weiteren Prozessen beteiligt (Bier- und Teigherstellung) und gilt als die weltweit am häufigsten verwendete Hefe in der Biotechnologie (Johnson & Echavarrri-Erasun, 2011). Weiterhin ist diese Art aufgrund ihrer Stellung als eukaryotischer Modellorganismus von besonderem Interesse. Auch *S. bayanus*-Stämme finden bei der Herstellung von untergärigem Bier Anwendung, wobei es sich hier vor allem um *S. bayanus* var. *bayanus* handelt. Im Wein sowie im Cidre findet man Stämme, die *S. bayanus* var. *uvarum* zugeordnet werden können (Naumova et al., 2011). Die Vereinigung der beiden ehemals eigenständigen Arten *S. bayanus* und *S. uvarum* wird von einigen Autoren kritisch beurteilt. Trotz der festgestellten hohen DNA-Homologie der jeweiligen Typstämme (> 95 %) sind Hybride zwischen *S. bayanus* var. *bayanus* und var. *uvarum* nur semifertil und somit sind beide Varietäten teilweise genetisch isoliert (Naumov et al., 2000b; Rosini et al., 1982). Weiterhin wird die Wahl des *S. bayanus* var. *bayanus* Typstamms (CBS 380^T) diskutiert (vergl. Abb. 1.1A), da einige Studien zu der Annahme führten, dass es sich bei diesem Stamm um einen Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. uvarum* handeln könnte (Nguyen & Gaillardin, 2005; Nguyen et al., 2000; Rainieri et al., 1999). Laut Libkind et al. (2011) könnte die genetische Zusammensetzung dieses Stammes noch komplexer sein (vergl. Abb. 1.1B).

Die Hefe *S. pastorianus* ist vor allem bekannt für ihre Anwendung bei der Produktion von untergärigem Lagerbier. In der Weinherstellung hingegen ist sie eher von geringer Relevanz (Johnson & Echavarrri-Erasun, 2011). Eigentlich stellt *S. pastorianus* keine Art nach der klassischen Art-Definition dar, sondern umfasst eine Gruppe von Hybriden, die keine fertilen Nachkommen zeugen können. Da *S. pastorianus* aus systematischer Sicht eine Stellung zwischen den beiden deutlich voneinander abgrenzbaren Spezies *S. cerevisiae* und *S. bayanus*/*S. uvarum* einnimmt und auch aufgrund der großen industriellen Bedeutung in der Fermentationsindustrie, wird der Status von *S. pastorianus* als eigene Art beibehalten (Vaughan-Martini & Martini, 2011).

Eine weitere Art der Gattung, *S. paradoxus* ist meist an natürlichen Habitaten wie Baumsekreten und Blattoberflächen (Phyllosphäre) nachweisbar, konnte jedoch auch von Weintrauben im Weinberg isoliert werden (Vaughan-Martini & Martini, 2011; Redžepović et al., 2002). Aufgrund der guten önologischen

Eigenschaften einiger Stämme wird eine mögliche Anwendung als Starterkultur untersucht (Orlić et al., 2010; Eschstruth & Divol, 2011; Redžepović et al., 2003).

S. kudriavzevii wurde erstmals an einem natürlichen Standort in zersetzten Blättern entdeckt. Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Art endemisch für Japan sei (Naumov et al., 2000a). Mittlerweile wurden jedoch auch Stämme dieser Art in Taiwan, Portugal und Spanien gefunden (Naumov et al., 2013; Lopes et al., 2010; Sampaio & Gonçalves, 2008). Auf Weintrauben, in Most und Wein konnten Vertreter dieser Art bisher nicht nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wurde jedoch das Vorkommen von Hybriden zwischen *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* in Most und Wein in Europa beschrieben. Diese scheinen in der Lage zu sein, die Eigenschaften ihrer parentalen Spezies z.B. bezüglich Alkohol- und Temperaturtoleranz zu vereinen (Lopandic et al., 2007; González et al., 2006).

Die beiden Arten *S. arboricola* und *S. mikatae* konnten bisher nur in natürlichen Habitaten gefunden werden. *S. arboricola*-Stämme wurden in verschiedenen Regionen in China von Baumrinden der Familie der Fagaceae (Buchengewächse) isoliert, wohingegen Stämme der Art *S. mikatae* aus zersetzten Blättern und Bodenproben aus Japan stammen (Wang & Bai, 2008; Naumov et al., 2000a). *S. arboricola* und *S. mikatae* sind wie *S. cariocanus* derzeit nicht von industrieller Bedeutung, obwohl das Vorkommen von *S. cariocanus* sowohl an natürlichen Standorten in Brasilien (*Drosophila* sp.), als auch in Pulque, einem fermentierten Getränk aus Agavensaft, in Mexiko beschrieben wurde (Vaughan-Martini & Martini, 2011; Naumov et al., 2000a).

1.2.2 Methoden zur Identifizierung der Saccharomyceten

Die Gattung *Saccharomyces* besteht aus einer Gruppe relativ nah verwandter Arten, die hohe phänotypische und genetische Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Eine eindeutige Identifizierung ist daher nicht trivial und wird durch die mögliche interspezifische Hybridbildung zusätzlich erschwert.

Konventionelle Methoden zur Klassifikation von Hefen anhand morphologischer und physiologischer Untersuchungen sind nicht ausreichend, um alle beschriebenen *Saccharomyces*-Arten zuverlässig zu differenzieren (Rainieri et al., 2003). Beispielsweise lassen sich die beiden Spezies *S. bayanus* und *S. pastorianus* aufgrund eines vorhandenen aktiven Fructose-Transports von *S. cerevisiae* und *S. paradoxus* abgrenzen. Allerdings sind bei weiteren physiologischen Merkmalen, die zur Identifizierung herangezogen werden, wie das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen oder in vitaminfreiem Medium sowie die Fähigkeit der Assimilation von Mannitol oft bereits Unterschiede auf Stamm-Niveau feststellbar. Dadurch wird eine Zuordnung von unbekanntem Isolat auf Art-Ebene erschwert (Tornai-Lehoczi et al., 1996).

Alternativ oder ergänzend werden heutzutage zunehmend molekularbiologische Identifizierungstechniken angewandt. Eine gängige Methode in der Hefe-Taxonomie ist der Sequenzvergleich der ribosomalen Gene, wobei sowohl die Gene für die 18S rRNA und die 26S rRNA als auch der 5,8S rRNA mit ihren flankierenden ITS-Regionen (Internal Transcribed Spacer) herangezogen werden (vergl. Abb. 2.3). *Saccharomyces*-Arten weisen eine hohe Übereinstimmung in ihrer 18S rDNA auf. Einige Arten unterscheiden sich nur durch sehr wenige Basensubstitutionen, während andere Arten identische Sequenzen besitzen (Naumov et al., 2000a). Auch ein Vergleich der Sequenz der 26S rDNA sowie der variablen ITS-Region ermöglicht keine eindeutige Differenzierung dieser nah verwandten Hefearten (Almeida & Araujo, 2013; Chang et al., 2007; Montrocher et al., 1998).

Vergleicht man jedoch das gesamte Genom verschiedener *Saccharomyces*-Arten, so sind deutliche Unterschiede feststellbar. Vaughan-Martini (1989) konnte mittels DNA-Reassoziationsstudien zwischen *S. paradoxus* und *S. cerevisiae* nur eine 50 %-ige und zwischen *S. paradoxus* und *S. bayanus* eine 30 %-ige DNA-Homologie ermitteln. Sehr geringe DNA-Übereinstimmungen wurden auch zwischen *S. cerevisiae* und *S. bayanus* festgestellt, bei welchen die Reassoziationswerte im Durchschnitt bei 20 % lagen (Vaughan-Martini & Martini, 1987). *S. kudriavzevii*- und *S. mikatae*-Stämme weisen DNA-Homologien zwischen 26 % und 51 % zu anderen Arten der Gattung *Saccharomyces* auf (Naumov et al., 2000a). Weiterhin zeigte der Hybrid *S. pastorianus* mit 72 % eine höhere DNA-Homologie zu *S. bayanus* als zu *S. cerevisiae*, zu welchem die DNA-Homologie etwa 55 % betrug (Vaughan-Martini & Martini, 1987). Im Gegensatz dazu konnte für die beiden Arten *S. paradoxus* und *S. cariocanus* jedoch eine DNA-Reassoziationsrate von 97 % ermittelt werden (Kurtzman, 2006). In der Regel geht man davon aus, dass Stämme, die eine DNA-Homologie zwischen 70 % und 100 % aufweisen, einer Art angehören (Kurtzman et al., 2011). Die DNA-DNA-Hybridisierung kann demnach nicht das entscheidende Kriterium bei der Spezies-Differenzierung sein.

Laut dem biologischen Artkonzept führt die Kreuzung von Vertretern unterschiedlicher Arten zu sterilen Hybriden, wohingegen durch innerartliche Kreuzung fertile Nachkommen hervorgebracht werden. Diese Definition trifft auf alle beschriebenen Arten der Gattung *Saccharomyces* zu, da zwischenartliche Hybride keine lebensfähigen Ascosporen bilden können (Almeida & Araujo, 2013; Naumov et al., 2010; Naumov et al., 2000a). Hierbei stellt *S. pastorianus* eine Ausnahme dar, da unter dieser Art-Bezeichnung eine Gruppe von Hybriden zusammengefasst wird. Die Sporulationsrate von *S. pastorianus* beträgt bei den meisten Stämmen weniger als 2 %, wobei die Sporen in der Regel nicht lebensfähig sind (Vaughan-Martini & Martini, 2011). Libkind et al. (2011) konnten zeigen, dass von Hybriden, die aus der Kreuzung von *S. eubayanus* und *S. bayanus* var. *uvarum* hervorgegangen sind, nur 7,3 % überlebensfähige Ascosporen gebildet werden, was die genetische Isolation dieser beiden Spezies verdeutlicht.

Die Durchführung von DNA-DNA-Hybridisierungen und Kreuzungsversuchen ist sehr aufwendig und zeitintensiv. Aufgrund der Bedeutung einiger *Saccharomyces*-Arten im Bereich der Lebensmittelindustrie und Biotechnologie ist eine eindeutige Differenzierung jedoch erforderlich. Auch für taxonomische Fragestellungen und im Hinblick auf die Evolution der einzelnen Spezies ist eine zuverlässige Charakterisierung von Interesse. Daher beschäftigen sich zahlreiche Studien mit der Entwicklung und Optimierung neuer Identifizierungsmethoden.

Eine Methode, die häufig im Bereich der Hefe-Taxonomie angewandt wird, ist das Karyotyping. Hierbei werden Chromosomen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt. Die Chromosomenprofile sind innerhalb der Gattung *Saccharomyces* recht homogen, wobei sich jedoch bei verschiedenen Arten Unterschiede feststellen lassen (Naumov et al., 2000a). *S. bayanus* kann beispielsweise aufgrund seines spezifischen Chromosomenmusters von *S. cerevisiae* und *S. paradoxus*, die ein ähnliches Muster zueinander aufweisen, differenziert werden (Naumov et al., 1992). Rainieri et al. (1999) konnten sogar Unterschiede im Karyotyp von Stämmen der beiden Varietäten *S. bayanus* var. *bayanus* und var. *uvarum* nachweisen. Auch die beiden Spezies *S. arboricola* und *S. mikatae* lassen sich anhand ihres Chromosomenprofils von anderen Arten der Gattung differenzieren (Wang & Bai, 2008; Naumov et al., 1995).

Die Isoenzym-Analyse stellte sich ebenfalls als geeignete Technik zur Identifizierung von Vertretern der Gattung *Saccharomyces* heraus (Naumova et al., 2003). Alle derzeit beschriebenen Arten, inklusive *S. eubayanus* können z.B. aufgrund speziesspezifischer Esteraseisoenzym-Bandenmuster voneinander unterschieden werden (Türkes, 2013).

Weiterhin wurden zahlreiche PCR-basierte Identifizierungsmethoden, die eine schnelle und zuverlässige Differenzierung der *Saccharomyces*-Arten anstreben, entwickelt. Dabei ist eine Unterscheidung verschiedener Arten durch Sequenzvergleiche bestimmter Gene wie *EF-1 α* (Translationselongationsfaktor 1 α), *COX 2* (Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase) oder des β -Tubulin-Gens möglich (Huang et al., 2009; Kurtzman & Robnett, 2003). Des Weiteren werden Multigenanalysen (Multilocus Sequence Typing, MLST), bei denen mehrerer Gene untersucht werden, herangezogen (Kurtzman & Robnett, 2003). Diese werden häufig in Kombination mit RFLP-Techniken (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) angewandt, wodurch eine zeitnahe und unkomplizierte Auswertung möglich ist. Zudem stellen Multigenanalysen eine geeignete Methode zur Charakterisierung von Hybrid-Stämmen dar (Peris et al., 2012; González et al., 2006). Für einige *Saccharomyces*-Arten wurden spezifische Primer entwickelt, welche teilweise in einer Multiplex- oder zum Zweck der Quantifizierung in einer Realtime-PCR eingesetzt werden können (Muir et al., 2011; Chang et al., 2007; Torriani et al., 2004). Vielfach werden auch DNA-Fingerprint-Techniken wie die RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) oder

von ihr abgeleitete Methoden zur Differenzierung verschiedener *Saccharomyces*-Arten angewandt (Huang et al., 2008; Naumova et al., 2003).

Die FTIR-Spektroskopie (Fourier-Transform-Infrarot) stellte sich als vielversprechende Identifizierungsmethode für Hefen heraus (Seiler & Scherer, 2003). Aufgrund der Absorption von Infrarotstrahlung durch Zellbestandteile wie Fettsäuren, Polysaccharide und Proteine werden spezifische Spektren erzeugt, die durch den Abgleich mit einer Datenbank zugeordnet werden können (Wenning et al., 2002). Durch einen einfachen Vergleich der IR-Spektren können die nah verwandten *Saccharomyces*-Arten jedoch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Hierzu ist eine spezielle Datenanalyse mittels sogenannter künstlicher neuronaler Netze erforderlich (Hutzler, 2009).

Die Wahl der geeigneten Identifizierungsmethode ist von der jeweiligen Fragestellung abhängig. Wichtige Aspekte sind hierbei unter anderem die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode, die Beschaffenheit des Ausgangsmaterials (Reinkultur oder z.B. eine Mostprobe mit einer Vielzahl an Mikroorganismen), die benötigte Laborausrüstung sowie der Zeitaufwand bei der Durchführung (Fröhlich et al., 2009).

1.3 Bakterien in der Weinbereitung

Während des Prozesses der Weinherstellung sind vor allem zwei Bakteriengruppen von Bedeutung: Essigsäurebakterien und Milchsäurebakterien.

Essigsäurebakterien sind gramnegative, strikt aerobe Organismen, die in der Lage sind, Ethanol zu Essigsäure oder CO₂ zu oxidieren und sind vor allem für ihre Anwendung in der Herstellung von Essig bekannt. Da sie an Lebensräume mit hohen Zucker- und Ethanolkonzentrationen angepasst sind, können sie auch weinassoziierte Habitate wie Trauben und Most besiedeln, wobei ihr Vorkommen im Rahmen der Weinherstellung jedoch nicht erwünscht ist (Bartowsky & Henschke, 2008). Bisher konnten elf verschiedene Essigsäurebakterien-Arten, die sich den Gattungen *Acetobacter*, *Gluconobacter* und *Gluconacetobacter* zuordnen lassen, von Trauben, Most und Wein isoliert werden (Wirth et al., 2011). Auf gesunden Trauben bildet *Gluconobacter oxydans* mit Zellzahlen von 10² - 10⁵ KBE/ml die dominierende Spezies, wohingegen in beschädigtem Traubenmaterial, in dem generell höhere Essigsäurebakterien-Populationen vorkommen, vor allem *Acetobacter*-Arten zu finden sind (Guillamón & Mas, 2009). Nach Beginn der alkoholischen Fermentation stellen sich schnell anaerobe Verhältnisse ein, wodurch die Zellzahl der Essigsäurebakterien im Most in der Regel rasch abnimmt. Einige Arten können jedoch auch in Gegenwart geringer Sauerstoffkonzentrationen überleben (Fugelsang & Edwards, 2007). Möglicherweise gehen sie in ein Ruhestadium (VBNC-Zustand, viable but non-culturable) über, in

welchem sie nur geringe Stoffwechselaktivität aufweisen und aus dem sie durch Sauerstoffkontakt reaktiviert werden können (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). Durch Belüftung des Weines bei Pumpvorgängen kann die Population der Essigsäurebakterien daher wieder ansteigen. Für den Fall, dass beim Abfüllen Essigsäurebakterien in die Flasche gelangen, ist jedoch meist eine rasche Abnahme der Zellzahl nach dem Verkorken feststellbar (Guillamón & Mas, 2009). Die Verwendung fehlerhafter Korke oder schlechte Lagerbedingungen können allerdings zu einem Verderb des abgefüllten Weins durch die Aktivität von Essigsäurebakterien führen (Bartowsky et al., 2003).

Bei den Milchsäurebakterien handelt es sich um grampositive, obligat gärende, jedoch aerotolerante Mikroorganismen, die Milchsäure als Hauptprodukt bei der Vergärung verschiedener Zucker bilden, wobei sich zwei Formen der Milchsäuregärung unterscheiden lassen (König & Fröhlich, 2009). Bei der homofermentativen Milchsäuregärung entsteht Lactat (> 90 %) als Endprodukt, wohingegen bei der heterofermentativen Milchsäuregärung neben Lactat auch Acetat oder Ethanol und CO₂ gebildet werden können (Heider, 2007). Bezüglich ihres Gärungstyps können Milchsäurebakterien in drei Gruppen eingeteilt werden. Zu den obligat Homofermentativen gehören beispielsweise *Lactobacillus delbrueckii* und *Lb. jensenii*, während sich *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii* und *Oenococcus oeni* zu den obligat Heterofermentativen zählen lassen. Fakultativ heterofermentative Milchsäurebakterien sind z.B. *Lb. casei* und *Lb. plantarum* (Fugelsang & Edwards, 2007). Milchsäurebakterien werden bei der Herstellung vieler Nahrungs- und Genussmittel wie Soja- und Milchprodukten (Joghurt, Quark, Käse), Sauerteig, Kaffee und Kakao eingesetzt. Durch das entstehende Lactat bei der Milchsäuregärung kommt es zu einer Ansäuerung, wodurch das Wachstum anderer Bakterien gehemmt wird. Diesen Effekt nutzt man zur Konservierung verderblicher Nahrungsmittel wie z.B. Rohwurst, Oliven und Sauerkraut (Heider, 2007). Die Toleranz gegenüber Säure und teilweise auch hohen Ethanolkonzentrationen ermöglicht es Milchsäurebakterien, in Most und Wein zu wachsen. Bisher konnten etwa 25 unterschiedliche weinassoziierte Arten isoliert werden, die den Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* und *Weissella* angehören (Mesas et al., 2011; König & Fröhlich, 2009; Mañes-Lázaro et al., 2009, 2008a, 2008b).

Die Population von Milchsäurebakterien auf Weintrauben ist sehr gering und überschreitet selten 10³ KBE/g (Barata et al., 2012b). Auch in beschädigtem Traubenmaterial ist kein vermehrtes Wachstum feststellbar, da die nährstoffbedürftigen Milchsäurebakterien unter aeroben Bedingungen nicht mit Essigsäurebakterien und Hefen, die in deutlich größerer Zellzahl auftreten, konkurrieren können (Barata et al., 2012a). Die Untersuchung der Diversität von Milchsäurebakterien auf Trauben ist daher häufig nur über Anreicherungskulturen möglich. Hierbei konnten *Lactobacillus*- und einige *Pediococcus*-Arten, aber auch *Lc. mesenteroides*, *W. paramesenteroides* und *O. oeni* in unterschiedlichen Studien nachgewiesen

werden (Renouf et al., 2007; Bae et al., 2006; Renouf et al., 2005; Lafon-Lafourcade et al., 1983). Infolge der geringen Zellzahl auf Trauben weist auch der frisch gepresste Most zunächst einen sehr niedrigen Titer an Milchsäurebakterien auf. Dieser kann jedoch innerhalb der ersten Tage der Fermentation auf 10^4 - 10^5 KBE/ml ansteigen (König & Fröhlich, 2009). Im weiteren Verlauf der Gärung sinkt die Gesamtzellzahl der Milchsäurebakterien aufgrund des steigenden Alkoholgehalts erneut, wobei die Abnahme der Population ab einer Alkoholkonzentration zwischen 5 und 6 % zu beobachten ist (Lonvaud-Funel, 1999). Nach der alkoholischen Gärung und während der malolaktischen Fermentation kann die Population zwischen 10^7 und 10^8 KBE/ml erreichen (Lonvaud-Funel et al., 1991). Die Diversität der Milchsäurebakterien kann sehr komplex sein und verschiedene Arten können zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Weinbereitung dominieren. Wichtige Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen, sind unter anderem der pH-Wert, die steigende Alkoholkonzentration sowie die Kellertemperatur. Weiterhin sind aber auch Wechselwirkungen mit Hefen und anderen Bakterien von Bedeutung (Fugelsang & Edwards, 2007).

1.3.1 Die Rolle der Milchsäurebakterien während der Vinifikation

Milchsäurebakterien haben durch ihre Stoffwechselaktivität einen maßgeblichen Einfluss auf die Qualität des Weins. Besondere Bedeutung hat hierbei die sogenannte malolaktische Fermentation, die meist am Ende oder nach der alkoholischen Gärung auftritt. Hierbei wird die Dicarbonsäure L-Malat zur Monocarbonsäure L-Lactat decarboxyliert (Liu, 2002). Diese Reaktion wird auch als biologischer Säureabbau bezeichnet, da sie in erster Linie einen Anstieg des pH-Werts bewirkt, was insbesondere in Weinen mit hohem Säuregehalt erwünscht ist (König & Fröhlich, 2009). Neben der Abnahme des starken, häufig als „grün“ bezeichneten Geschmacks von Malat kann es während der malolaktischen Fermentation zu zahlreichen weiteren Aromamodifikationen kommen (Lonvaud-Funel, 1999). Das Milchsäurebakterium *O. oeni* spielt eine entscheidende Rolle beim biologischen Säureabbau. Aufgrund der Toleranz gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen und niedrigen pH-Werten dominiert diese Spezies meist am Ende der alkoholischen Gärung (Dicks et al., 1995; Lafon-Lafourcade et al., 1983). Die malolaktische Fermentation kann spontan ablaufen, jedoch verwenden Winzer häufig kommerzielle Starterkulturen, um eine bessere Kontrolle dieses Prozesses zu erreichen. Bevorzugt wird hierbei *O. oeni* eingesetzt, aber auch Stämme der Art *Lb. plantarum*, welche gute önologische Eigenschaften aufweisen, sind erhältlich (Du Toit et al., 2011).

geringere Mengen von 0,6 g/l sensorisch wahrnehmbar (Dittrich & Großmann, 2005). Ein weiterer Weinefehler, der vor allem auf die Bildung von Diacetyl zurückzuführen ist, ist der Milchsäureton. Diacetyl ist ein Aromastoff, der hauptsächlich beim Abbau von Citrat gebildet wird (Ramos et al., 1995). Während geringe Konzentrationen dieser Substanz (< 4 mg/l) positive Auswirkungen auf die Sensorik des Weins haben können und als „buttrig“ oder „nussig“ beschrieben werden, tritt das „Butteraroma“ in höheren Konzentrationen zu sehr in den Vordergrund. Dabei ist der sensorische Grenzwert jedoch von der Rebsorte abhängig (Fugelsang & Edwards, 2007; Martineau et al., 1995). Auch der sogenannte Mäuselton kann durch die Aktivität von Milchsäurebakterien verursacht werden. Die stickstoffhaltigen heterozyklischen Verbindungen 2-Acetyltetrahydropyridin (ACTPY), 2-Acetyl-1-pyrrolin (ACPY) und 2-Ethyltetrahydropyridin (ETPY), die aus der Umwandlung von Ornithin und Lysin in Gegenwart von Ethanol resultieren, können diesen an Mäuseharn erinnernden Geruch hervorrufen (Snowdon et al., 2006). Weiterhin kann die Bildung von Acrolein, welches mit Polyphenolen des Weins reagiert, zum Bitterwerden des Weins führen (Dittrich & Großmann, 2005). Bei dem Geranienton, der durch die Umsetzung von Sorbinsäure herbeigeführt wird, sowie dem Mannitstich, der infolge der Reduktion von Fructose entstehen kann, handelt es sich ebenfalls um Weinefehler, die durch Milchsäurebakterien ausgelöst werden können (Bartowsky, 2009). Einige Milchsäurebakterien sind in der Lage, Exopolysaccharide zu produzieren, was zum Zähwerden (Lindwerden) des Weines führen kann (Dittrich & Großmann, 2005). Bereits geringe Konzentrationen von 100 mg/l können dem Wein eine inakzeptable Viskosität verleihen (Lonvaud-Funel, 1999). *P. damnosus* gilt als einer der wichtigsten Schleimbildner im Wein, aber auch die Fähigkeit vieler *Lactobacillus*-, *Lc. mesenteroides*- und *P. parvulus*-Stämme zur Exopolysaccharid-Synthese wurde beschrieben (Blättel et al., 2011; Montersino et al., 2008; Walling et al., 2005). Häufig handelt es sich bei den Polysacchariden um β -D-Glucane, jedoch können auch andere Monosaccharide neben Glucose vorhanden sein. Niedrige Restzuckermengen von 50 - 100 mg/l können zur Exopolysaccharid-Bildung ausreichen, weshalb das Problem auch noch nach dem Abfüllen in der Flasche auftreten kann (Fugelsang & Edwards, 2007). Da schleimproduzierende Stämme in der Regel eine erhöhte Toleranz gegenüber Ethanol und SO_2 aufweisen, ist ihr Vorkommen während der Weinbereitung besonders kritisch (Lonvaud-Funel, 1999). Ein weiterer wichtiger Aspekt der mikrobiologischen Qualitätsminderung von Wein ist die Bildung biogener Amine. Biogene Amine sind stickstoffhaltige, niedermolekulare Verbindungen, die hauptsächlich durch die Decarboxylierung von Aminosäuren, aber auch durch Transaminierung, reduktive Aminierung oder beim Abbau von Stickstoffverbindungen entstehen können (König et al., 2013b). Die wichtigsten im Wein vorkommenden biogenen Amine sind Putrescin, Histamin, Tyramin und Phenylethylamin, wobei generell zu beobachten ist, dass der Gehalt biogener Amine in Rotwein höher ist als in Weißwein (Sebastian et al., 2011; Kaschak

et al., 2009). Die Fähigkeit zur Bildung biogener Amine ist kein Speziesmerkmal, sondern abhängig vom jeweiligen Stamm. Es konnten jedoch unter zahlreichen Milchsäurebakterien-Arten biogene Amine produzierende Stämme identifiziert werden, darunter *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *Lb. plantarum*, einige *Pediococcus*-Arten, *Lc. mesenteroides* und auch *O. oeni* (Coton et al., 2010). Biogene Amine können die Sensorik des Weins beeinflussen. So ist beispielsweise für Histidin und Tyramin bekannt, dass sie eine gewisse Bitterkeit bewirken können (König et al., 2013b). Von größerer Bedeutung ist jedoch, dass die Aufnahme von biogenen Aminen in höheren Konzentrationen zu gesundheitlichen Problemen wie Kopfschmerzen, Atemnot, Herzrasen, Bluthochdruck bis hin zu pseudoallergischen Reaktionen führen kann (Lonvaud-Funel, 2001; Silla Santos, 1996).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass Weinfehler nicht nur durch bakterielle Stoffwechselaktivitäten hervorgerufen werden; auch Wildhefen können an der Ausbildung von Fehltonen beteiligt sein. *Brettanomyces bruxellensis* ist beispielsweise in der Lage, die Verbindungen, welche den Mäuselton bewirken, zu synthetisieren (Grbin & Henschke, 2000). Bekannter ist die Hefe allerdings als Hauptverursacher des Pferdeschweiß-Aromas (Röder et al., 2007). Weiterhin werden z.B. *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii* und *Schizosaccharomyces pombe* als Schadhefen angesehen, aber auch *S. cerevisiae* kann einen Verderb des Weins hervorrufen, wenn diese Hefe als Kontamination in der bereits abgefüllten Flasche vorkommt (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

1.3.2 Identifizierung und Differenzierung von Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien können aufgrund der dargestellten Stoffwechselaktivität während der Weinherstellung die Qualität des Endproduktes sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Das Vorkommen bestimmter Arten oder Stämme und die Zellzahl der Milchsäurebakterien-Population sind wichtige Faktoren. Es ist aber auch entscheidend, zu welchem Zeitpunkt Milchsäurebakterien während der Fermentation auftreten, da mikrobielles Wachstum zu allen Phasen der Weinbereitung, von den Trauben im Weinberg bis hin zur Lagerung des abgefüllten Weins, erfolgen und negative Auswirkungen haben kann (Fleet, 1999). Das bakterielle Wachstum sollte daher stetig beobachtet werden, um ein zeitnahes Eingreifen zu ermöglichen. Hierzu werden schnelle aber auch zuverlässige Identifizierungsmethoden benötigt.

Ursprünglich wurden Milchsäurebakterien aufgrund phänotypischer Eigenschaften klassifiziert. Zwar können Isolate anhand ihrer Morphologie, des Gärungstyps und der Konfiguration des bei der Fermentation gebildeten Lactat-Isomers bestimmten Gruppen zugeordnet werden, allerdings ist eine Identifizierung auf Art-Ebene auf der Grundlage dieser Merkmale nicht möglich (König & Fröhlich, 2009).

Methoden, die auf der Analyse von Fettsäuren und Protein-Mustern der Zellwand oder ganzer Zellen basieren, liefern häufig ebenfalls keine genauen Ergebnisse (Mohania et al., 2008). Um unbekannte Isolate zu charakterisieren, kann die Untersuchung des Substrat-Spektrums herangezogen werden. In einer Studie von Moraes et al. (2013) wurden verschiedene Differenzierungsmethoden miteinander verglichen. Die routinemäßig angewandten physiologischen Tests API50CHL (bioMérieux, Nürtingen), bei dem die Verwertbarkeit von 49 Kohlenhydraten sowie die Hydrolyse von Esculin überprüft wird, und GP2 MicroPlate (Biolog, Hayward, USA), bei dem die Fermentation von 96 Substraten analysiert wird, waren deutlich unzuverlässiger als die untersuchten molekularbiologischen Identifizierungsmethoden. Die Problematik physiologischer Tests besteht darin, dass diese Methoden stark von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen abhängig sind und daher mehrdeutige Ergebnisse liefern können. Weiterhin können oft bereits stammspezifische Unterschiede festgestellt werden, wodurch eine präzise Identifizierung auf Art-Ebene erschwert wird (Mohania et al., 2008). Heutzutage greift man daher meist auf molekularbiologische Differenzierungsmethoden zurück.

In den 1960er Jahren fanden erstmals DNA-Hybridisierungstechniken Anwendung, um Genom-Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Bakterien-Stämmen aufzuklären (Almeida & Araujo, 2013). Seither bilden DNA-Reassoziationsstudien die Grundlage der bakteriellen Speziesdefinition, wobei in der Regel Stämme mit DNA-DNA-Hybridisierungswerten $\geq 70\%$ einer Art zugeordnet werden (Staley, 2006; Wayne et al., 1987). Die 16S rDNA erwies sich als geeigneter phylogenetischer Marker, da dieses Gen universell vorkommt und aufgrund seiner essentiellen Funktion gut konserviert ist, jedoch auch variable Bereiche aufweist und eine geeignete Größe besitzt (Mohania et al., 2008). Die Sequenzanalyse der 16S rDNA ist daher eine Standardmethode zur Klassifizierung bakterieller Isolate. Allerdings erlaubt das Auflösungsvermögen dieser Methode nicht immer eine zuverlässige Identifizierung auf Spezies-Niveau (Staley, 2006). Auch einige nah verwandte Milchsäurebakterien-Arten können nicht anhand eines 16S rDNA-Sequenzvergleichs differenziert werden (Moraes et al., 2013; Aymerich et al., 2003). Daher werden bevorzugt alternative Gene herangezogen, die eine größere Variabilität aufweisen. So werden beispielsweise des Öfteren die 23S rDNA, die intergene Region zwischen 16S und 23S rDNA, das Gen für den Elongationsfaktor Tu (*tuf*) oder der β -Untereinheit der RNA Polymerase (*rpoB*) untersucht (Renouf et al., 2006b; Chavagnat et al., 2002; Nour, 1998). Häufig werden die entsprechenden Gene nicht sequenziert, sondern mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, um eine schnellere Auswertung zu ermöglichen. So konnten Claisse et al. (2007) eine RFLP-Methode auf Grundlage des *rpoB*-Gens entwickeln, mit der es möglich ist, 19 verschiedene Spezies weinrelevanter Milchsäurebakterien zu differenzieren. Auch RFLP-basierte Techniken zur Analyse der 16S rDNA (ARDRA, Amplified Ribosomal

DNA Restriction Analysis) und der intergenen Region finden vielfach Anwendung (Mancini et al., 2012; Rodas et al., 2003).

Weiterhin wurden kultivierungsunabhängige Methoden entwickelt, die eine Analyse der gesamten mikrobiellen Flora eines Habitats erlauben. Bei der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) werden DNA-Fragmente nicht anhand ihrer Größe, sondern ihrer Basenpaar-Zusammensetzung und der daraus resultierenden Denaturierungseigenschaften aufgetrennt (Muyzer et al., 1993). Nach Extraktion der Gesamt-DNA einer Probe und der anschließenden Amplifikation eines bestimmten DNA-Bereichs werden die PCR-Amplifikate in einem Gel, welches einen ansteigenden Gradienten denaturierender Agenzien aufweist, separiert. Bei der Verwendung geeigneter DNA-Abschnitte kann jede Bande im Gel einer bestimmten Spezies zugeordnet werden. Renouf et al. (2006a) konnten mittels DGGE-Analyse eines Teilbereichs des *rpoB*-Gens die Entwicklung der Milchsäurebakterien-Population während der Fermentation verfolgen. Die variablen Bereiche der 16S rDNA scheinen ausreichende Unterschiede aufzuweisen, um zahlreiche Milchsäurebakterien auf Art-Ebene mit Hilfe der DGGE zu differenzieren (Lopez et al., 2003; Ecolini et al., 2001). Jedoch wurde in einigen Studien beschrieben, dass die Verwendung dieses Gens problematisch sein kann, da die rRNA-Operons in mehreren Kopien im Genom vorliegen (Dahllöf et al., 2000; Fogel et al., 1999).

Zum direkten Nachweis bestimmter Arten oder Gruppen von Mikroorganismen kann die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) angewandt werden. Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden, die komplementäre Bereiche zu Regionen der rRNA aufweisen, ermöglichen eine Identifizierung einzelner Mikroorganismen in einer Probe. Blasco et al. (2003) konnten 16S rRNA gerichtete FISH-Sonden zur Detektion einiger weinrelevanter Milchsäurebakterien-Arten entwickeln. Ebenso ist der Nachweis von Pediokokken in Most- und Weinproben mit Hilfe gruppenspezifischer Oligonukleotid-Sonden, die mit Regionen der 23S rRNA hybridisieren, möglich (Pfannebecker, 2008).

Zur Quantifizierung von Mikroorganismen während der Lebensmittelherstellung wird häufig die Realtime-PCR genutzt. Je nach Spezifität der hierbei verwendeten Primer kann das Wachstum der gesamten mikrobiellen Flora, bestimmter Bakteriengruppen oder auch einzelner Arten und Stämme verfolgt werden (Solieri & Giudici, 2010; Neeley et al., 2005; Pinzani et al., 2004). Um gezielt das Vorkommen von schadhaften Bakterien zu kontrollieren, ist es sinnvoll zur Realtime-PCR-Analyse Gene auszuwählen, die in direktem Zusammenhang mit unerwünschten Stoffwechseleigenschaften stehen. Unter Verwendung von Primern zur Amplifikation eines Teilbereichs des *dps*-Gens (Glucosyltransferase) konnten Delaherche et al. (2004) eine Realtime-PCR-basierte Methode zum Nachweis exopolysaccharidbildender *P. damnosus*-Stämme in Wein entwickeln. Die Quantifizierung von Milchsäurebakterien, die für die Produktion bestimmter biogener Amine wie Tyramin und Putrescin verantwortlich sind, kann

durch die Anwendung von Primern gegen Gene der Tyrosin-Decarboxylase (*tdc*), der Ornithin-Decarboxylase (*odc*) oder der Agmatin-Deiminase (*agdi*) erfolgen (Nannelli et al., 2008).

DNA-Fingerprint-Techniken wie die RAPD-PCR können zur Differenzierung weinrelevanter Milchsäurebakterien herangezogen werden, wobei hier teilweise sogar eine Unterscheidung einzelner Stämme möglich ist (Ruiz et al., 2008; Spano et al., 2002; Sohler et al., 1999). Die Differenzierung auf Stamm-Ebene ist im Bereich der Nahrungsmittelindustrie zur Sicherstellung der Qualität des Endproduktes erforderlich. Bei der Verwendung kommerzieller Starterkulturen muss die Identität eines bestimmten Stammes ebenfalls zweifelsfrei festgestellt werden können. Häufig wird beschrieben, dass die RAPD-PCR teilweise eine geringe Reproduzierbarkeit aufweist und die Ergebnisse stark von den Versuchsbedingungen abhängig sind (Mohania et al., 2008). In Anlehnung an die RAPD-PCR konnten Fröhlich & Pfannebecker (2007) ein speziesunabhängiges DNA-Fingerprintverfahren, die nested Specifically Amplified Polymorphic DNA (nSAPD)-PCR entwickeln. Ähnlich wie bei der RAPD-PCR werden kurze Primer mit einer Länge von 10 - 11 Nukleotiden verwendet, welche im Falle der nSPAD-PCR von der NotI-Erkennungssequenz abgeleitet wurden. Durch das Einführen einer sogenannten Rampe (langsame Temperaturerhöhung zwischen Annealing und Elongationsphase) im PCR-Zyklus konnte eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit erreicht werden (Pfannebecker, 2008). In der Regel ist es mit Hilfe der SAPD-PCR möglich, Isolate auf Art-Niveau zu identifizieren. Das entstandene PCR-Produkt kann jedoch in einer nested PCR mit leicht modifizierten Primern eingesetzt werden, wodurch stammspezifische Unterschiede deutlich werden (Fröhlich et al., 2009). Weitere Methoden, die die Differenzierung bakterieller Isolate auf Stamm-Ebene erlauben und bereits erfolgreich zur Typisierung weinrelevanter Milchsäurebakterien angewandt wurden, sind neben der RADP- und der multiplex RADP-PCR (Reguant & Bordons, 2003) beispielsweise die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Zapparoli et al., 2012; Larisika et al., 2008; Zapparoli et al., 2000) oder die Multigenanalyse (Bilhère et al., 2009; De las Rivas et al., 2004).

Die MALDI-TOF-MS-Analyse (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry) wurde wie die FTIR-Spektroskopie ursprünglich nicht zur Identifizierung von Mikroorganismen entwickelt. Allerdings hat man in den letzten Jahren das Potenzial dieser Methoden für diesen Anwendungsbereich entdeckt. Mittels MALDI-TOF-MS kann das Gesamt-Massenspektrum der Proteine einer Zelle untersucht werden, wobei charakteristische Spektren erzeugt werden. Diese können mit in einer Referenzdatenbank hinterlegten Spektren abgeglichen werden. Somit ist es möglich, ein unbekanntes Isolat zu identifizieren (Schubert & Wieser, 2010). Zur Diagnostik klinischer Isolate wird diese Methode bereits routinemäßig eingesetzt und die Anzahl der Studien, die sich mit einer Anwendung im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie beschäftigen, nimmt stetig zu (Seng et al., 2009).

Doan et al. (2012) und Dušková et al. (2012) konnten die MALDI-TOF-MS erfolgreich zur Differenzierung zahlreicher Milchsäurebakterien aus Nahrungsmitteln nutzen. Auch die FTIR-Spektroskopie konnte zur Identifizierung lebensmittelrelevanter Milchsäurebakterien angewandt werden (Samelis et al., 2011; Amiel et al., 2000).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifizierung und Differenzierung weinrelevanter Mikroorganismen.

Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit ist die Gattung *Saccharomyces*. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades, den die Spezies dieser Gattung zueinander aufweisen und der möglichen zwischenartlichen Hybridbildung ist eine eindeutige Identifizierung erschwert. Zur Differenzierung der *Saccharomyces*-Arten standen im Rahmen dieser Arbeit zwei etablierte Techniken, ein DNA-Fingerprintverfahren, die SAPD-PCR und eine RFLP-basierte Methode zur Analyse verschiedener genetischer Marker zur Verfügung. Von besonderem Interesse war hierbei die taxonomische Stellung der kürzlich beschriebenen Art *S. eubayanus* sowie die Charakterisierung eines potenziellen Hybrid-Stammes. Weiterhin sollte überprüft werden, inwieweit die MALDI-TOF-MS-Analyse zur Identifizierung dieser nah verwandten Arten genutzt werden kann. Ein zentraler Punkt war der Vergleich der verschiedenen Methoden im Hinblick auf ihre Eignung zur Differenzierung von Vertretern der Gattung *Saccharomyces*.

Neben den Hefen spielen auch die Milchsäurebakterien eine wesentliche Rolle bei der Weinbereitung. Da sie infolge ihrer Stoffwechselaktivität einen direkten Einfluss auf die Qualität des Weins haben können, ist eine Überwachung des bakteriellen Wachstums von großer Bedeutung. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Schnellidentifizierungsmethode zum qualitativen Nachweis häufiger weinassoziierter Milchsäurebakterien zu entwickeln. Mit Hilfe der nSAPD-PCR sollten artspezifische genetische Marker detektiert werden, um auf deren Basis spezifische Primer abzuleiten. Im Vordergrund stand dabei die Entwicklung eines Multiplex-PCR-Systems mit speziesspezifischen Primern, um einen simultanen Nachweis mehrerer Milchsäurebakterien-Arten zu ermöglichen. Zur Kontrolle der gesamten mikrobiellen Flora sowie zur Verfolgung der Sukzession während der Vinifikation kann die DGGE herangezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue DGGE-Primer auf der Grundlage des *rpoB*-Gens generiert und unter der Verwendung von Weinproben getestet.

Für einige Anwendungen im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie ist die Differenzierung einzelner Stämme erforderlich. Die nSAPD-PCR ist eine Methode, die eine ausreichende Sensitivität aufweist, um

stammspezifische Unterschiede festzustellen. Eine Fragestellung dieser Arbeit war, inwiefern sich die MALDI-TOF-MS-Analyse zur Differenzierung auf Stamm-Niveau heranziehen lässt. Verschiedene *O. oeni*-Stämme sollten mittels nSAPD-PCR und MALDI-TOF-MS analysiert werden, um die Ergebnisse beider Methoden miteinander vergleichen zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Materialien und Mikroorganismen

2.1.1 Chemikalien und Nährmedienbestandteile

Falls nicht anders vermerkt, wurden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Für das Ansetzen der Nährmedien wurden Pepton aus Fleisch sowie Pepton aus Casein (tryptisch verdaut) der Firma Roth (Karlsruhe), Fleischextrakt der Firma Merck (Darmstadt) und Hefeextrakt der Firma Marcor (New Jersey, USA) verwendet. Agar für Medien stammte entweder von Marcor (New Jersey, USA) oder Roth (Karlsruhe), zur Mikromanipulation wurde DIFCO Bacto-Agar (Becton, Dickinson & Co., Sparks, USA) verwendet. Für das Tomatensaft-Medium wurde Bio-Tomaten-Direktsaft von REWE (Köln) eingesetzt.

2.1.2 Biochemikalien, Kits und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Biochemikalien sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Biochemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose peqGold Standard-Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cylcoheximid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA-Standard GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
dNTP-Mix ¹	Peqlab (Erlangen)
Enhancer Solution P für PCR	Peqlab (Erlangen)
Magnesiumchlorid-Lösung für PCR	Peqlab (Erlangen)
Oligonukleotide	Eurofins MWG (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim)
PCR-Reaktionspuffer S (10x) ² / Y (10x) ³	Peqlab (Erlangen)
ROTIPURAN Low organic Wasser	Roth (Karlsruhe)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)

¹: 40 mM Gesamtkonzentration, 10 mM je Nukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

²: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 0,1 % Tween 20, 15 mM MgCl₂

³: 200 mM Tris-HCl (pH 8,55), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20, 20 mM MgCl₂

Verwendete Enzyme sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab 2.2: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Verwendete Enzyme	Hersteller
Restriktionsenzyme: HaeIII, HhaI, HinfI, MspI, ScrFI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich (Steinheim) oder Erbslöh (Geisenheim)
Lyticase aus <i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Taq-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	Peqlab (Erlangen)

Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die in der Arbeit verwendeten Kits.

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete Kits

Verwendete Kits	Hersteller
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Multiplex PCR Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Die in Tabelle 2.4 angegebenen Geräte und Hilfsmittel wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tab. 2.4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven: Certoclav	CertoClav Sterilizer GmbH (Traun, Österreich)
Systec VE40	Systec GmbH (Wettenberg)
Brutschrank	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
DGGE-System: D Gene System	Bio-Rad (München)
DNA/RNA UV-cleaner box	Biosan (Riga, Lettland)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Geldokumentationseinheit Biovision CN3000	Vilber-Lourmat (Eberhardzell)
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler: Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
S1000 Thermal Cyler	Bio-Rad (München)
Magnetrührer	IKA (Staufen)
Mikromanipulator	
Micromanipulateur de Fonbrune	Etablissements Beaudoin (Paris, Frankreich)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg); Starlab (Hamburg)
Mikroskop SM Lux	Leitz (Wetzlar)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
pH-Meter CG840	Schott (Mainz)
Reinstwasseranlagen: Milli-Q Plus 185	Millipore (Eschborn)
Millipore RiOs 30	Millipore (Eschborn)
Schüttler	Brunswick Scientific (Edison, USA)

Fortsetzung Tab. 2.4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Spannungsgeräte: Consort E122	Consort, Turnhout, Belgien
GPS 200/400	Pharmacia (heute GE Healthcare, München)
250V Power Supply	VWR International GmbH, Darmstadt
UV-Transilluminator FLX-20M	Vilber-Lourmat (Eberhardzell)
Vortex-Gerät: Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (New York, USA)
Waagen	Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen: Heraeus Biofuge Pico	Heraeus Christ (Osterode)
Cryofuge 5000	Heraeus Christ (Osterode)
Sigma 2-16K	SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode)

2.1.4 Wasser für molekularbiologische Arbeiten

Zur Durchführung molekularbiologischer Methoden wurde speziell behandeltes Wasser verwendet. Hierzu wurde der Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) sogenanntes MilliQ-Wasser entnommen und steril filtriert (Porengröße des Filters 0,2 µm). Nach UV-Bestrahlung für 1 h bei 254 nm wurde das Wasser autoklaviert und anschließend bei - 20 °C eingefroren. Für die SAPD-PCR wurde ROTIPURAN Low organic Wasser (Roth, Karlsruhe), welches ebenfalls nochmals mit UV-Strahlen behandelt wurde, verwendet.

2.1.5 Weinproben

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Weinproben (Tab. 2.5) handelte es sich um bereits durchgegorene Jungweine, die jedoch noch nicht geschwefelt waren. Die Probenahme erfolgte im November und Dezember 2011 bei Weingütern aus dem Weinbaugebiet Rheinhessen. Die Weinproben wurden im Weingut in sterile 50 ml-Kunststoffgefäße gefüllt und anschließend gekühlt transportiert. Die Extraktion der Gesamt-DNA aus den Proben erfolgte jeweils am Tag der Probenahme. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurde in der Regel am darauffolgenden Tag durchgeführt. Hierzu wurden die Weinproben über Nacht bei 4 °C gelagert.

Tab. 2.5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Weinproben

Nummer	Rebsorte (Fass)	Bemerkungen
1	Spätburgunder	Sektgrundwein; weiß ausgebaut; Lagerung bei 10 °C
2	Riesling (121)	
3	Riesling (113)	11 °Oechsle; Gärung steht seit 3 Wochen
4	Riesling (102)	
5	Riesling (46)	
6	Riesling (106)	
7	Riesling (63)	
8	Chardonnay	Barrique; weniger als 5 g Restzucker
9	Riesling (127)	
10	Spätburgunder	Barrique; rot ausgebaut; letzte Lese

Fortsetzung Tab. 2.5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Weinproben

Nummer	Rebsorte (Fass)	Bemerkungen
11	Weißburgunder (50)	
12	Riesling (62)	Stark verlangsamte Gärung
13	Riesling (123)	
14	Weißburgunder (55)	
15	Riesling (16)	
16	Silvaner (51)	
17	Riesling (47)	
18	Riesling	
19	Merlot	
20	Cabernet Dario	
21	Cabernet Sauvignon	

2-17: Kellertemperatur: 17 °C

2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in folgender Tabelle aufgeführt (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Sequenz und Funktion der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5' nach 3')	Verwendung
A-Not	AGCGGCCGCA	SAPD-PCR (Fröhlich & Pfannebecker, 2007)
C-Not	AGCGGCCGCC	
G-Not	AGCGGCCGCG	
T-Not	AGCGGCCGCT	
C-Not-A	AGCGGCCGCCA	Nested SAPD-PCR (Fröhlich & Pfannebecker, 2007)
C-Not-C	AGCGGCCGCCC	
C-Not-G	AGCGGCCGCCG	
C-Not-T	AGCGGCCGCCT	
M13F	GTAACACGACGGCCAG	Colony-PCR (pCR4-TOPO)
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	
		Artspezifisches Primerpaar (Primer-Mischung A) zum Multiplex-PCR-Nachweis von:
SCAR-OENI-F	GGTAGATTAACCCGCGACG	<i>Oenococcus oeni</i>
SCAR-OENI-R	GGAATCGGTAGCATCCTG	
SCAR-LBR-F	GGAAGATCAAGAATATCGGTG	<i>Lactobacillus brevis</i>
SCAR-LBR-R	GCGTCTCTAATTCCTGAGC	
SCAR-LPL-F	GAAGATTTGCCCATCGGTG	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SCAR-LPL-R	CGTTTGATGGTAGCGTTGC	
SCAR-LEU-F	GTGGTCATGGGTCTTAGC	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
SCAR-LEU-R	GGATCAAGACTAGCCAATGG	
SCAR-WPA-F	GCTGATGAACCCATACCTC	<i>Weissella paramesenteroides</i>
SCAR-WPA-R	GACCTGATTCGCTCGTTG	
SCAR-PDA-F	GTCTAAACTGGTGGTTAAACG	<i>Pediococcus damnosus</i>
SCAR-PDA-R	ATCGCACCTGGTTCAATGC	
SCAR-PPA-F	GCATGAATCACTTTTCGCTC	<i>Pediococcus parvulus</i>
SCAR-PPA-R	CAAAGATTGTGACCCAGTTG	

Fortsetzung Tab. 2.6: Sequenz und Funktion der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5' nach 3')	Verwendung
SCAR-LBU-F	CTATCTTTAACCGCATTGCCG	Artspezifisches Primerpaar (Primer-Mischung B) zum Multiplex-PCR-Nachweis von: <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Pediococcus inopinatus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
SCAR-LBU-R	GACACGCTTTCATGATTGTC	
SCAR-PAC-F	ATGATGGACAGACTCCCTG	
SCAR-PAC-R	CGAGCTGCGTAGATATGTC	
SCAR-LBH-F	TTCCTTGGTAATGTGCTTGC	
SCAR-LBH-R	AATGGCAATCGCAATGGACG	
SCAR-PIN-F	CTATCCTTACAATGTGCATCG	
SCAR-PIN-R	TGGTGCCTCAGTAAATGTAAG	
SCAR-LCU-F	CCAGATCCATCAGAAGATACG	
SCAR-LCU-R	GCTAACTTACCACTAACGACC	
SCAR-PPE-F	GGGAACGGTTTTAGTTTTATACG	Amplifikation der 16S rDNA
SCAR-PPE-R	CTAAGAGCGGTGATGATAAG	
PurEubak3	AGAAAGGAGGTGATCC	Amplifikation der ITS-Region der Hefen (White et al., 1990)
PurEubak5	AGAGTTTGATCMTGGCT	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	DGGE-Analyse
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
rpoB-F	CAACAATTGATTAATATTCGTCCAGT	
rpoB-R	TTAGGCGAAACGTCCATGTA	Amplifikation folgender Gene von <i>Saccharomyces</i> -Arten (González et al., 2006) <i>CAT8</i> (Zink-Cluster Transkriptionsaktivator) <i>CYR1</i> (Adenylat-Cyclase) <i>GSY1</i> (Glycogen-Synthase) <i>MET6</i> (Cobalamin-unabh. Methionin-Synthase) <i>OPY1</i> (unbekannte Funktion)
rpoB-R_GC	(GC-Klammer) ¹ TTAGGCGAAACGTCCATGTA	
CAT8-5	TCCAATATTAGTATCAACAACCTTTCTATAYCARAAYGA	
CAT8-3	CTACTTGGCRTTTTGCCAYTGRAA	
CYR1-5	CTACGAAGGAAAGTGTCTCTTTTRGTTCTGTTG	
CYR1-3	CCGTGTGTAGAATTTAGTGTAGAATTGACRGC	
GSY1-5	ATTGGAAAAGAATTTTCGAGCAYACRATGAG	
GSY1-3	AATTTCTTGCCACCGGCAAGGGTATTCATATT	
MET6-5	CTAGACCTGTCCTATTGGGTCCAGTTTCTTACTT	
MET6-3	TTAGCTTCTAGGGCAGCAGCAACRTCTTGACC	
MET6-3 K	GCGTTAGCTTCTAGAGCAGCAGTGACATTGC	
OPY1-5	CCGCGGACAACAGACCAYCATTAYTGGTGYGT	
OPY1-3	CTCTTGAAATTTATTATCCARTCCACCATRTCYTG	
COII-3	ATTTATTGTTCTTTAATCA	Amplifikation des <i>COX2</i> Gens (Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase) von <i>Saccharomyces</i> -Arten (Belloch et al., 2000)
COII-5	GGTATTTTAGAATTACATGA	

2.1.7 Nährmedien

MRS-Medium (DSMZ 11, modifiziert) zur Anzucht von Milchsäurebakterien

Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Fleischextrakt	2 g/l
Glucose	20 g/l
Tween80	1 ml/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Natriumacetat x 3 H ₂ O	5 g/l
di-Ammoniumhydrogencitrat	2 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g/l
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,05 g/l

Für Nährböden: Agar 15 g/l

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,2 eingestellt. Zur Hemmung des Hefewachstums wurde dem Medium bei Bedarf 670 mg/l Kaliumsorbat, sowie nach Autoklavieren und Abkühlen 20 mg/l Cycloheximid zugegeben.

AAB-Medium (DSMZ 989) zur Anzucht von Essigsäurebakterien

Pepton aus Fleisch	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Glucose	5 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/l

GYP-Medium (DSMZ 852, modifiziert) zur Anzucht von Hefen

Hefeextrakt	10 g/l
Pepton aus Fleisch	20 g/l
Glucose	20 g/l

Für Nährböden: Agar 15 g/l

LB-Medium (DSMZ 381) zur Anzucht von *Escherichia coli*

Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Für Nährböden: Agar 20 g/l

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden dem Medium X-Gal (Enkonzentration 40 µg/ml) und Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) steril zugegeben.

Tomatensaftmedium (DSMZ 59, modifiziert) zur Anzucht von *Oenococcus oeni*

Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	20 g/l
Pepton aus Fleisch	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Glucose	5 g/l
di-Ammoniumhydrogencitrat	3,5 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Tween 80	1 ml/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g/l
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,05 g/l
Tomatensaft (zentrifugiert)	250 ml/l

Für Nährböden: Agar 15 g/l

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 5,5 eingestellt. Um das Hefewachstum zu hemmen wurde dem Medium bei Bedarf 670 mg/l Kaliumsorbit, sowie nach Autoklavieren und Abkühlen 20 mg/l Cycloheximid zugegeben.

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisation bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

2.1.8 Mikroorganismen

Die verwendeten Bakterien-Stämme (Tab. 2.7) stammten aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW, Mainz) oder wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Weiterhin wurden einige Stämme im Rahmen dieser Arbeit aus Weinproben isoliert und in der institutseigenen Stammsammlung hinterlegt.

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme

Spezies	Stämme	Herkunft
<i>Acetobacter aceti</i>	DSM 3508 ^T	DSMZ
<i>Acetobacter cerevisiae/malorum</i>	B987, B988, B989, B990, B991, B992, B993, B994, B995, B996, B997	Diese Arbeit ¹
<i>Acetobacter malorum</i>	DSM 14337 ^T	DSMZ
<i>Acetobacter tropicalis</i>	DSM 15551 ^T	DSMZ
<i>Escherichia coli</i>	One Shot TOP10	Invitrogen (TOPO TA Cloning Kit)
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	DSM 5603 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054 ^T	DSMZ
	B18, B26, B37, B173, B184, B252, B253, B259, B260, B261, B262	IMW
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057 ^T	DSMZ
	B31, B32, B41, B54, B73	IMW
<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011 ^T	DSMZ

Fortsetzung Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme

Spezies	Stämme	Herkunft
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM 20019 ^T , DSM 20010, DSM 20495, DSM 20496	DSMZ
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	DSM 14421 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 20052 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 20203 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20176 ^T B146, B268, B271, B272, B706	DSMZ IMW
<i>Lactobacillus mali</i>	DSM 20444 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus nagelii</i>	DSM 13675 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus oeni</i>	DSM 19972 ^T	DSMZ
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	DSM 5987	DSMZ
<i>Lactobacillus paracasei</i>	B230	IMW
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174 ^T B35, B36, B102, B118, B137, B156, B157, B163, B164, B181, B182, B189, B193, B201, B227, B250	DSMZ IMW
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	B 1/2-15	IMW
<i>Lactobacillus vini</i>	DSM 20605 ^T	DSMZ
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20343 ^T , DSM 20346 ^T , DSM 20484 ^T B27, B29, B39, B113, B114, B117	DSMZ IMW
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20252 ^T (B139 ^T) B5, B64, B70, B232, B235, B236, B241, B243, B244, B246, B325, B350, B351, B352, B353, B354, B358, B359, B367, B377, B378, B417, B418 B971, B972, B973, B974, B975, B976, B977, B981, B978, B982, B979, B980, B983, B984, B985, B986	DSMZ IMW Diese Arbeit ¹
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM 20284 ^T , DSM 1056 B473, B702	DSMZ IMW
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331 ^T Hock B2.1, Hock B2.2, B7, B8, B9, B12, B14, B15, B16, B47, B68, B69, B78, B89, B91, B93, B97, B98, B99, B451, B452, B455, BPc260	DSMZ IMW
<i>Pediococcus inopinatus</i>	DSM 20285 ^T , DSM 20287	DSMZ

Tab. 2.9: In dieser Arbeit verwendete Hefe-Stämme

Spezies	Stämme	Herkunft
<i>Saccharomyces arboricola</i>	CBS 10644 ^T	CBS
<i>Saccharomyces bayanus</i>	DSM 70412 ^T CBS 395, CBS 7001	DSMZ CBS
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	CBS 8841T, CBS 5313 NCYC 2821	CBS NCYC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T 93 ¹ , 462 ²	DSMZ IMW
<i>Saccharomyces eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	CBS
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	CBS 8840 ^T NCYC 2969, NCYC 3494 727	CBS NCYC ISA
<i>Saccharomyces mikatae</i>	CBS 8839T, CBS 10522 NCYC 2970	CBS NCYC
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CBS 432 ^T 28 ³ , 35 ⁴	CBS IMW
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DSM 6580 ^T NCYC 396, NCYC 529	DSMZ NCYC
Hybrid-Stämme		
<i>S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii</i>	CBS 8614	CBS
<i>S. cerevisiae x kudriavzevii</i>	NCYC 3518 ⁵ , NCYC 3739 ⁵	NCYC

¹: hinterlegt als ATCC 48470; ²: hinterlegt als ATCC 42297; ³: hinterlegt als CBS 8112

⁴: hinterlegt als *S. cerevisiae* ATCC 48429, aktuelle Ergebnisse sprechen für eine Neuklassifizierung als *S. paradoxus*

⁵: in der Stammsammlung als *S. kudriavzevii* hinterlegt, aktuelle Ergebnisse sprechen für eine Neuklassifizierung als *S. cerevisiae x kudriavzevii*

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

IMW: Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz

ISA: Instituto Superior de Agronomia, Lissabon

NCYC: National Collection of Yeast Cultures, Norwich

^T: Typstamm

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung der Mikroorganismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Milchsäurebakterien wurden in MRS-Medium kultiviert. Eine Ausnahme bildeten hierbei die *O. oeni*-Stämme, deren Kultivierung in Tomatensaftmedium durchgeführt wurde. Flüssigmedien wurden mit 1 % Inokulum beimpft und anschließend bei 30 °C für zwei bis fünf Tage stehend inkubiert. Die Kultivierung von Essigsäurebakterien erfolgte unter Schütteln bei 30 °C für zwei bis drei Tage in AAB-Medium. Weiterhin wurden die verwendeten Hefe-Stämme bei 30 °C in GYP-Medium und die *E. coli*-Kulturen in LB-Medium bei 37 °C jeweils unter Schütteln über Nacht inkubiert.

Um Kulturen längerfristig aufzubewahren, wurden diese auf Schrägagar-Röhrchen ausgestrichen und nach dem Heranwachsen bei 4 °C gelagert. Alternativ hierzu wurden Zellen frisch gewachsener Kulturen in Medium, welches 20 % Glycerin enthielt, bei - 20 °C eingefroren. Die Lagerung der Kulturen in der institutseigenen Stammsammlung des IMW erfolgte bei - 75 °C in Medium mit 10 % Glycerin.

2.2.2 Bestimmung von koloniebildenden Einheiten

Zur Abschätzung des bakteriellen Titers der Weinproben (Tab. 2.5) wurden cycloheximid- und kaliumsorbathaltige Tomatensaft-Agar-Platten verwendet, um das Wachstum von Hefen zu unterdrücken. Zunächst wurde von jeder Probe eine dekadische Verdünnungsreihe in steriler NaCl-Lösung (0,9 %) bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} hergestellt. 100 µl jeder Verdünnungsstufe sowie der unverdünnten Probe wurden mit Hilfe eines Drigalskispatels ausplattiert. Anschließend wurden die Agar-Platten bei 30 °C inkubiert. Die Auszählung der gewachsenen Kolonien erfolgte nach einer Inkubationszeit von einer Woche.

2.2.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung bakterieller Zelltiters wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, die eine Kammertiefe von 0,02 mm aufwies, durchgeführt. Das Zählfeld der verwendeten Kammer bestand aus 16 Großquadraten (GQ), welche wiederum in 16 Kleinquadrate (KQ) mit einer Fläche von jeweils 0,0025 mm² unterteilt waren. Das Volumen über einem Kleinquadrat betrug folglich 5×10^{-5} mm³. Pro Probe wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt. Anhand der Mittelwerte der Zellen in einem Großquadrat konnte die Zellzahl pro ml folgendermaßen berechnet werden:

Mittelwert der Zellzahl pro GQ / 16 = Zellzahl pro KQ

Zellzahl pro KQ x 2×10^7 x Verdünnungsfaktor = Zellzahl/ml

2.2.4 Isolierung von Milchsäurebakterien aus Weinproben

Zur Isolierung von Milchsäurebakterien aus den Weinproben 1, 3, 5, 6 und 10 (Tab. 2.5) wurden die cycloheximidhaltigen Tomatensaft-Agar-Platten, welche zur KBE-Bestimmung dienten (Kap. 2.2.2), herangezogen. Von verschiedenen Verdünnungsstufen wurden Kolonien unterschiedlicher Morphologie gepickt und in Flüssigmedium überführt. Nach Möglichkeit wurden hierbei von jeder vorhandenen Kolonieform jeweils drei Kolonien ausgewählt. Nach Inkubation bei 30 °C wurden die gewachsenen Kulturen mit einer Impföse auf Agar-Platten vereinzelt. Angewachsene Kolonien wurden erneut in

Flüssigmedium überimpft. Die Vereinzelnung der Isolate wurde so lange durchgeführt bis die Kulturen aufgrund mikroskopischer Untersuchungen als rein erachtet wurden, jedoch mindestens dreimal wiederholt.

2.2.5 Vereinzelnung von Hefezellen mittels Mikromanipulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Mikromanipulation zur Vereinzelnung von Hefezellen verwendet. Diese Technik kam bei der Analyse von Hybrid-Stämmen zum Einsatz, um sicherzustellen, dass sich die untersuchten Kulturen nicht aus einer Mischung mehrerer Stämme oder Arten zusammensetzten. Der verwendete Mikromanipulator (Abb. 2.1A) basiert auf einer Entwicklung von Pierre de Fonbrune (US-Patentnummer 1987733 - 1987734).

Zunächst wurde DIFCO Bacto-Agar (3 % in H_2O_{deion}) angesetzt. Nach dem Aufkochen wurden jeweils 5 ml der Lösung in Reagenzgläser verteilt und autoklaviert. Gereinigte Objektträger wurden in 70 %-ige Ethanol-Lösung getaucht, abgeflammt und anschließend in sterile Petrischalen gelegt. Auf einer Platte, welche mittels Wasserwaage horizontal ausgerichtet wurde, wurden die Objektträger mit dem auf 50 °C abgekühlten Agar überschichtet. Die festgewordene Agar-Schicht wurde mit einem sterilen Skalpell zurechtgeschnitten (Abb. 2.1D). Anschließend wurde mit Hilfe einer Impföse am oberen Ende ein Impfstrich der Hefekultur aufgebracht. Zunächst wurde der Objektträger mit der Agar-Schicht nach unten auf dem Objektisch des Mikroskops eingespannt. Mit Hilfe eines pneumatischen Steuerteils ist es möglich, den Instrumententräger, an dem eine sehr fein ausgezogene Glaskapillare (Abb. 2.1B) angebracht wurde, zu betätigen. Durch Drehung am Steuerhebel lässt sich die Glaskapillare nach oben und unten bewegen. Positioniert man den Objektisch so, dass die Kapillare direkt neben einer Hefezelle zum Liegen kommt (Abb. 2.1C), kann man diese durch Bewegung des Objektischs separieren. Die Hefezelle „folgt“ der Glaskapillare hierbei aufgrund von Adhäsionskräften. Auf diese Weise wurden jeweils 5 - 6 Einzelzellen zum unteren Ende der Agar-Schicht gezogen. Der Agar wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells vom Objektträger gelöst und in eine Petrischale mit festem GYP-Medium überführt. Nach Inkubation bei 30 °C für zwei bis drei Tage konnte das Wachstum von Kolonien beobachtet werden (Abb. 2.1E). Diese wurden in Flüssigmedium überführt.

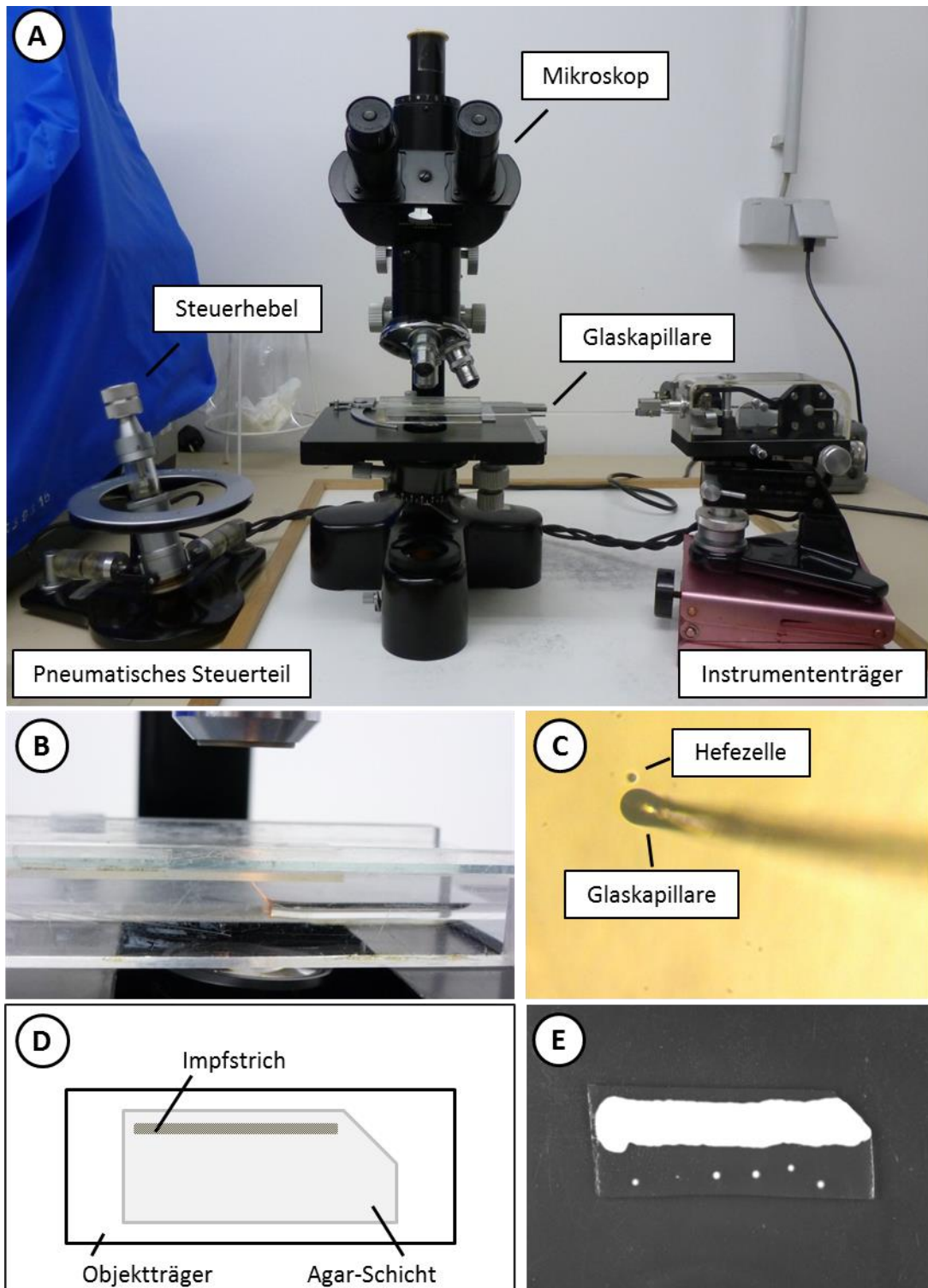


Abb. 2.1: Vereinzeln von Hefezellen mittels Mikromanipulator. Gezeigt ist der Aufbau der Apparatur (A) sowie eine vergrößerte Darstellung der fein ausgezogenen Glaskapillare (B), mit deren Hilfe einzelne Hefezellen (C) von einem Impfstrich am oberen Rand einer, auf einen Objektträger aufgebracht, Agar-Schicht (D) herausgezogen werden können. Nach Inkubation bei 30 °C wachsen die Einzelzellen nach wenigen Tagen zu Kolonien heran (E).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung

Zur Extraktion der DNA aus Bakterien und Hefen wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Bei dieser Methode wird die DNA nach erfolgter Zell-Lyse selektiv an eine Silica-Membran gebunden und kann nach mehreren Waschschritten wieder eluiert werden. Als Ausgangsmaterial dienten 10^8 - 10^9 Zellen, welche zunächst mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen wurden.

Die DNA-Isolierung der Bakterien erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers für grampositive Bakterien, jedoch wurde die Inkubation der Zellen in Lysepuffer sowie die Proteinase K-Behandlung für 60 min durchgeführt.

Um bakterielle Gesamt-DNA aus Most- und Weinproben zu extrahieren wurden 1 bis 10 ml Probe eingesetzt. Nach dem Waschen des Zellpellets mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung, erfolgte die DNA-Isolierung wie oben beschrieben. In einigen Fällen war es nötig, einen weiteren Reinigungsschritt durchzuführen, um potentielle PCR-Inhibitoren zu entfernen. Hierzu wurde die eluierte DNA mit dem zweifachen Volumen an Ethanol gefällt und erneut über ein DNeasy-Silica-Säulchen aufgereinigt.

Hefe-DNA wurde nach dem Zusatzprotokoll des Herstellers zur Aufreinigung von DNA aus Hefen isoliert. Die Inkubation der Zellen in Sorbitol-Puffer mit Lyticase erfolgte für 60 min. Die entstandenen Sphaeroplasten wurden für 3 h mit Proteinase K und Puffer ATL inkubiert.

Die DNA wurde in der Regel mit 150 μ l PCR-Wasser eluiert. Bei der Extraktion von DNA aus Most- und Weinproben und zur Ermittlung der Nachweisgrenze der Multiplex-PCR wurde das Elutionsvolumen auf 60 μ l reduziert, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Die extrahierte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.3.2 Entwicklung artspezifischer Primer mit Hilfe der SCAR-PCR-

Methode

Zur Generierung artspezifischer Primer für verschiedene weinrelevante Milchsäurebakterien wurde das Prinzip der Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)-PCR angewandt (Paran & Michelmore, 1993). Abb. 2.2 gibt einen Überblick über die Vorgehensweise dieser Technik. Die einzelnen Schritte sind in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

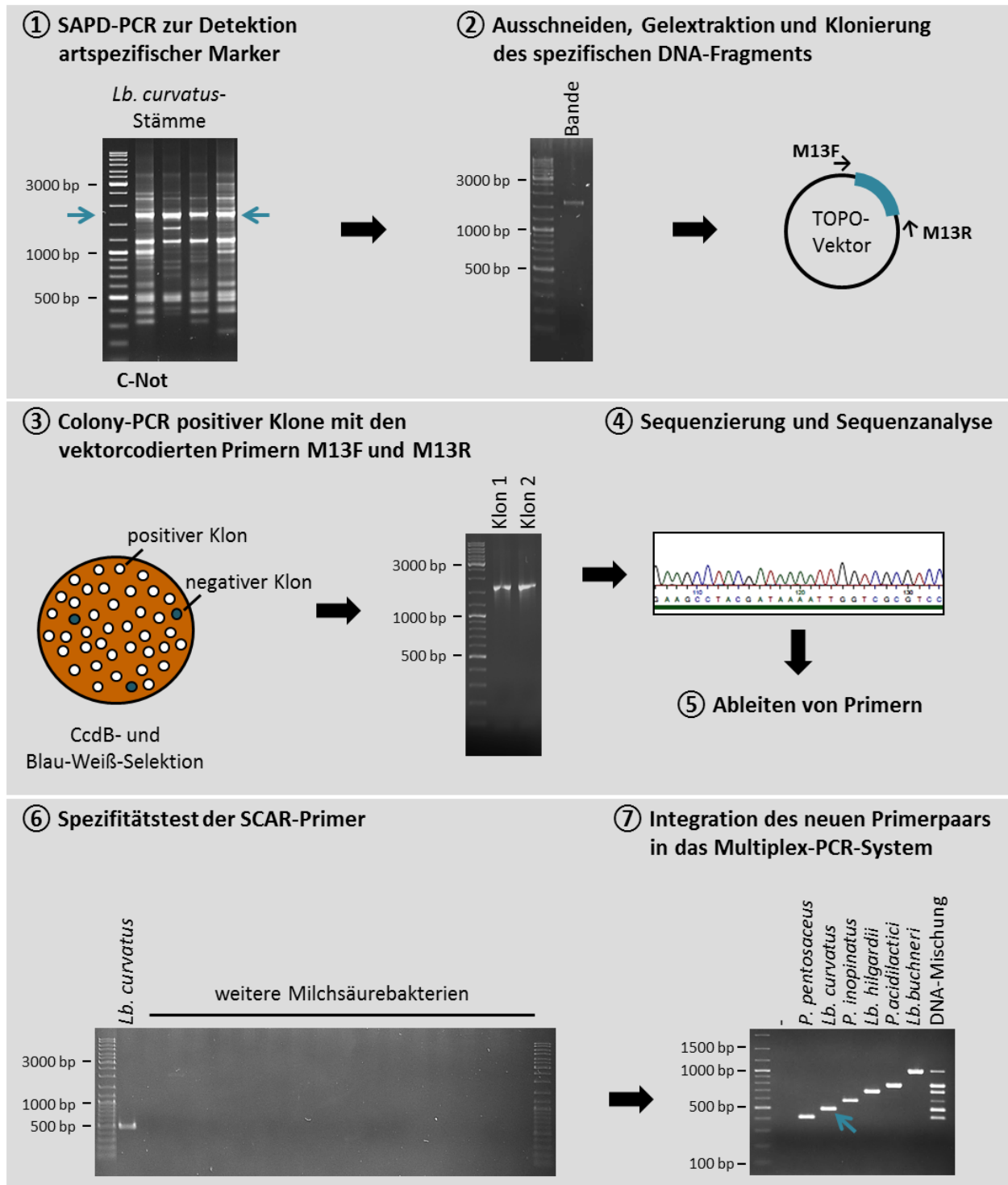


Abb. 2.2: Vorgehensweise bei der Entwicklung artspezifischer SCAR-Primer am Bsp. von *Lb. curvatus*. Mit Hilfe der SAPD-PCR wurde nach artspezifischen Markern gesucht ①. Geeignete DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert und nach der Ligation in einen TOPO-Vektor in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert ②. Mittels CcdB- und Blau-Weiß-Selektion konnten positive Klone, welche ein Insert im Vektor aufwiesen, detektiert werden. Diese wurden zur Colony-PCR herangezogen ③. Die entstandenen PCR-Amplifikate wurden anschließend sequenziert ④, um auf der Grundlage dieser DNA-Sequenz Primer abzuleiten ⑤. Die Primer wurden, durch die Verwendung der DNA zahlreicher Milchsäurebakterien-Stämme, einem Spezifitätstest unterzogen ⑥. Neu generierte Primer, die sich als artspezifisch herausstellten, konnten anschließend in das Multiplex-PCR-System integriert werden ⑦. (Abbildung verändert nach Pfannebecker, 2008).

2.3.3 PCR-Methoden

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), die der Amplifikation spezifischer DNA-Regionen dient, stellt heutzutage eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden dar. Seit ihrer Entwicklung in den 1980er Jahren (Saiki et al., 1988; Mullis et al., 1986) wurde diese Technik immer wieder modifiziert, wodurch sich stetig neue Anwendungsbereiche eröffneten.

2.3.3.1 Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA

Der 16S rDNA-Sequenzvergleich gilt als Standardmethode zur taxonomischen Einordnung bakterieller Isolate auf Art-Ebene. Die Amplifikation wurde in dieser Arbeit mit den Primern PurEubak5 und PurEubak3 (Tab. 2.6) durchgeführt. Diese sind komplementär zu Nukleotid-Bereichen am 5'- (Nukleotide 8-25) bzw. 3'-Ende (Nukleotide 1544-1529) des 16S rDNA-Gens von *E. coli*. Somit weist das erwartete PCR-Produkt eine Größe von etwa 1540 bp auf. In Tabelle 2.10 ist die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsansatzes wiedergegeben.

Tab. 2.10: Zusammensetzung eines 50 µl-Reaktionsansatzes zur 16S rDNA-PCR

Komponente (Konzentration)	Volumen
Forward-Primer: PurEubak5 (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer: PurEubak3 (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (40 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
PCR-Reaktionspuffer Y (10x)	5 µl
Enhancer Solution P (5x)	5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
PCR-Wasser	32,6 µl
Template-DNA	2 µl

Zur Amplifikation wurde das in Tabelle 2.11 dargestellte PCR-Programm verwendet.

Tab. 2.11: PCR-Programm zur Amplifikation der 16S rDNA

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Annealing	56 °C	1 min
4	Elongation	72 °C	1,5 min
5	35 Zyklen (Nr. 2 - 4)		
6	Finale Elongation	72 °C	10 min

2.3.3.2 Amplifikation der ITS-Region von Hefen

Um Hefe-Stämme taxonomisch einzuordnen, wurde die 5,8S rDNA mit ihren flankierenden ITS-Regionen herangezogen. Zur Amplifikation dieses DNA-Abschnitts wurden die Primer ITS1 und ITS4 (Tab. 2.6) verwendet, die am 3'-Ende der 18S rDNA bzw. am 5'-Ende der 26S rDNA binden (Abb. 2.3).

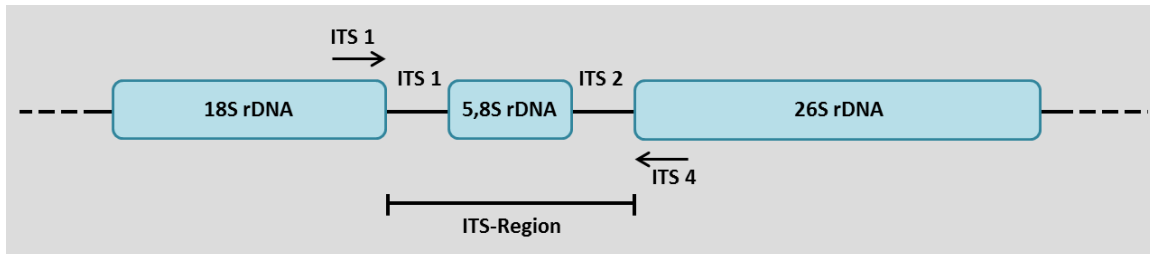


Abb. 2.3: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des repetitiven ribosomalen Genclusters in Eukaryoten. Die Pfeile markieren die Bindestellen der Primer ITS1 und ITS4 (White et al., 1990). Nicht dargestellt ist das Gen der 5S rDNA, welches in *S. cerevisiae* vom Gegenstrang kodiert wird, sowie die intergenen Regionen (IGR).

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes entsprach dem der 16S rDNA-PCR (Tab. 2.10). Die Amplifikation wurde unter den in Tab. 2.11 dargestellten Bedingungen durchgeführt, mit der Ausnahme, dass das Annealing der Primer bei 55 °C und die Elongation für 1 min erfolgte.

2.3.3.3 Nested Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR

Die nested Specifically Amplified Polymorphic DNA (nSAPD)-PCR ist ein von Fröhlich und Pfannebecker (2007) entwickeltes speziesunabhängiges DNA-Fingerprint-Verfahren, welches zur Ermittlung genetischer Ähnlichkeiten herangezogen werden kann. In einer ersten PCR ist es möglich Organismen auf Art-Ebene zu differenzieren, wohingegen bei der Durchführung einer nested PCR stammspezifische Unterschiede deutlich werden.

SAPD-PCR

Die bei der SAPD-PCR verwendeten Primer A-Not, C-Not, G-Not und T-Not (Tab. 2.6) sind von der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym NotI (GCGGCCGC) abgeleitet und wurden jeweils in getrennten PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Reaktionsansätze (Tab. 2.12) hatten ein Gesamtvolumen von 25 µl. Die SAPD-PCR wurde in 200 µl-Reaktionsgefäßen (Multi-Ultra PCR-Tubes; Roth, Karlsruhe) durchgeführt, da diese durch ihre dünne Wand einen schnellen und gleichmäßigen Wärmetransfer ermöglichen. Für den Fall, dass das PCR-Produkt der SAPD-PCR in einer nested PCR eingesetzt werden sollte, wurde anstelle des normalen PCR-Wassers, UV-behandeltes ROTIPURAN Low organic Wasser (Roth, Karlsruhe) verwendet. Weiterhin wurden die Pipetten, die Reaktionsgefäße sowie die PCR-

Reagenzien, mit Ausnahme der *Taq*-Polymerase, für 60 min in einer DNA/RNA UV-cleaner Box (Biosan, Riga, Lettland) bestrahlt, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Die SAPD-PCR wurde mit Filterspitzen angesetzt und die kompletten Reaktionsansätze wurden vor Zugabe der Template-DNA für 5 min auf Eis mit UV-Licht behandelt.

Tab. 2.12: Zusammensetzung der SAPD-PCR

Komponente (Konzentration)	Volumen
Primer (50 µM)	1 µl
dNTP-Mix (40 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
PCR-Reaktionspuffer Y (10x)	2,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
PCR-Wasser	13,3 µl
Template-DNA	5 µl

Die Einführung zweier Temperaturrampen zwischen Annealing- und Elongationsphase (Tab. 2.13, Schritt 4 bis 8) im PCR-Programm der SAPD-PCR, führte zu einer verbesserten Bindung der Primer an die DNA (Pfannebecker, 2008).

Tab. 2.13: Bedingungen zur Durchführung der SAPD-PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Annealing	35 °C	1 min
4	Rampe	35 °C (+ 0,5 °C)	12 sec
5	15 Zyklen (Nr. 4)		
6	Annealing	42,5 °C	1 min
7	Rampe	42,5 °C (+ 1,5 °C)	12 sec
8	19 Zyklen (Nr. 7)		
9	Elongation	72 °C	5 min
10	35 Zyklen (Nr. 2 - 9)		
11	Finale Elongation	72 °C	10 min

Nested SAPD-PCR

Bei der nested SAPD-PCR wurden Primer verwendet, die ein zusätzliches Nukleotid am 3'-Ende tragen. So konnte z.B. das Produkt der SAPD-PCR mit dem Primer C-Not in einer zweiten PCR mit den Primern C-Not-A, -C, -G oder -T (Tab. 2.6) eingesetzt werden. Die Zusammensetzung des nested SAPD-PCR-Ansatzes entsprach dem der SAPD-PCR mit der Ausnahme, dass 2,5 µl Enhancer Solution P zugegeben wurden. Als Template diente 1 µl des Amplifikationsprodukts der ersten PCR; die Menge des PCR-Wassers wurde so angepasst, dass das Gesamtvolumen 25 µl betrug. Die Reaktionsbedingungen der nested SAPD-PCR können Tabelle 2.14 entnommen werden.

Tab. 2.14: PCR-Programm der nested SAPD-PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Annealing		1 min
	Primer: A-Not-A,-C,-G,-T / T-Not- A,-C,-G,-T	39 °C	
	Primer: C-Not- A,-C,-G,-T / G-Not- A,-C,-G,-T	41 °C	
4	Elongation	72 °C	5 min
5	35 Zyklen (Nr. 2 - 4)		
6	Finale Elongation	72 °C	10 min

2.3.3.4 Colony-PCR transformierter *Escherichia coli*-Zellen

Mit Hilfe der Colony-PCR wurden klonierte DNA-Fragmente, unter Verwendung der vektorkodierten Primer M13F und M13R (Tab. 2.6), amplifiziert. Hierzu wurden über Nacht gewachsene Kolonien transformierter One Shot TOP10 *E. coli*-Zellen in 50 µl PCR-Wasser resuspendiert. Von dieser Zellsuspension dienten 2 µl als Template für den Colony-PCR-Ansatz (Tab. 2.15).

Tab. 2.15: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Colony-PCR

Komponente (Konzentration)	Volumen
Forward-Primer: M13F (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer: M13R (10 µM)	1 µl
dNTP-Mix (40 mM)	1 µl
PCR-Reaktionspuffer Y (10x)	5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
PCR-Wasser	39,8 µl
Zellsuspension	2 µl

Vor dem eigentlichen PCR-Programm wurde ein 15 minütiger Schritt bei 95 °C eingeführt, um die Zellen zu lysieren und somit die DNA für die Amplifikation zugänglich zu machen. Die PCR-Bedingungen waren ähnlich der 16S rDNA-PCR (Tab. 2.11). Die Annealingtemperatur wurde auf 58 °C erhöht und die Elongationszeit wurde jeweils in Abhängigkeit der Größe des klonierten Fragmentes gewählt, wobei von einer Syntheserate der *Taq*-DNA-Polymerase von 1000 bp/min ausgegangen wurde.

2.3.3.5 Sequence Characterized Amplified Region-PCR zur Überprüfung der

Primerspezifität

Die anhand spezifischer SAPD-PCR-Fragmente abgeleiteten SCAR-Primer wurden auf ihre Spezifität hin untersucht. Hierzu wurde die DNA vieler verschiedener Milchsäurebakterien-, einiger Essigsäurebakterien-Arten sowie von *S. cerevisiae* als Template verwendet. Die Zusammensetzung eines SCAR-PCR-Ansatzes kann Tab. 2.16 entnommen werden.

Tab. 2.16: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur SCAR-PCR

Komponente (Konzentration)	Volumen
Forward-Primer (10 µM)	0,5 µl
Reverse-Primer (10 µM)	0,5 µl
dNTP-Mix (40 mM)	0,5 µl
PCR-Reaktionspuffer S (10x)	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
PCR-Wasser	19,8 µl
Template-DNA	1 µl

Das PCR-Programm der SCAR-PCR ist in Tab. 2.17 dargestellt.

Tab. 2.17: PCR-Programm zur Durchführung der SCAR-PCR

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	0,5 min
3	Annealing	69 °C (- 1°C) ¹	0,5 min
4	Elongation	72 °C	1 min
5	6 Zyklen (Nr. 2 - 4)		
6	Denaturierung	94 °C	5 min
7	Annealing	62 °C	0,5 min
8	Elongation	72 °C	1 min
9	22 Zyklen (Nr. 6 - 8)		
10	Finale Elongation	72 °C	5 min

¹: Abnahme der Temperatur in jedem Zyklus um 1 °C

2.3.3.6 Multiplex-PCR

Auf der Grundlage der im Rahmen dieser sowie einer vorhergehenden Arbeit (Pfannebecker, 2008) generierten SCAR-Primer (Tab. 2.6) wurde ein Multiplex-PCR-System zum Nachweis von 13 verschiedenen Milchsäurebakterien-Arten entwickelt. Hierzu wurden die artspezifischen Primerpaare in zwei Primer-Mischungen (Tab. 2.18) aufgeteilt, welche in getrennten Reaktionsansätzen eingesetzt wurden.

Tab. 2.18: Zusammensetzung der Primer-Mischungen A und B für die Multiplex-PCR

Primer-Mischung A		Primer-Mischung B	
SCAR-Primer ^a	Konzentration ^b	SCAR-Primer ^a	Konzentration ^b
SCAR-OENI-F	3 µM	SCAR-LBU-F	3 µM
SCAR-OENI-R	3 µM	SCAR-LBU-R	3 µM
SCAR-LBR-F	3 µM	SCAR-PAC-F	2 µM
SCAR-LBR-R	3 µM	SCAR-PAC-R	2 µM
SCAR-LPL-F	2 µM	SCAR-LBH-F	2 µM
SCAR-LPL-R	2 µM	SCAR-LBH-R	2 µM
SCAR-LEU-F	2 µM	SCAR-PIN-F	2 µM
SCAR-LEU-R	2 µM	SCAR-PIN-R	2 µM

Fortsetzung Tab. 2.18: Zusammensetzung der Primer-Mischungen A und B für die Multiplex-PCR

Primer-Mischung A		Primer-Mischung B	
SCAR-Primer ^a	Konzentration ^b	SCAR-Primer ^a	Konzentration ^b
SCAR-WPA-F	2 µM	SCAR-LCU-F	2 µM
SCAR-WPA-R	2 µM	SCAR-LCU-R	2 µM
SCAR-PDA-F	2 µM	SCAR-PPE-F	2 µM
SCAR-PDA-R	2 µM	SCAR-PPE-R	2 µM
SCAR-PPA-F	2 µM		
SCAR-PPA-R	2 µM		

^a: vergl. Tabelle 2.6

^b: angegeben ist jeweils die Konzentration der Primer im 10x Primer-Mischungen

Zur Durchführung der Multiplex-PCR wurde das Multiplex PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

Die Zusammensetzung der beiden Reaktionsansätze ist in Tab. 2.19 dargestellt.

Tab. 2.19: Zusammensetzung der beiden Multiplex-PCR-Reaktionsansätze

Komponente (Konzentration)	Volumen	
	Reaktionsansatz A	Reaktionsansatz B
Multiplex PCR Mastermix (2x)	12,5 µl	12,5 µl
Primer-Mischung (10x)	2,5 µl	2,5 µl
Q-Solution (5x)	-	2,5 µl
Template-DNA ¹	1 µl - 5 µl	1 µl - 5 µl
PCR-Wasser	ad 25 µl	ad 25 µl

¹: Bei der Verwendung von DNA aus Kulturen wurde 1 µl als Template eingesetzt, bei Gesamt-DNA-Extrakten aus Most- und Weinproben wurde das Volumen auf 5 µl erhöht

Zur Kontrolle und besseren Auswertung wurde bei der Multiplex-PCR eine DNA-Mischung mitgeführt. Diese enthielt die extrahierte DNA der folgenden 13 Milchsäurebakterien-Typstämme in gleichen Volumen-Anteilen: *Lb. brevis* DSM 20054^T, *Lb. buchneri* DSM 20057^T, *Lb. curvatus* DSM 20019^T, *Lb. hilgardii* DSM 20176^T, *Lb. plantarum* DSM 20174^T, *Lc. mesenteroides* DSM 20343^T, *O. oeni* DSM 20252^T, *P. acidilactici* DSM 20284^T, *P. damnosus* DSM 20331^T, *P. inopinatus* DSM 20285^T, *P. parvulus* DSM 20332^T, *P. pentosaceus* DSM 20336^T und *W. paramesenteroides* DSM 20288^T. Ein Volumen von 1 µl reichte hierbei als Template für die Multiplex-PCR aus.

Die Amplifikation erfolgte nach dem in Tab. 2.17 angegebenen PCR-Programm, wobei die initiale Denaturierung für 15 min durchgeführt wurde, da in dem Multiplex PCR Kit eine HotStarTaq-DNA Polymerase enthalten ist. Auch die zeitliche Dauer der anderen Schritte wurde verlängert: das Annealing der Primer wurde auf 3 min, die Elongation auf 1,5 min sowie die finale Elongation auf 10 min ausgedehnt.

2.3.3.7 PCR zur Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese

Zur anschließenden Analyse mittels DGGE wurde ein Teilbereich des bakteriellen *rpoB*-Gens unter Verwendung der Primer *rpoB*-F und *rpoB*-R_GC (Tab. 2.6) amplifiziert. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes war identisch zu dem der 16S rDNA-PCR (Tab. 2.10). Die in Tabelle 2.11 dargestellten PCR-Bedingungen wurden leicht modifiziert. Die Annealingtemperatur wurde auf 48 °C herabgesetzt, die Elongationszeit auf 1 min verkürzt und die Gesamt-Zyklenzahl auf 40 erhöht.

2.3.3.8 Reamplifikation von DNA-Fragmenten aus der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese

Um Sequenzinformationen von DGGE-Banden zu erhalten, müssen diese zunächst reamplifiziert werden. Hierzu wurden die Primer *rpoB*-F und *rpoB*-R (Tab. 2.6) verwendet. Der Reverse-Primer *rpoB*-R besitzt die gleiche Sequenz wie der DGGE-Primer *rpoB*-R_GC mit dem Unterschied, dass dieser keine GC-Klammer aufweist. Die GC-Klammer kann die Amplifikation behindern und auch zu Problemen bei der Sequenzierung führen. Die gewählten PCR-Bedingungen und auch die Zusammensetzung der Reaktionsansätze entsprach denen der PCR für die DGGE (Kap. 2.3.3.7).

2.3.3.9 Amplifikation verschiedener genetischer Marker von *Saccharomyces*-Arten

Zur Amplifikation von Teilbereichen der Gene *CAT8*, *CYR1*, *GSY1*, *MET6* und *OPY1* (Tab. 2.6) verschiedener *Saccharomyces*-Stämme wurden die von González et al. (2006) generierten Primer herangezogen. Die Primer wurden nach der jeweils zu amplifizierenden Genregion benannt und sind in Tab. 2.6 aufgeführt. Mit einer Ausnahme sind alle Primer universell auf Hefen der Gattung *Saccharomyces* anwendbar. Zur Amplifikation des *MET6*-Genabschnitts in *S. kudriavzevii* ist der spezifische Reverse-Primer MET6-3 K notwendig. Mittels Analyse des mitochondrialen Gens *COX2* wurden Hybrid-Stämme genauer charakterisiert. Hierzu wurde das Primerpaar COII-3/COII-5 (Belloch et al., 2000; Tab. 2.6) verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze entspricht dem der 16S rDNA-PCR (Tab. 2.10), mit dem Unterschied, dass hier der PCR-Reaktionspuffer S verwendet wurde. Die Reaktionsbedingungen können Tabelle 2.20 entnommen werden.

Tab. 2.20: PCR-Programme zur Amplifikation verschiedener genetischer Marker in Saccharomyceten

Nr.	Reaktionsschritt	Amplifikation von <i>CAT8</i> , <i>CYR1</i> , <i>GSY1</i> , <i>MET6</i> und <i>OPY1</i>		Amplifikation von <i>COX2</i>	
		Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	95 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min	94 °C	1 min
3	Annealing	55,5 °C	2 min	40 °C	1 min
4	Elongation	72 °C	2 min	72 °C	1 min
5	40 Zyklen (Nr. 2 - 4)				
6	Finale Elongation	72 °C	10 min	72 °C	10 min

2.3.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Die RFLP-Analyse diente im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung von Teilregionen der Gene *CAT8*, *CYR1*, *GSY1*, *MET6* und *OPY1* (Tab. 2.6). Mit Hilfe eines von González et al. (2006) entwickelten Systems, bei dem die genetischen Marker mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut werden (Tab. 2.21), können Stämme der Gattung *Saccharomyces* charakterisiert werden.

Tab. 2.21: RFPL-Analysen zur Charakterisierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces*

Genregion ^a	Verwendete Restriktionsenzyme
<i>CAT8</i>	HhaI ¹ , MspI
<i>CYR1</i>	HaeIII, MspI
<i>GSY1</i>	MspI
<i>MET6</i>	ScrFI, HaeIII, HinfI
<i>OPY1</i>	HaeIII, ScrFI

^a: vergl. Tab. 2.6

¹: anstelle des von González et al. (2006) verwendeten Enzyms CfoI wurde das Isoschizomer HhaI herangezogen

Der Ansatz einer Restriktionsreaktion setzte sich aus 15 µl PCR-Produkt, 0,3 µl des jeweiligen Restriktionsenzym, 2,7 µl PCR-Wasser und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen Puffers (Tango Buffer (10x) für HhaI und MspI, Buffer R (10x) für HaeIII, Buffer O (10x) für ScrFI und Fast Digest Green Buffer (10x) für HinfI) zusammen. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei der verwendeten Restriktionsendonuklease HinfI handelte es sich um ein sogenanntes FastDigest-Enzym, daher wurden die Ansätze mit diesem Enzym für 30 min bei 37 °C restringiert und anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Im Anschluss wurden die Restriktionsansätze entweder direkt mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet oder bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten angewandt. Hierzu wurde Agarose in TBE-Puffer (TRIS 10,8 g/l, Borsäure 5,5 g/l, EDTA-Na₂ 0,82 g/l) durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen in einen Gelträger mit eingesetztem Taschenformer gegossen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Taschenformer herausgezogen und das Gel in eine, mit TBE-Puffer gefüllte, Elektrophorese-Kammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Tab. 2.22) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard wurden 5 µl GeneRuler DNA Ladder Mix aufgetragen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt.

Tab. 2.22: Zusammensetzung des DNA-Ladepuffers

Komponente (Konzentration)	Menge
TRIS/HCl, pH 8 (1M)	3,2 ml
Glycerin (100 %)	3,5 ml
H ₂ O _{deion}	2,5 ml
Bromphenolblau	2,5 mg

Für Kontrollgele zur Überprüfung von PCR-Produkten wurden in der Regel je 5 µl Probe und 1 %-ige Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100 - 120 V. Zur Auswertung der Bandenmuster der SAPD- und nested SAPD-PCR wurden 1,5 %-ige Gel nach dem Aufkochen mit 0,035 % Natronwasserglas versetzt, um eine bessere Schärfe einzelner Gelbanden zu erhalten. Sollten aus dem Gel Banden extrahiert werden, wurde kein Natronwasserglas zugegeben. Ein Volumen von 7 µl der (nested) SAPD-PCR-Ansätze wurde auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 55 V aufgetrennt. Zur Analyse der Multiplex-PCR wurden 1,5 %-ige Gele verwendet; die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Um RFLP-Ansätze auszuwerten, wurden 2 %-ige Agarose-Gele mit dem kompletten Restriktionsverdau (20 µl) beladen und die entstandenen DNA-Fragmente bei 80 V aufgetrennt.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele für 20 - 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (2 mg/l) gefärbt und danach in einer Geldokumentationseinheit (BioVison CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell) unter UV-Licht fotografiert.

2.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion

Für einige Anwendungen war eine Aufreinigung der PCR-Produkte nötig, um potentiell störende Rückstände aus dem PCR-Ansatz, wie Primer und Nukleotide, zu entfernen. Die PCR-Aufreinigung wurde entweder mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder dem

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit 30 µl PCR-Wasser eluiert.

Mit Hilfe der Gelextraktion ist es möglich einzelne DNA-Fragmente aus einem Gemisch von PCR-Produkten zu isolieren. Hierzu wurden die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und unter Verwendung von schwachem UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus diesem ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) laut Angaben des Herstellers, wobei zur Elution der DNA 20 µl PCR-Wasser verwendet wurden.

2.3.7 Klonierung

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe), in dem neben dem Vektor pCR4-TOPO auch chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes One Shot TOP10 enthalten waren, verwendet. In dieser Arbeit wurden spezifische SAPD-PCR-Banden in den TOPO-Vektor kloniert, um diese später sequenzieren zu können. Der linearisierte Plasmidvektor verfügt an seinen Enden über 3'-Desoxythymidin-Überhänge und eignet sich daher zur Klonierung von DNA-Fragmenten, welche durch die *Taq*-DNA-Polymerase synthetisierte 3'-Desoxyadenosin-Überhänge aufweisen. Da die SAPD-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt wurde, war keine weitere Vorbehandlung des PCR-Produkts nötig.

Für eine TOPO-Ligationsreaktion wurden in der Regel 4 µl der frisch aufgereinigten Gelbande mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und 1 µl pCR4-TOPO gemischt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente der Ausbildung der Phosphodiesterbindung zwischen Vektor und Insert, welche durch die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I katalysiert wird. Von diesem Ligationsansatz wurden 2 µl zur Transformation verwendet und der Rest bei - 20 °C eingefroren.

Zur Transformation wurde ein Aliquot chemisch-kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein kurzer Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C, nach welchem die Zellen nochmals kurz auf Eis gelagert wurden. Dem Transformationsansatz wurden 250 µl S.O.C.-Medium zugegeben und die Zellen für 40 - 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl und 200 µl des Transformationsansatzes auf vorgewärmten Ampicillin- und X-Gal-haltigen LB-Platten ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Mittels CcdB- und Blau-Weiß-Selektion konnten positive Klone detektiert werden, welche zur Colony-PCR herangezogen wurden.

2.3.8 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und LGC Genomics GmbH (Berlin) durchgeführt. Hierzu wurden die aufgereinigten DNA-Fragmente mit den jeweiligen Sequenzierprimern eingesandt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden in digitaler Form zur Verfügung gestellt.

2.3.9 Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der DGGE werden DNA-Fragmente nicht wie bei der Agarose-Gelelektrophorese aufgrund ihrer Größe, sondern ihrer Nukleotid-Zusammensetzung aufgetrennt. Die hierzu verwendeten Polyacrylamid-Gele besitzen einen ansteigenden Gradienten denaturierender Substanzen (Formamid und Harnstoff), die ein Aufschmelzen der DNA-Fragmente während des Laufs durch das Gel bewirken. Hierbei bilden sich sogenannte Schmelzdomänen aus, welche in Abhängigkeit von ihrer Sequenz unterschiedliches Schmelzverhalten aufweisen. Diese teilweise denaturierten DNA-Fragmente zeigen bei der Elektrophorese ein verlangsamtes Laufverhalten (Mülhardt, 2009). Die PCR zur DGGE wurde wie in Kap. 2.3.3.7 beschrieben durchgeführt. Der verwendete Reverse-Primer rpoB-R_GC weist am 5'-Ende eine GC-reiche Region (GC-Klammer) auf. Das Anhängen einer solchen Region mit hoher Schmelztemperatur an PCR-Produkte bewirkt, dass die beiden DNA-Stränge zusammengehalten werden, während andere Bereiche aufschmelzen, wodurch letztendlich die Sensitivität der DGGE verbessert wird (Sheffield et al., 1989).

Zur DGGE wurde das D Gene Denaturing Gel Electrophoresis System der Firma Bio-Rad (München) genutzt. Zur Auftrennung der in dieser Arbeit gewählten DNA-Region erwies sich ein denaturierender Gradient von 25 % - 50 % als geeignet. Um ein Gradienten-Gel zu gießen, wurden zunächst zwei Glasplatten nach gründlicher Reinigung mit 70 % Ethanol in eine Gelgießapparatur eingespannt. Anschließend wurden zwei Lösungen mit unterschiedlicher Harnstoff- und Formamidkonzentration hergestellt, wobei Lösung A eine niedrigere Konzentration denaturierender Agenzien aufwies als Lösung B (Tab. 2.23).

Die beiden Lösungen wurden in zwei Kammern eines Gradientenmischers gefüllt (Abb. 2.4A), der über einem Magnetrührer angebracht wurde. Der Schlauch, der beide Kammern miteinander verbindet, sowie der Schlauch der zum Gelgießstand (Abb. 2.4B) führt waren zunächst durch eine Klemme verschlossen. Kurz vor dem Gießen des Gels wurden beiden Lösungen 90 µl APS (1 M) und 5 µl TEMED zugegeben.

Tab. 2.23: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung eines DGGE-Gels

Komponente	Endkonzentration	Eingesetzte Menge	
		Lösung A (25 %)	Lösung B (50 %)
H ₂ O _{deion}	-	9,0 ml	6,5 ml
40% Acrylamid ¹	8 %	3,0 ml	3,0 ml
50x TAE-Puffer ²	1x	0,3 ml	0,3 ml
Harnstoff	variabel	1,6 g	3,1 g
Formamid	variabel	1,5 ml	3,0 ml
Glycerin	2 %	0,3 ml	0,3 ml

¹: Acrylamid/Bisacrylamid (37:1) (Roth, Karlsruhe)

²: 50x TAE: TRIS 242 g/l, Essigsäure 57,1 ml/l, EDTA (0,5 M, pH8) 100 ml/l

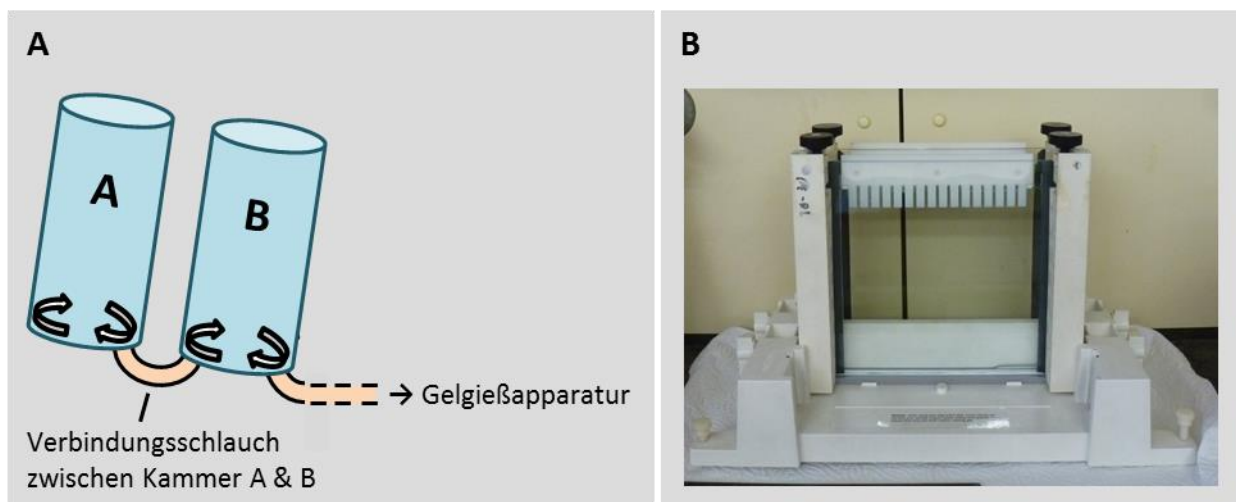


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Gradientenmischers (A) und Fotografie des Gelgießstandes (B).

Anschließend wurden die beiden Klemmen gleichzeitig geöffnet. Unter ständigem Rühren lief Lösung A langsam in die Kammer mit Lösung B, welche dadurch konstant verdünnt wurde. Das Gemisch aus Kammer B wurde gleichzeitig über den zweiten Schlauch zum Gelgießstand geleitet und gleichmäßig zwischen zwei Glasplatten gegossen, bis deren Oberkante erreicht war. Danach wurde vorsichtig ein Taschenformer zwischen die Glasplatten eingesetzt. Das Auspolymerisieren der Gele erfolgte meist über Nacht oder mindestens für 3 h. Die vollständig polymerisierten Gele wurden in die Halterung des DGGE-Geräts gespannt und der Taschenformer wurde entfernt. Die mit TAE-Puffer (1x) befüllte DGGE-Kammer wurde vorgeheizt. Anschließend konnten die Gele in die Elektrophoresekammer gesetzt werden. Nach gründlichem Spülen der Taschen mit TAE-Puffer wurde das Gel beladen. Hierzu wurden 10 - 20 µl PCR-Produkt mit DNA-Ladepuffer (Tab. 2.22) gemischt und unter Verwendung einer fein ausgezogenen Pipettenspitze in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 60 °C und einer Spannung von 145 V für 5 - 6 h

durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel aus der Apparatur entfernt und für etwa 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad (2 mg/l) gefärbt und danach unter UV-Licht dokumentiert.

2.4 Bioinformatische Methoden

2.4.1 Cluster-Analyse

Sowohl die SAPD-PCR-Bandenmuster verschiedener *Saccharomyces*-Arten, als auch die nested SAPD-PCR-Muster von *O. oeni*-Stämmen, wurden zur Cluster-Analyse herangezogen. Mit Hilfe der Software Bio-1D (Vilber-Lourmat, Eberhardzell) konnte die Größe der Fragmente des Fingerprint-Musters durch Vergleich mit dem mitgeführten Standard berechnet werden. Anschließend wurden die Bandengrößen in einer Tabelle sortiert dargestellt, wobei die Fragmente aller untersuchten Organismen mit einbezogen wurden. Diese Daten wurden zunächst in einer Excel-Tabelle (Excel 2010, Microsoft, Böblingen) in eine 1/0-Matrix übersetzt, von der Spaltenform in die Zeilenform transponiert und dann in Word 2010 (Microsoft, Böblingen) übertragen. Um diese Daten zur Generation eines Cluster-Baums verwenden zu können, wurden die Zahlen der Matrix in „A“ anstelle von „1“ und „T“ anstatt „0“ umgeschrieben. Des Weiteren wurden die einzelnen Reihen gemäß des FASTA-Formats formatiert. Bei der Auswertung mehrerer PCRs können die jeweiligen Datensets aneinandergesetzt werden. Auf der Grundlage dieser Sequenzen wurde anschließend mit Hilfe der Software ClustalX (Thompson et al., 1997) ein Stammbaum nach dem Neighbor-Joining-Algorithmus berechnet. Der Baum wurde anschließend in Tree View (Page, 1996) geöffnet und editiert.

2.4.2 Datenbanken, Webadressen und Programme

Folgende Datenbanken und Webadressen wurden im Rahmen dieser Arbeit genutzt:

BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CBS-KNAW (Fungal Biodiversity Centre)	http://www.cbs.knaw.nl/
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
DSMZ	http://www.dsmz.de/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligo Property Scan	http://www.eurofinngenomics.eu/
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
<i>Saccharomyces</i> Genome Database	http://www.yeastgenome.org/
StrainInfo	http://www.straininfo.net/

In dieser Arbeit wurde die folgende Software verwendet:

Bio-1D 15.02	(Vilber-Lourmat, Eberhardzell)
ClustalX 1.83	(Thompson et al., 1997)
FinchTV 1.4.0	(Geospiza, Seattle, USA)
Microsoft Office 2010	(Microsoft, Böblingen)
Tree View 1.6.6	(Page, 1996)
Vision Capt 15.08	(Vilber-Lourmat, Eberhardzell)

2.5 Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry

Die MALDI-TOF-MS-Analysen wurden in der Amtlichen Materialprüfungsanstalt (MPA, Bremen) in der Arbeitsgruppe von Dr. Jan Küver durch Dr. Andreas Rabenstein durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit war es von Interesse, ob sich diese Methode zur Differenzierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces* eignet. Hierzu wurden 21 verschiedene *Saccharomyces*-Stämme auf GYP-Agar ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Nachdem deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen waren, wurden die Kulturen in die MPA (Bremen) geschickt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die MALDI-TOF-MS sensitiv genug ist, um eine Unterscheidung verschiedener *O. oeni*-Isolate auf Stamm-Ebene zu ermöglichen. Elf *O. oeni*-Stämme wurden nach Ausplattieren auf Tomatensaft-Agar für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend ebenfalls zur MPA (Bremen) gesendet.

Vor der MALDI-TOF-MS-Analyse wurden die Kulturen nochmals überimpft. *Saccharomyces*-Stämme wurden auf GYP-Agar für 72 h bei 25 °C kultiviert. Die *O. oeni*-Isolate wurden auf einem leicht modifizierten Tomatensaft-Agar (Casein Trypton 20 g/l, Pepton aus Fleisch 0,5 g/l, Hefeextrakt 0,5 g/l, Glucose 0,5 g/l, Tween 80 0,1 ml/l, 250 ml filtrierter Tomatensaft; pH 5,7) für 48 h bei 30 °C inkubiert.

Die Probenvorbereitung und anschließende MALDI-TOF-MS-Analyse erfolgte für *Saccharomyces*- und *O. oeni*-Stämme analog zueinander. Einzelkolonien wurden zunächst in 50 µl 70 %-iger Ameisensäure suspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Acetonitril wurden die Proben gut durchmischt und anschließend für 5 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Jeweils 1 µl des Überstandes wurde in ein Probenfeld auf einer Probenplatte gegeben und mit 1 µl einer Matrixlösung überschichtet. Bei der Matrixlösung handelte es sich um eine übersättigte, wässrige α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Lösung in 50 % Acetonitril und 2,5 % Trifluoressigsäure. Nachdem die Probe getrocknet war, konnte diese analysiert werden. Die massenspektrometrische Untersuchung wurde in einem Microflex LT Spektrometer unter Verwendung der Software flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) durchgeführt. Dabei wurden Spektren in einem Bereich von 2000 - 20000 m/z und einer Laserfrequenz von 20 Hz aufgenommen. Jede Probe

wurde mehrfach gemessen, um anschließend aus mehreren Einzelspektren ein Massenspektrum für jede Probe zu berechnen. Zum Abgleich der aufgenommenen Spektren mit der Biotyper-Datenbank wurde das Programm MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet, mit dessen Hilfe auch die Berechnung eines Dendrogramms möglich war.

3 ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Methoden zur Differenzierung und Identifizierung von Mikroorganismen, die bei der Weinbereitung von Bedeutung sind. Der erste Teil der Arbeit konzentriert sich auf Hefearten, die der Gattung *Saccharomyces* angehören. Weiterhin bildet die Differenzierung von Milchsäurebakterien auf Art- bzw. Stamm-Niveau den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit.

3.1 Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Gattung *Saccharomyces*

Wie schon zuvor beschrieben, sind Hefen der Gattung *Saccharomyces* neben ihrer zentralen Rolle bei der Weinherstellung an einer Vielzahl weiterer biotechnologischer Prozesse beteiligt und daher von großer industrieller Bedeutung. Die Differenzierung der beschriebenen Arten dieser Gattung ist durch deren sehr enge Verwandtschaftsverhältnisse mittels etablierter Methoden nur unzureichend möglich. Zusätzlich wird eine zuverlässige Identifizierung durch das Vorkommen interspezifischer Hybride erschwert. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit alternative Methoden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit zur Differenzierung von Arten der Gattung *Saccharomyces* untersucht und miteinander verglichen werden.

3.1.1 Anwendung der SAPD-PCR mit anschließender Cluster-Analyse

Bei der SAPD-PCR handelt es sich um ein am IMW entwickeltes DNA-Fingerprint-Verfahren (Fröhlich & Pfannebecker, 2007), welches bereits erfolgreich zur Differenzierung einer Vielzahl an Organismen angewandt wurde. Durch die Verwendung von kurzen, relativ unspezifischen Primern, die an komplementäre Bereiche im gesamten Genom binden, kommt es zur gleichzeitigen Amplifikation mehrerer DNA-Abschnitte. So entsteht ein charakteristisches Bandenmuster, welches zur Identifizierung unbekannter Organismen auf Art-Ebene herangezogen werden kann.

In früheren Arbeiten von Pfannebecker (2008) und Blättel (2012) wurde die Eignung der SAPD-PCR zur Differenzierung von *Saccharomyces*-Arten bereits überprüft. Diese Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit durch das Testen weiterer Stämme und insbesondere der neu beschriebenen Art *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011) erweitert und vertieft.

Die unter Verwendung der Primer A-Not, C-Not und T-Not erzeugten Fingerprint-Muster der *Saccharomyces*-Typstämme, einiger Vergleichsstämme und zweier Hybrid-Stämme sind in Abb. 3.1 dargestellt.

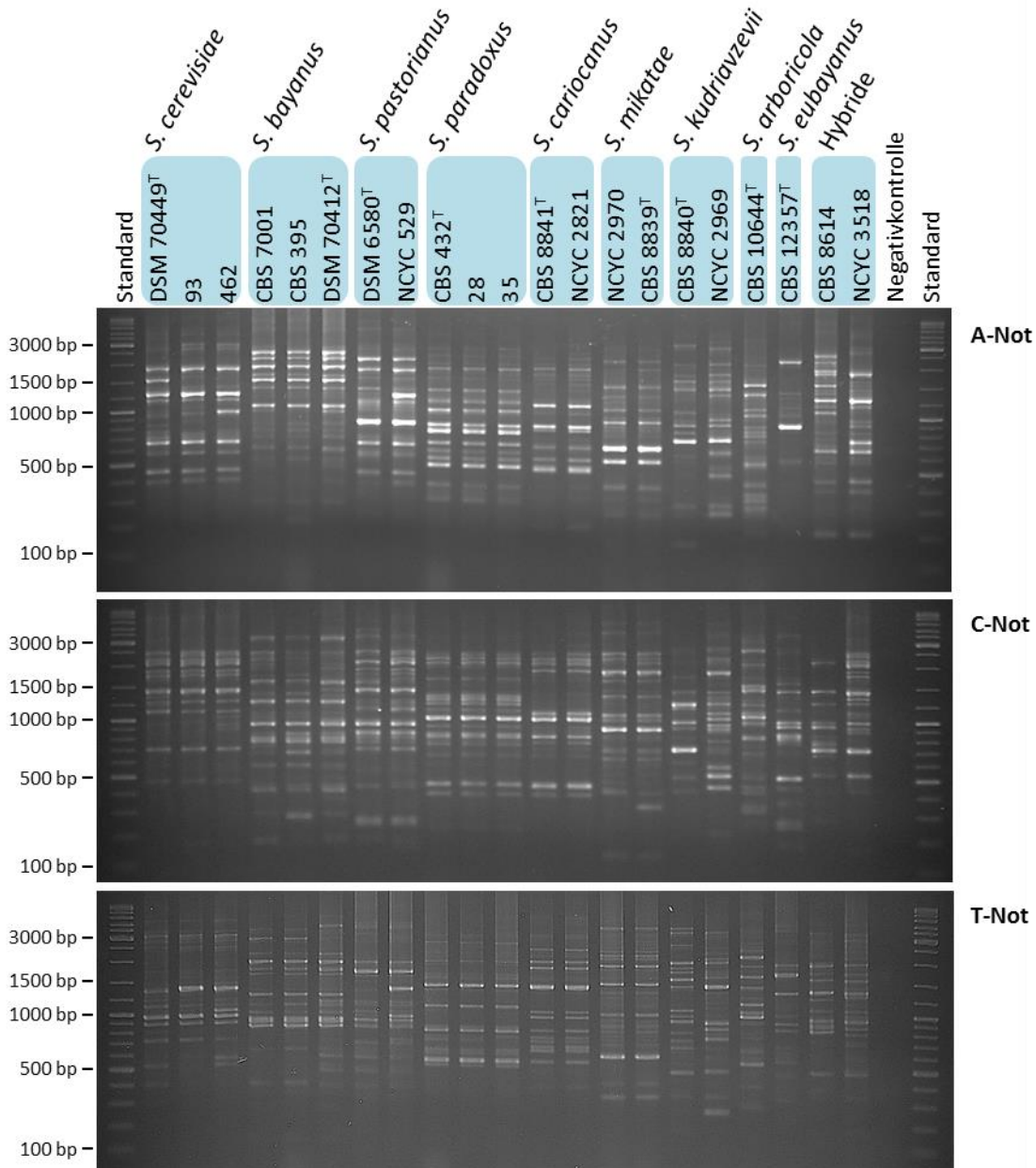


Abb. 3.1: Durch SAPD-PCR erzeugte Bandenmuster von Arten der Gattung *Saccharomyces* unter Verwendung der Primer A-Not, C-Not und T-Not. Es wurden die jeweiligen Typstämme (^T) und einige Vergleichsstämme untersucht. Weiterhin wurden diese mit den beiden Hybrid-Stämmen CBS 8614 (*S. bayanus* x *cerevisiae* x *kudriavzevii*) und NCYC 3518 (*S. cerevisiae* x *kudriavzevii* (Blättel, 2012)) verglichen. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo).

Die Verwendung von drei verschiedenen SAPD-Primern (A-Not, C-Not & T-Not) führte zu artspezifischen Bandenmustern, mit deren Hilfe alle *Saccharomyces*-Arten unterschieden werden konnten. Weiterhin wiesen alle *Saccharomyces*-Stämme, die einer Art angehörten, nur geringfügige Unterschiede in ihrem SAPD-Muster auf. Die beiden untersuchten *S. kudriavzevii*-Stämme bildeten hierbei jedoch eine Ausnahme.

Um diese Beobachtungen besser zu veranschaulichen, wurde, wie auch in anderen taxonomischen Studien, anhand der DNA-Fingerprint-Muster ein Stammbaum erstellt. Hierbei können die genetischen Unterschiede der Organismen zueinander graphisch dargestellt werden. Zur Cluster-Analyse der *Saccharomyces*-Arten wurden die SAPD-PCR-Bandenmuster aus der Amplifikation mit den Primern A-Not, C-Not und T-Not (Abb. 3.1) mit Hilfe der Software Bio-1D (Vilber Lourmat) ausgewertet. Durch Vergleich mit dem mitgeführten Standard konnte die Sequenzlänge der entstanden PCR-Fragmente ermittelt werden. In Tabelle 8.1 (Anhang 8.2) sind die Größen der Fragmente angegeben, welche auf 10 bp gerundet wurden.

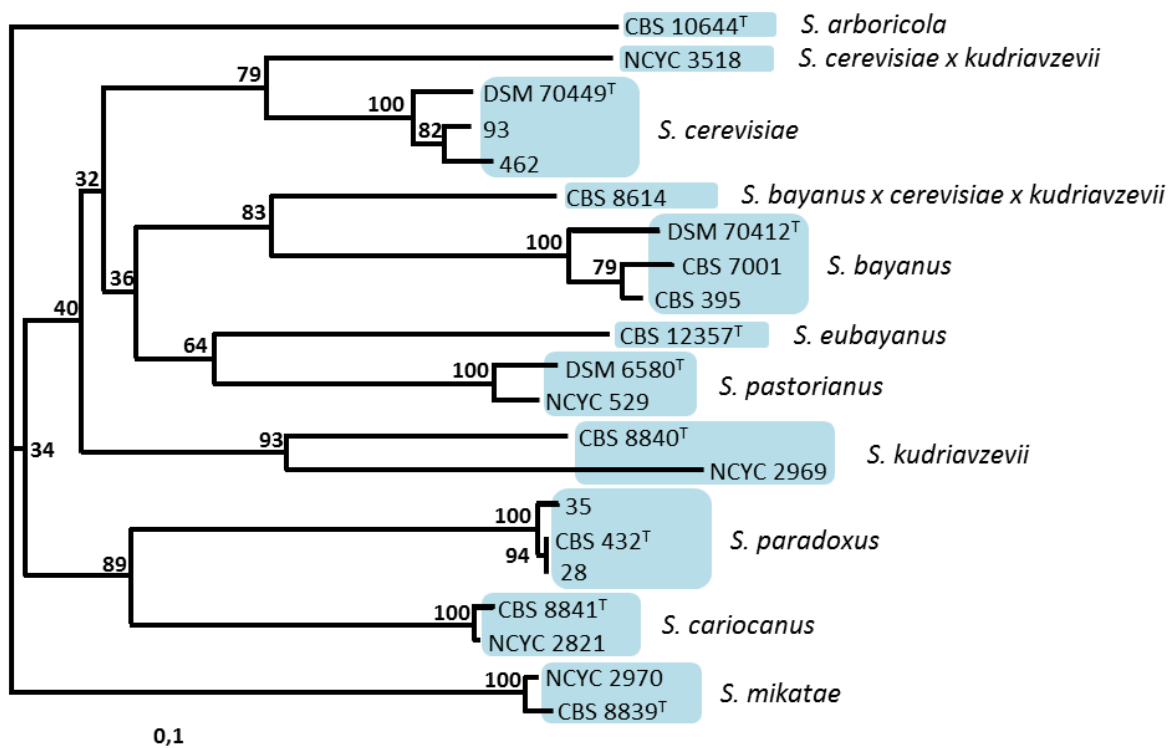


Abb. 3.2: Cluster-Analyse von Arten der Gattung *Saccharomyces* auf Grundlage der SAPD-PCR mit den Primern A-Not, C-Not und T-Not. Die Auswertung der Ergebnisse der SAPD-PCR lieferte eine Datenmatrix mit 179 Positionen anhand derer, unter Verwendung des Neighbor-Joining Algorithmus, der Stammbaum berechnet wurde. An den Ast-Verzweigungen sind die Bootstrap-Werte (100 Wiederholungen) dargestellt. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschied. ^T: Typstamm.

Die Banden wurden anhand ihrer Länge sortiert und anschließend in eine 1/0-Datenmatrix konvertiert (Tab. 8.3, Anhang 8.3). Auf deren Grundlage wurde mittels Neighbor-Joining Algorithmus ein Stammbaum errechnet (Abb. 3.2). Die Arten *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* und *S. mikatae* bildeten jeweils separate Cluster und konnten somit eindeutig von den anderen Arten differenziert werden. Von den Arten *S. arboricola* und *S. eubayanus* konnten leider nur die Typstämme untersucht werden, da zurzeit keine weiteren Vergleichsstämme in Stammsammlungen hinterlegt sind. Die Abgrenzung der getesteten Typstämme zu den anderen *Saccharomyces*-Arten mittels SAPD-PCR war allerdings eindeutig. Die beiden *S. kudriavzevii*-Stämme CBS 8840^T und NCYC 2969 bildeten ebenfalls ein eigenes Cluster, jedoch wurde auch in dem berechneten Stammbaum eine größere genetische Distanz der beiden Stämme zueinander deutlich. Um die Heterogenität des Fingerprint-Musters innerhalb von Stämmen der Art *S. kudriavzevii* näher zu untersuchen, wurden weitere Stämme in die SAPD-Analyse mit einbezogen (Abb. 3.3). Hierbei zeigte sich eine größere Variabilität im Bandenmuster als es bei anderen Stämmen einer Art der Fall war. Dennoch wies der Stamm NCYC 3494 bei der Verwendung aller Primer eine sehr hohe Übereinstimmung zum Typstamm auf. Auch der Stamm 727 zeigte mehr Ähnlichkeit mit dem Typstamm als der Stamm NCYC 2969.

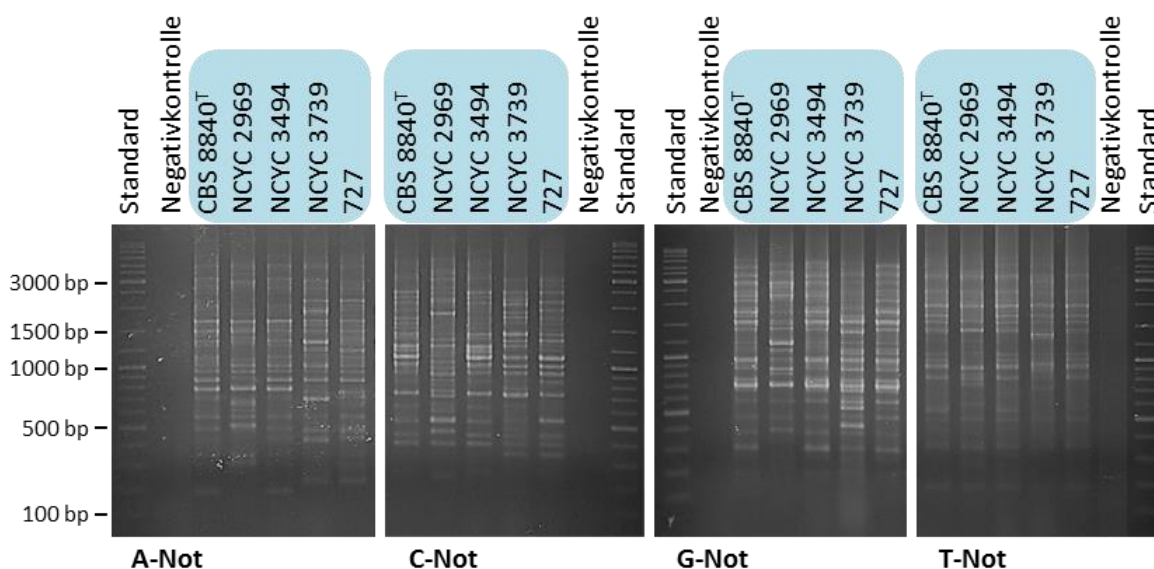


Abb. 3.3: Vergleich der durch SAPD-PCR generierten Bandenmuster verschiedener *S. kudriavzevii*-Stämme mit den Primern A-Not, C-Not, G-Not und T-Not. Der Typstamm ist durch ein ^T gekennzeichnet. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo).

Bei weiteren SAPD-PCR-Analysen wurde beobachtet, dass der Stamm NCYC 3739 ein ähnliches SAPD-Bandenmuster ausbildete wie der Stamm NCYC 3518, bei dem es sich um einen Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* handelt (Blättel, 2012). Dies führte zu der Vermutung, dass auch der Stamm NCYC 3739 ein Hybrid aus diesen beiden Arten sein könnte, was daraufhin näher untersucht wurde.

Um auszuschließen, dass es sich bei der verwendeten Kultur um eine Mischung zweier *Saccharomyces*-Arten handelte, wurden Zellen dieses Stammes mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt. Die aus Einzelzellen herangewachsenen Kulturen wurden anschließend mittels SAPD-PCR analysiert. In Abbildung 3.4 kann man erkennen, dass diese Kulturen (NCYC 3739_M1 bis M5) das gleiche Bandenmuster aufwiesen wie die Ausgangskultur NCYC 3739_A. Hierbei wurde die große Ähnlichkeit des Fingerprint-Musters zu dem des Hybrid-Stammes NCYC 3518 deutlich, wodurch die Annahme, dass es sich auch bei NCYC 3739 um einen Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* handeln könnte, bestärkt wurde. Weiterhin veranschaulicht Abbildung 3.4 zusätzlich die hohe Reproduzierbarkeit dieser DNA-Fingerprint-Methode. Bei den einzeln herangezogenen Kulturen wurde jeweils eine DNA-Extraktion mit anschließender SAPD-PCR durchgeführt, was zu einem identischen Bandenmuster führte.

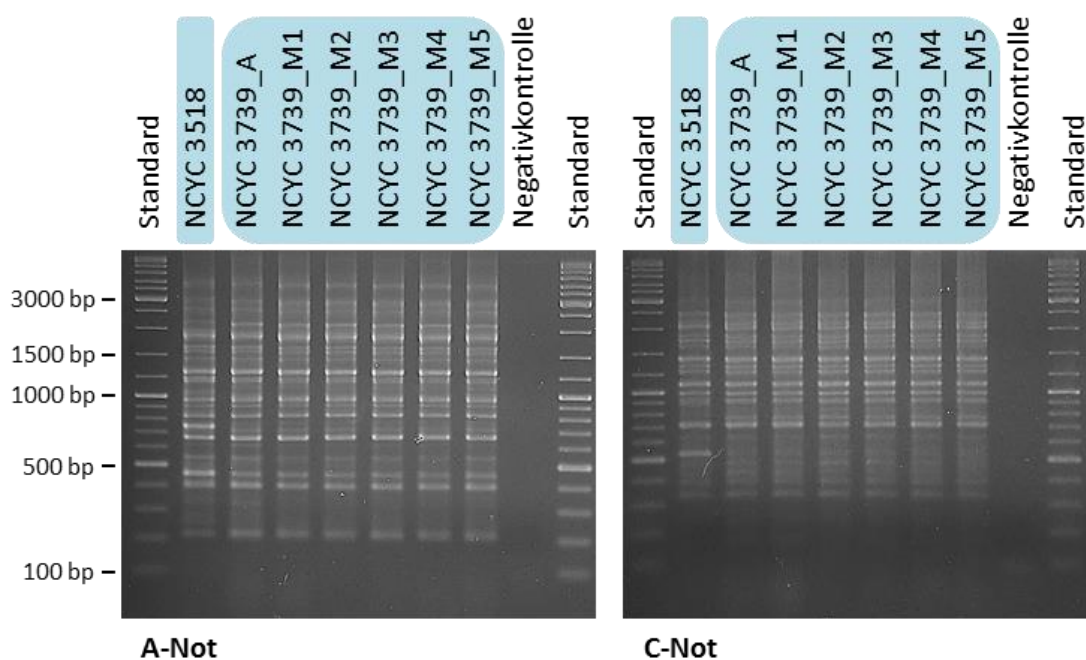


Abb. 3.4: SAPD-PCR-Analyse des Stammes NCYC 3739 nach Amplifikation mit den Primern A-Not und C-Not. Dargestellt sind die Bandenmuster der Ausgangskultur NCYC 3739_A und der nach Mikromanipulation aus Einzelzellen hervorgegangenen Kulturen NCYC 3739_M1 bis M5. Zum Vergleich wurde der Hybrid-Stamm NCYC 3518 mitgeführt. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo).

Das Vorkommen von Hybriden zwischen verschiedenen *Saccharomyces*-Arten wird in der Literatur häufig beschrieben. Eine Identifizierung der beteiligten parentalen Spezies ist jedoch teilweise schwierig. Bei Betrachtung der SAPD-PCR-Bandenmuster der in der Cluster-Analyse mitgeführten Hybrid-Stämme CBS 8614 und NCYC 3518 war es möglich, charakteristische DNA-Fragmente der Elternspezies zu erkennen (vergl. Abb. 3.1 und Tab 8.1, Anhang 8.2). Auch beim Stamm NCYC 3739 konnte aufgrund des Fingerprintmusters angenommen werden, dass es sich um einen Hybrid handeln könnte. Im Stammbaum

bildeten die Hybrid-Stämme mit den Stämmen anderer Arten jedoch keine gemeinsamen Cluster (Abb. 3.2). In der Literatur wird der Stamm CBS 8614 als Triple-Hybrid beschrieben, der genetisches Material von *S. bayanus*, *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* enthält (Naumova et al., 2005). Das SAPD-PCR-Muster zeigte bei diesem Stamm die größte Ähnlichkeit zu *S. bayanus*, wohingegen der Stamm NCYC 3518, ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* genetische Ähnlichkeit zu *S. cerevisiae* aufwies.

Mit Hilfe der SAPD-PCR war eine eindeutige Differenzierung der Saccharomyceten auf Art-Ebene erreichbar. Weiterhin konnten bei der Analyse von Hybriden PCR-Fragmente der jeweiligen Elternspezies detektiert werden. So lieferte diese Methode also Hinweise auf den möglichen Hybridcharakter eines Stammes, jedoch kann eine genaue Identifizierung der beteiligten parentalten Spezies einzig auf Grundlage der SAPD-PCR schwierig sein.

3.1.2 Differenzierung verschiedener *Saccharomyces*-Arten mittels MALDI-TOF-MS

Viele Studien beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Nutzung der MALDI-TOF-MS-Analyse zur Identifizierung von Mikroorganismen (Schubert & Wieser, 2010). Die Methode wird bisher vorwiegend im medizinischen Sektor genutzt, findet jedoch auch in anderen Bereichen wie z.B. der Lebensmittelherstellung Anwendung (Vallejo et al., 2013; Doan et al., 2012; Dušková et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung dieser Methode zur Differenzierung von Arten der Gattung *Saccharomyces* untersucht.

Die MALDI-TOF-MS-Analysen, sowie die Auswertung der erzielten Spektren von 21 verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Jan Küver (MPA, Bremen) durch Dr. Andreas Rabenstein durchgeführt. Nach einem Abgleich der erzielten Massenspektren mit der Datenbank (Biotyper database version 3.1, Bruker Daltonik) konnten für einige Stämme Übereinstimmungen zu *S. cerevisiae* ermittelt werden. Jedem Treffer wurde ein sogenannter „score“-Wert zugeteilt, welcher eine Aussage über dessen Validität erlaubt. In der Regel können Werte zwischen 2 und 3 für eine Identifizierung auf Art-Niveau herangezogen werden, während „score“-Werte zwischen 1,7 und 2 die Zuordnung eines Isolates zur Gattung ermöglichen (Vallejo et al., 2013). Die berechneten „score“-Wert der untersuchten *S. cerevisiae*-Stämme lagen über 2, wodurch diese zuverlässig identifiziert werden konnten (Tab. 3.1). Die ermittelten „score“-Werte der anderen Stämme waren niedriger. Für Stämme der Arten *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. eubayanus* und *S. kudriavzevii* konnten keine Übereinstimmungen mit Einträgen in der Datenbank festgestellt werden.

Tab. 3.1: Übereinstimmung der MALDI-TOF-MS-Spektren verschiedener *Saccharomyces*-Stämme zu *S. cerevisiae*

Art	Stamm	Ermittelter „score“-Wert ^a zum Datenbankeintrag ^b <i>S. cerevisiae</i>
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	-
<i>S. bayanus</i>	DSM 70412 ^T	-
	CBS 395	-
	CBS 7001	-
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	1,614
	NCYC 2821	1,798
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	2,149
	93	2,072
	462	2,152
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	-
<i>S. kudriavzevii</i>	CBS 8840 ^T	-
	NCYC 2969	-
<i>S. mikatae</i>	CBS 8839 ^T	1,970
	NCYC 2970	1,921
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	1,605
	28	1,801
	35	1,896
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	1,483
	NCYC 529	1,993
Hybrid-Stämme		
<i>S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii</i>	CBS 8614	1,561
<i>S. cerevisiae x kudriavzevii</i>	NCYC 3518	1,800

^a: der „score“-Wert gibt die Validität eines Treffers in der Datenbank an

^b: MALDI Biotyper database version 3.1 (Bruker Daltonik)

-: keine Übereinstimmung mit Einträgen in der Datenbank

Nach Erweiterung der Datenbank mit den neu generierten Spektren, wiesen diese eine gute Wiederfindungsrate auf. Die erzielten „score“-Werte lagen hier meist über 2,3. Demnach war eine Differenzierung der verschiedenen Arten möglich. Weiterhin wurden mit Hilfe der MALDI Biotyper Software (Version 3.1) aus den verschiedenen Massenspektren der einzelnen Stämme Distanzwerte errechnet, aus welchen ein Dendrogramm erstellt werden konnte (Abb. 3.5).

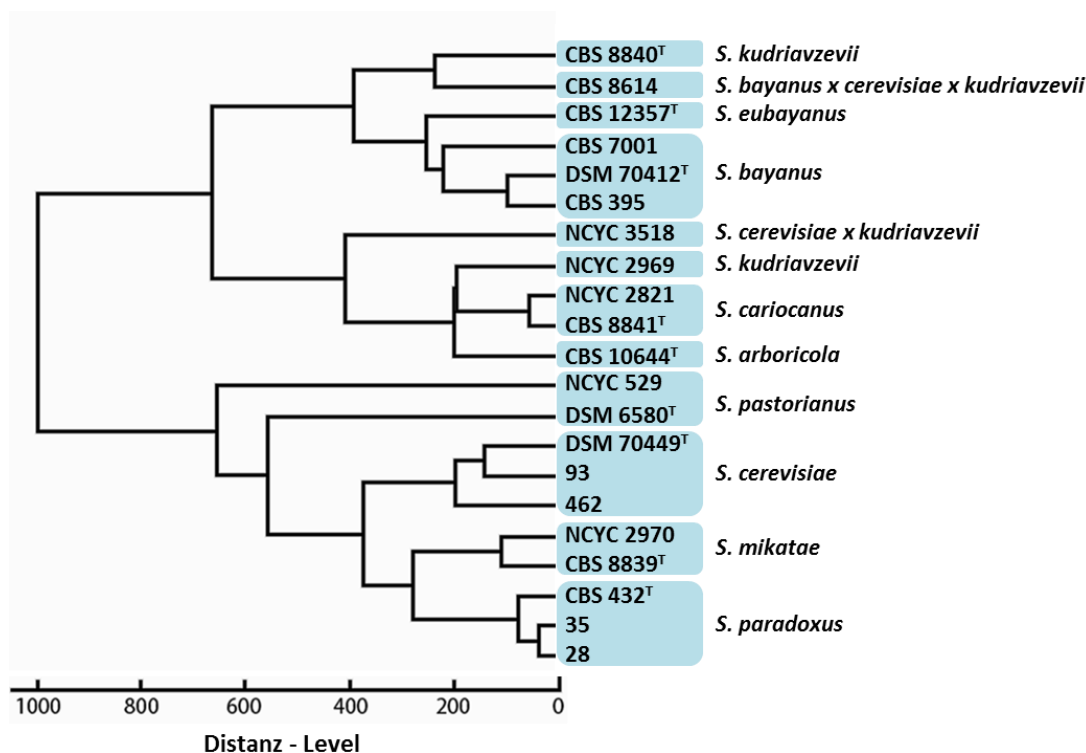


Abb. 3.5: Cluster-Baum von Stämmen der Gattung *Saccharomyces* auf der Grundlage von MALDI-TOF-MS-Spektren. Das Dendrogramm wurde von Dr. Andreas Rabenstein (MPA, Bremen) erstellt. Hierzu wurden die aus den verschiedenen Massenspektren der einzelnen Stämme mittels MALDI Biotyper Software (Version 3.1) errechneten Distanzwerte verwendet. ^T: Typstamm.

Stämme der Arten *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* und *S. mikatae* bildeten jeweils deutlich abgrenzbare Cluster, wodurch eine eindeutige Differenzierung dieser Arten möglich war. *S. eubayanus* wies eine recht hohe Ähnlichkeit zu den *S. bayanus*-Stämmen auf, mit welchen er eine Gruppe bildete. Die beiden untersuchten *S. kudriavzevii*-Stämme zeigten eine verhältnismäßig große Distanz zueinander. Der *S. kudriavzevii*-Typstamm clusterte mit dem Hybrid aus *S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii* CBS 8614, wohingegen der Stamm NCYC 2969 die größte Ähnlichkeit zu *S. cariocanus* und *S. arboricola* aufwies. Der zweite in diese Analyse mit einbezogene Hybrid-Stamm NCYC 3518 (*S. cerevisiae x kudriavzevii*) konnte keiner seiner parentalen Spezies zugeordnet werden.

3.1.3 Identifizierung von *Saccharomyces*-Arten und interspezifischer Hybride anhand Sequenzierung und RFLP-Analyse verschiedener genetischer Marker

González et al. (2006) konnten in einer Studie genetische Marker ermitteln, welche sich zur Differenzierung von *Saccharomyces*-Arten eignen und mit deren Hilfe es möglich war, Hybrid-Stämme

zu detektieren und zu charakterisieren. Hierbei wurden *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus* und *S. mikatae* untersucht, da für diese Arten komplette Genomsequenzen in den Datenbanken verfügbar waren. Durch Restriktionen der ITS-Region sowie der Gene *CAT8*, *CYR1*, *GSY1*, *MET6* und *OPY1* (vergl. Tab. 2.6), welche auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, war es möglich, eine Vielzahl an Hybriden zu charakterisieren (González et al., 2006). Weiterhin konnte durch die Sequenzierung des mitochondrialen Genes *COX2* (Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase) der mitochondriale Ursprung der Hybride bestimmt werden.

Zur Zeit der Veröffentlichung der Studie von González et al. (2006) waren die Arten *S. arboricola* und *S. eubayanus* noch nicht beschrieben, außerdem wurde *S. cariocanus* aufgrund der fehlenden Kenntnis der Genomsequenz nicht mit einbezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob alle derzeit bekannten *Saccharomyces*-Arten durch die Anwendung der vorgestellten Methode differenziert werden können. Des Weiteren wurden die Hybrid-Stämme NCYC 3518 und NCYC 3739 genauer charakterisiert. Der bereits gut untersuchte Triple-Hybrid CBS 8614 wurde ebenfalls zum Vergleich mitgeführt. Die taxonomische Beziehung zwischen *S. bayanus var. bayanus*, *S. bayanus var. uvarum*, *S. pastorianus* und *S. eubayanus* scheint sehr komplex zu sein (Libkind et al., 2011; Nguyen et al., 2000). Daher wurden Stämme dieser Arten genauer untersucht.

Anstelle einer RFLP-Analyse der ITS-Region wurde dieser Bereich sequenziert. Die Sequenzen wurden mit in der Datenbank hinterlegten Sequenzen von Typstämmen verglichen, um einen phylogenetischen Stammbaum unter Verwendung des Neighbor-Joining Algorithmus abzuleiten (Abb. 3.6). Die zur Berechnung des Stammbaums verwendeten Sequenzen sind im Anhang (8.1.1) angefügt.

Wie bereits erwähnt, ist die Sequenzierung der ITS-Region alleine nicht ausreichend, um die nah verwandten Arten der Gattung *Saccharomyces* eindeutig zu identifizieren. Die geringe phylogenetische Distanz wird durch den angegebenen Maßstab, der einem Sequenzunterschied von 1 % entspricht, deutlich (Abb. 3.6). *S. bayanus*, *S. eubayanus* und *S. pastorianus* bildeten ein gemeinsames Cluster mit sehr hoher Sequenzähnlichkeit der Arten untereinander. Die ITS-Sequenz der beiden Typstämme von *S. bayanus* und *S. pastorianus* sind identisch, was auf den Hybridcharakter von *S. pastorianus* zurückzuführen sein könnte (Vaughan-Martini & Martini, 2011). Der Triple-Hybrid CBS 8614 besitzt die gleiche ITS-Sequenz wie der ehemalige *S. uvarum*-Typstamm (aktuell: *S. bayanus var. uvarum*). Bei Betrachtung der Stellung der beiden Hybride NCYC 3518 und NCYC 3739 im Stammbaum, konnte man feststellen, dass diese mit den *S. kudriavzevii*-Stämmen ein gemeinsames Cluster bildeten. Der Hybridcharakter der Stämme bleibt durch das Betrachten eines einzelnen Genes verdeckt, daher ist es nötig weitere Gene zu untersuchen.

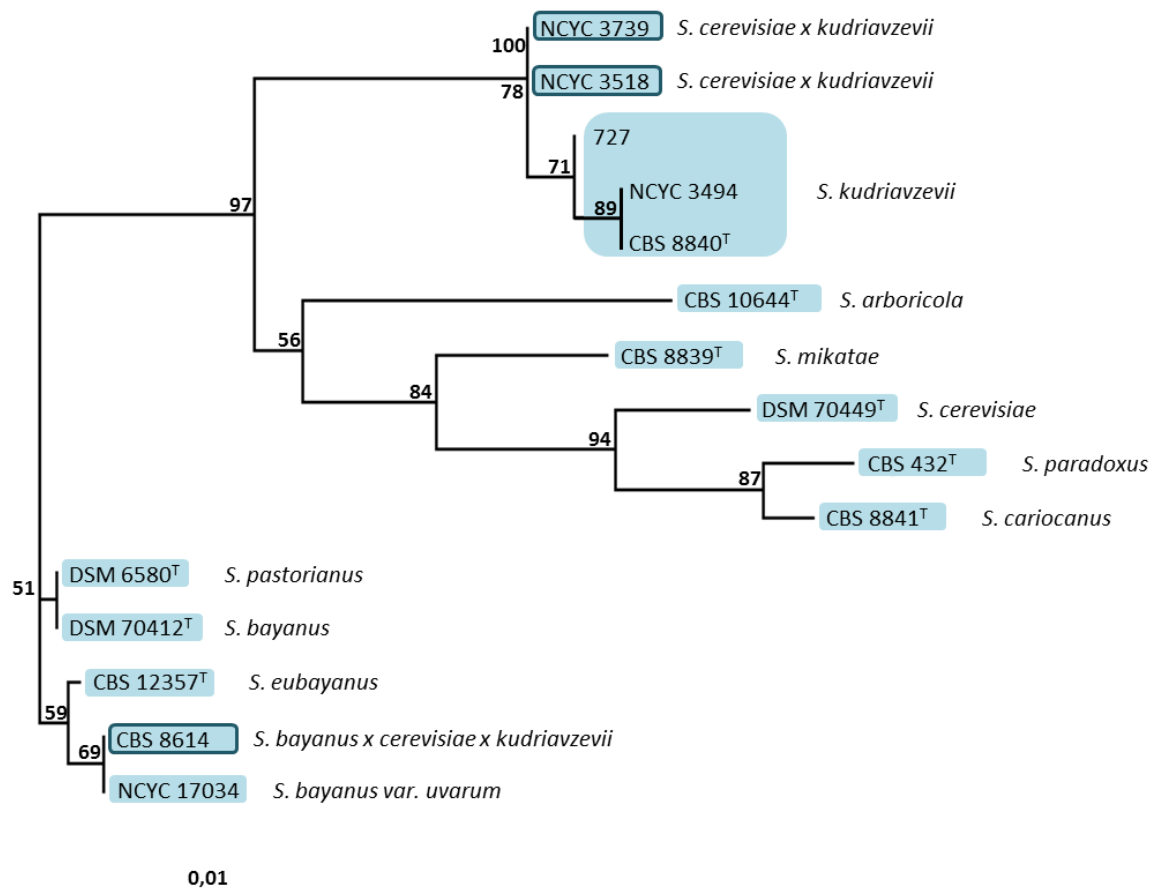


Abb. 3.6: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Arten und Stämme der Gattung *Saccharomyces*. Der Baum wurde auf Basis der 5,8S rDNA und ihrer flankierenden ITS-Regionen (723 Positionen) unter Verwendung des Neighbor-Joining Algorithmus berechnet. An den Ast-Verzweigungen sind die Bootstrap-Werte (100 Wiederholungen) dargestellt. Die untersuchten Hybride sind durch ein Kästchen hervorgehoben, Typstämme sind durch ein ^T gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht einer Distanz von 1%.

Wie bei González et al. (2006) beschrieben, wurden Teilbereiche der Gene *CAT8*, *CYR1*, *GSY1*, *MET6* und *OPY1* (vergl. Tab. 2.6) von *Saccharomyces*-Typstämmen und einigen Vergleichsstämmen amplifiziert und anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Die resultierenden Restriktionsmuster (Abb. 8.1A-C, Anhang 8.4) wurden mit Hilfe der Software Bio-1D (Vilber Lourmat) ausgewertet, wobei der mitgeführte DNA-Marker als Größenstandard bei der Berechnung der Länge der entstandenen Fragmente diente (Tabelle 8.5, Anhang 8.4). Die tatsächlich mittels Restriktionsverdau bestimmten Werte wichen zum Teil von den *in silico* ermittelten Werten ab. Ein Grund hierfür ist, dass kleine Fragmente (< 100 bp) nur schlecht im Gel sichtbar waren und daher, um Fehler zu vermeiden nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden. Weiterhin war eine genaue Größenbestimmung schwierig, da die Restriktionsfragmente teilweise eine sehr große Bandenstärke aufwiesen. Um die Ergebnisse der RFLP-Analysen übersichtlich zusammenzufassen, wurden die jeweiligen Restriktionsmuster sortiert und mit Buchstaben gekennzeichnet (Tabelle 3.2; Abb. 8.1A-C, Anhang 8.4).

Tab. 3.2: Restriktionsmuster verschiedener genetischer Marker zur Differenzierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces*

		Restriktionsmuster nach Verdau der angegebenen Genregionen mit den entsprechenden Enzymen ^a												
		CAT8		CYR1		GSY1	MET6		MET6-K ^b			OPY1		
Art	Stamm	HhaI	MspI	HaeIII	MspI	MspI	HaeIII	HinfI	ScrFI	HaeIII	HinfI	ScrFI	HaeIII	ScrFI
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	A	A
<i>S. bayanus</i>	DSM 70412 ^T	A	B	A	A	A	A	A	AB	-	-	-	AB	BD
	CBS 395	A	B	A	A	A	A	A	A	-	-	-	B	B
	CBS 7001	A	B	A	A	A	A	A	A	-	-	-	B	B
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	A	C	A	B	B	B	B	A	-	-	-	A	A
	NCYC 2821	A	C	A	B	B	B	B	A	-	-	-	A	A
	CBS 5313	A	C	A	B	B	B	B	A	-	-	-	A	C
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	A	D	A	B	C	C	B	A	-	-	-	A	A
	93	A	D	A	B	C	C	B	A	-	-	-	A	A
	462	A	D	A	B	C	C	B	A	-	-	-	A	A
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	A	E	A	A	A	A	A	B	-	-	-	A	D
<i>S. kudriavzevii</i>	CBS 8840 ^T	B	F	B	C	D	-	-	-	C	A	A	C	E
	NCYC 2969	C	G	B	C	D	-	-	-	C	A	A	C	E
	NCYC 3494	B	F	B	C	D	-	-	-	C	A	A	C	E
	727	B	F	B	C	D	-	-	-	C	A	A	D	E
<i>S. mikatae</i>	CBS 8839 ^T	D	F	C	D	E	C	A	B	-	-	-	E	F
	NCYC 2970	D	F	C	D	E	C	A	B	-	-	-	E	F
	CBS 10522	D	H	C	D	C	C	A	B	-	-	-	E	F
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	A	C	D	B	F	C	A	A	-	-	-	C	A
	28	A	C	D	B	F	C	A	A	-	-	-	C	A
	35	A	C	D	B	F	C	A	A	-	-	-	C	A
Hybrid-Stämme														
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	A	DE	A	AB	A	AC	AB	AB	-	-	-	A	AD
	NCYC 396	A	DE	A	AB	A	AC	AB	AB	-	-	-	A	AD
	NCYC 529	A	DE	A	AB	AC	AC	AB	AB	-	-	-	A	AD
<i>S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii</i>	CBS 8614	AB	BDF	AB	BC ³	ADC	AC	AB	A ⁷	C	A	A	ABC ⁴	ABE
<i>S. cerevisiae x kudriavzevii</i>	NCYC 3518	AB	DF ¹	AB	BC ³	CD ²	C ⁶	B	A ⁷	C	A	A	AC ⁴	AE ⁵
	NCYC 3739	AB	DF	AB	BC ³	CD	C	B	A	C	A	A	AC	AE

-: kein PCR-Produkt; ^a: vergl. Abb. 8.1A-C und Tabelle 8.5, Anhang 8.4; ^b: *S. kudriavzevii*-spezifisches Allel

¹: zusätzlich eine schwache Bande bei 530bp; ²: zusätzlich eine schwache Bande bei 400bp

³: möglicherweise auch ABC, allerdings wäre dann 570er Bande stärker

⁴: zusätzliche Bande bei 430 bp; ⁵: zusätzliche Bande bei 400 bp, die auch im RFLP-Muster von CBS 5313 vorkam

⁶: zusätzliche Bande bei 200 bp; ⁷: zusätzliche Bande bei 210 bp

Die verschiedenen *Saccharomyces*-Arten unterschieden sich jeweils in mindestens einem der zehn Restriktionsmuster voneinander. Demnach ist auch nach Einbeziehen der neu beschriebenen Arten eine eindeutige Differenzierung mit dieser Methode möglich. Verschiedene Stämme einer Art wiesen in der

Regel das gleiche Restriktionsmuster auf. Eine Ausnahme bildete hier beispielsweise *S. mikatae* CBS 10522. Auch innerhalb der *S. kudriavzevii*-Stämme waren einige unterschiedliche Restriktionsmuster feststellbar. Dies deutet auf eine Heterogenität innerhalb dieser Gruppe hin, die auch schon mittels SAPD-PCR und MALDI-TOF-MS beobachtet wurde. Das Auftreten abweichender Restriktionsmuster führte bei den hier getesteten Stämmen jedoch nicht zu einer Verwechslung mit anderen Arten, da die Muster entweder einmalig vorkamen, oder sich der jeweilige Stamm durch die RFLP-Analysen der anderen Gene deutlich zu andern Arten abgrenzen ließ. Die Restriktionsmuster der Hybride setzten sich aus denen ihrer jeweiligen parentalen Spezies zusammen, wobei teilweise zusätzliche Banden auftraten. Bei der Amplifikation eines Teilbereiches des *MET6*-Gens in *S. kudriavzevii*-Stämmen war es nötig, einen veränderten Reverse-Primer zu verwenden. Bei anderen Arten wurde mit diesem veränderten Primer kein PCR-Produkt gebildet. Bei den Hybrid-Stämmen CBS 8614, NCYC 3518 und NCYC 3739 konnte mit beiden Primern ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Diese Stämme besitzen demnach sowohl ein *S. kudriavzevii*-spezifisches Allel für das *MET6*-Gen, als auch mindestens ein zusätzliches Allel dieses Gens, welches von einer weiteren Elternspezies stammen könnte.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Charakterisierung von Hybriden ist die Bestimmung der Herkunft der Mitochondrien, welche von einer der Elternspezies stammen. Zu diesem Zweck wurde ein Teilbereich des mitochondrialen Gens *COX2*, welches häufig für phylogenetische Analysen bei Hefen herangezogen wird, sequenziert. Um die Unterschiede in den *COX2*-Gensequenzen zu verdeutlichen, wurden die Sequenzen der Hybride sowie der Typstämme und einiger Vergleichsstämme (Anhang 8.1.2) zur Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes mittels Neighbor-Joining Algorithmus genutzt (Abb. 3.7). Da aus früheren Studien bekannt ist, dass unter anderem *S. cerevisiae*- und *S. kudriavzevii*-Stämme intraspezifische Unterschiede in diesem Gen aufweisen (Kurtzman & Robnett, 2003), wurden bei der Stammbaumerstellung mehrere Stämme dieser beiden Arten berücksichtigt. Bei Betrachtung der *Saccharomyces*-Stämme ließen sich zwei große Cluster im Stammbaum unterscheiden, wobei *S. bayanus*, *S. eubayanus* und *S. pastorianus* eines dieser Cluster formten. Die untersuchten *S. pastorianus*-Stämme wiesen identische *COX2*-Sequenzen auf und bildeten trotz ihrer Hybrid-Eigenschaft ein deutlich abgrenzbares Cluster. Eine Differenzierung zwischen den beiden Stämmen *S. bayanus* var. *bayanus* (DSM 70412^T) und *S. bayanus* var. *uvarum* (CBS 395) war auf Grundlage der *COX2*-Sequenz nicht möglich.

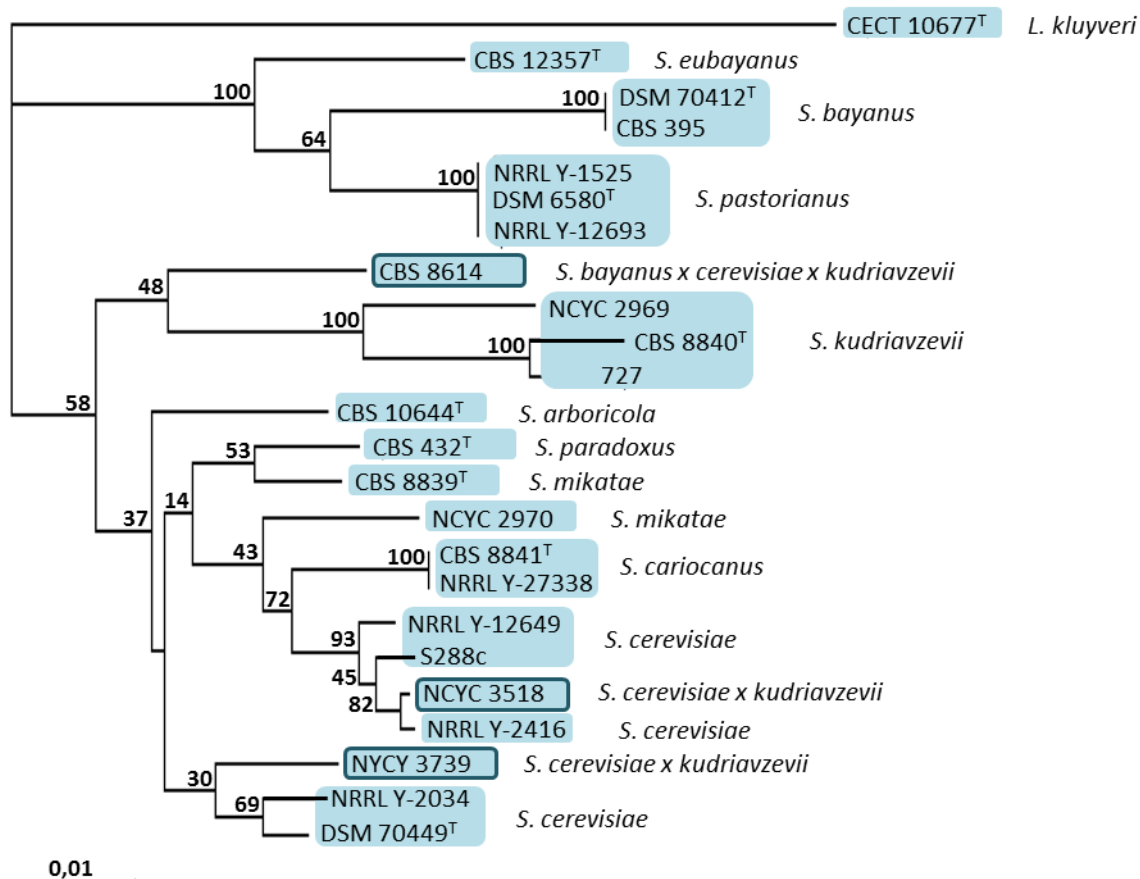


Abb. 3.7: Stammbaum auf Grundlage von COX2-Gensequenzen verschiedener *Saccharomyces*- und Hybrid-Stämme. Die Grundlage des mittels Neighbor-Joining Algorithmus berechneten Baumes waren Nukleotid-Sequenzen mit 579 Positionen. Hybride sind durch ein Kästchen markiert, Typstämme durch ein ^T gekennzeichnet. An den Ast-Verzweigungen sind die Bootstrap-Werte (100 Wiederholungen) dargestellt. Der Maßstab entspricht 1 % Merkmalsunterschied. *Lachancea kluyveri* diente als Außengruppe.

Die bereits erwähnte Diversität der *S. kudriavzevii*-Stämme wird im Stammbaum deutlich, jedoch waren die untersuchten Stämme in einem losen Cluster zu finden. Die größte Heterogenität wiesen Stämme der Art *S. cerevisiae* auf. Die beiden Hybride NCYC 3518 und NYCY 3739 unterschieden sich in ihrer Sequenz voneinander, bildeten jedoch mit verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen eine Gruppe. Auf diese Elternspezies scheinen die Mitochondrien zurückzugehen. Der Triple-Hybrid CBS 8614 zeigte die größte Ähnlichkeit zu den analysierten *S. kudriavzevii*-Stämmen, mit denen er ein loses Cluster bildete. Die Vermutung lag daher nahe, dass hier der mitochondriale Ursprung dieses Stammes liegt.

3.2 Identifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien spielen eine wesentliche Rolle bei der Weinbereitung und können die Qualität des Endproduktes sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Daher ist die Überwachung der mikrobiellen Flora während der Vinifikation von großer Bedeutung. Die Isolierung von Mikroorganismen in Form von Reinkulturen und deren anschließende Identifizierung kann mehrere Tage in Anspruch nehmen. Um dem Winzer ein zeitnahes Agieren während der Weinherstellung zu ermöglichen, sind schnellere Identifizierungsmethoden erforderlich. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode zur Schnellidentifizierung der häufigsten weinrelevanten Milchsäurebakterien-Arten. Um die gesamte mikrobielle Flora eines Habitats zu erfassen, kann man sich die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) zu Nutze machen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue DGGE-Primer entwickelt und getestet, mit deren Hilfe es möglich ist das Vorkommen von Milchsäurebakterien während der Weinherstellung zu kontrollieren. Weiterhin beschäftigt sich dieser Teil der Arbeit mit der Differenzierung einzelner Stämme, da auch dieser Aspekt während der Weinbereitung von Interesse sein kann.

3.2.1 Entwicklung einer Multiplex-PCR basierten Methode zur Schnellidentifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien

Die Fingerprint-Methode SAPD-PCR wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten erfolgreich zur Identifizierung von Milchsäurebakterien herangezogen (Sebastian et al., 2011; Pfannebecker, 2008; Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Generell ist es möglich DNA-Fingerprint-Methoden zu nutzen, um spezifische Marker zu detektieren, anhand deren Sequenz man spezifische Primer, sogenannte SCAR-Primer (Sequence Characterized Amplified Regions) ableiten kann (Paran & Michelmore, 1993). Mit Hilfe dieses Prinzips konnte Pfannebecker (2008) artspezifische Primer zum Nachweis von *Lb. hilgardii*, *Lc. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* und *P. pentosaceus* entwickeln. Die Amplifikationsprodukte der verschiedenen Spezies unterschieden sich in ihrer Größe, wodurch es möglich war die Identifizierung in Form einer Multiplex-PCR durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden artspezifische SCAR-Primer für sechs weitere, häufig im Wein vorkommende Milchsäurebakterien-Arten generiert: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *O. oeni* und *W. paramesenteroides*.

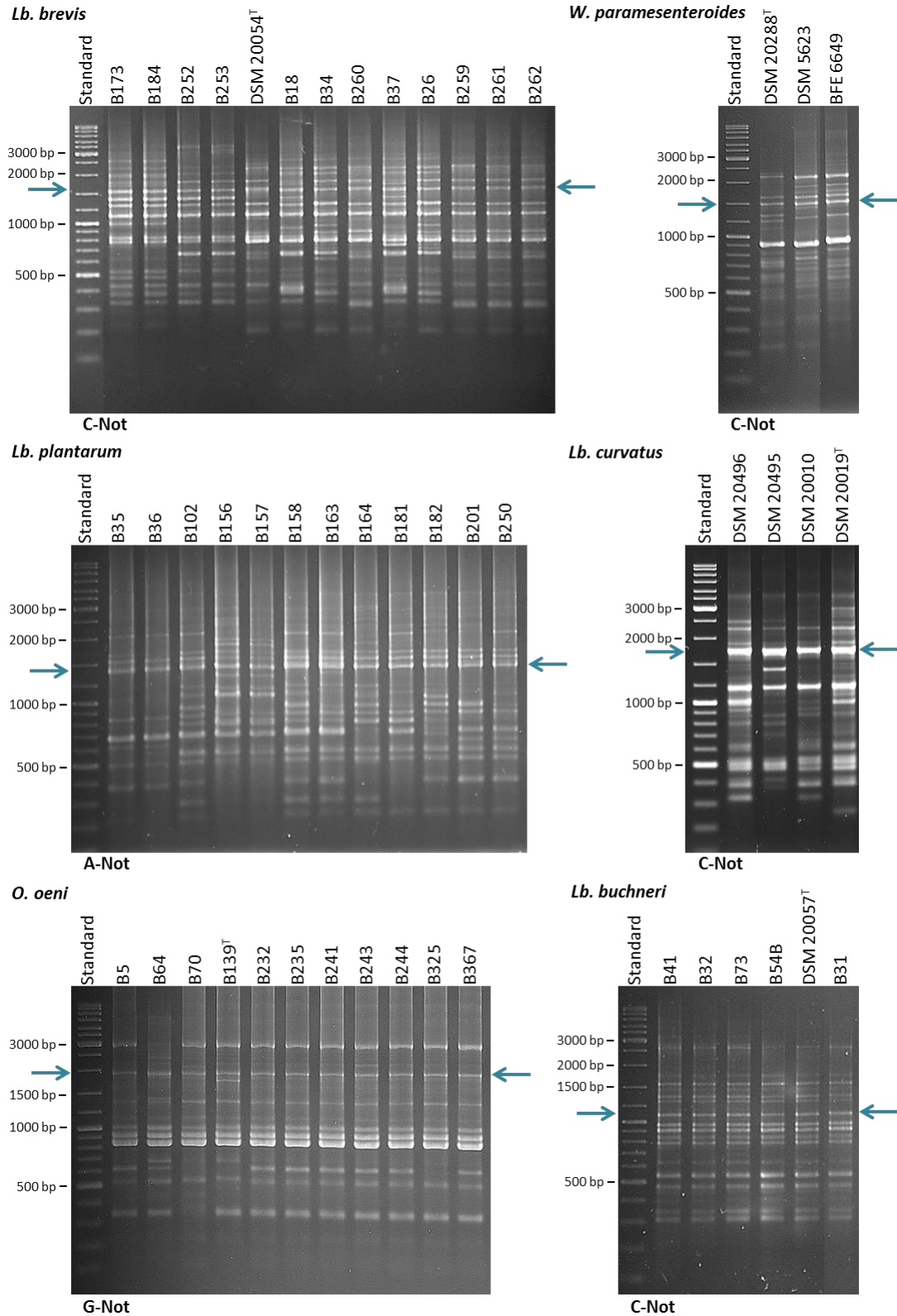


Abb. 3.8: SAPD-PCR Fingerprintmuster von Stämmen verschiedener Milchsäurebakterien-Arten. Spezifische PCR-Produkte, welche jeweils zur Entwicklung artspezifischer SCAR-Primer verwendet wurden, sind durch einen Pfeil markiert. Der Typstamm ist durch ein ^T gekennzeichnet. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo).

3.2.1.1 Screening nach artspezifischen Markern

Mehrere Milchsäurebakterien-Stämme einer Art wurden mittels SAPD-PCR unter Verwendung verschiedener Primer untersucht. Die resultierenden Fingerprint-Muster wurden anschließend miteinander verglichen, um speziesspezifische Marker zu detektieren. Die artspezifischen Amplifikationsprodukte, welche später zur Generation von spezifischen Primern verwendet wurden, sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Die Durchführung einer SAPD-PCR mit dem Primer C-Not führte bei *Lb. brevis* zur Amplifikation eines spezifischen Markers mit einer Größe von 1552 bp. Diese Bande konnte bei allen untersuchten Stämmen dieser Art festgestellt werden. Die Verwendung des Primers C-Not führte auch bei *Lb. buchneri* und *Lb. curvatus* zur Generierung spezifischer SAPD-PCR-Fragmente, welche bei allen getesteten Stämmen vorkamen. Der spezifische Marker von *Lb. buchneri* wies eine Größe von 1077 bp auf, der von *Lb. curvatus* 1696 bp. Bei Verwendung des SAPD-Primers A-Not kam es zur Bildung eines artspezifischen PCR-Produktes von 1383 bp, welches bei allen analysierten *Lb. plantarum*-Stämmen zu finden war. Bei *O. oeni* führte eine SAPD-PCR mit dem Primer G-Not bei allen verwendeten Stämmen zur Bildung eines 1943 bp großen spezifischen Markers. Mit Hilfe des Primers C-Not konnte weiterhin ein charakteristisches Fragment für *W. paramesenteroides* amplifiziert werden. Dieser artspezifische Marker mit der Größe von 1488 bp wurde bei allen Stämmen detektiert. Die Ergebnisse des Screenings nach artspezifischen Markern für sechs weinrelevante Milchsäurebakterien-Arten sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: Mittels SAPD-PCR detektierte artspezifische Marker

Spezies	Verwendeter Primer in der SAPD-PCR	Größe des spezifischen Fragments
<i>Lb. brevis</i>	C-Not	1552 bp
<i>Lb. buchneri</i>	C-Not	1077 bp
<i>Lb. curvatus</i>	C-Not	1696 bp
<i>Lb. plantarum</i>	A-Not	1383 bp
<i>O. oeni</i>	G-Not	1943 bp
<i>W. paramesenteroides</i>	C-Not	1488 bp

3.2.1.2 Entwicklung artspezifischer SCAR-Primer

Die mittels SAPD-PCR gebildeten spezifischen Banden (Abb. 3.8, Tab. 3.3) wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, extrahiert, kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen der PCR-Fragmente (Anhang 8.1.3) wurden zur Ableitung spezifischer Primer genutzt. Die Primer sollten in Kombination mit den von Pfannebecker (2008) entwickelten SCAR-Primern in einer Multiplex-PCR anwendbar sein. Daher wurde bei der Generierung der Primer darauf geachtet, dass diese untereinander keine komplementären

Sequenzen aufwiesen, ähnliche Schmelztemperaturen besaßen und sich die Amplifikationsprodukte in ihrer Größe unterschieden. Die Spezifität der abgeleiteten SCAR-Primerpaare wurde zunächst in getrennten PCR-Reaktionen unter Verwendung zahlreicher Milchsäurebakterien-Stämme überprüft. Die Ergebnisse der durchgeführten SCAR-PCRs, welche zur Auswahl von sechs artspezifischen Primerpaaren führten, sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Spezifitätstest der generierten SCAR-Primer

Spezies (Stamm)	Amplifikat mit dem SCAR-Primerpaar ^a					
	SCAR-LBR-F/R	SCAR-LBU-F/R	SCAR-LCU-F/R	SCAR-LPL-F/R	SCAR-OENI-F/R	SCAR-WPA-F/R
<i>Lb. brevis</i> ¹	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. buchneri</i> ²	-	+	-	-	-	-
<i>Lb. curvatus</i> ³	-	-	+	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i> ⁴	-	-	-	+	-	-
<i>O. oeni</i> ⁵	-	-	-	-	+	-
<i>W. paramesenteroides</i> ⁶	-	-	-	-	-	+
<i>Lb. casei</i> (DSM 20011 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. diolivorans</i> (DSM 14421 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. fructivorans</i> (DSM 20203 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. hilgardii</i> (DSM 20176 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. mali</i> (DSM 20444 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. nagelii</i> (DSM 13675 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. oeni</i> (DSM 19972 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. parabuchneri</i> (DSM 5987)	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. vini</i> (DSM 20605 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. mesenteroides</i> (DSM 20343 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> (DSM 20284 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>P. damnosus</i> (DSM 20331 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>P. inopinatus</i> (DSM 20285 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>P. parvulus</i> (DSM 20332 ^T)	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (DSM 20336 ^T)	-	-	-	-	-	-

+ : Bildung eines PCR-Produktes; - : kein PCR-Produkt; ^a: vergl. Tab. 2.6

¹: positive *Lb. brevis*-Stämme: DSM 20054^T, B18, B26, B37, B173, B184, B252, B253, B259, B260, B261, B262

²: positive *Lb. buchneri*-Stämme: DSM 20057^T, B31, B32, B41, B54B, B73

³: positive *Lb. curvatus*-Stämme: DSM 20019^T, DSM 20010, DSM 20495, DSM 20496

⁴: positive *Lb. plantarum*-Stämme: DSM 20174^T, B35, B36, B102, B118, B137, B156, B157, B163, B164, B181, B182, B189, B193, B201, B227, B250

⁵: positive *O. oeni*-Stämme: B139^T, B70, B236, B241, B246, B325, B350, B351, B352, B353, B354, B358, B359, B367, B377, B378, B417, B418

⁶: positive *W. paramesenteroides*-Stämme: DSM 20288^T, DSM 5623, BFE 6649 (Kostinek et al., 2005)

3.2.1.3 Anwendung artspezifischer SCAR-Primer in einer Multiplex-PCR

Die in dieser Arbeit generierten artspezifischen SCAR-Primer konnten nicht direkt in das bestehende Multiplex-PCR-System (Pfannebecker, 2008) integriert werden. Da einzelne Primer verschiedener Primerpaare zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte führten, war es nötig, zwei getrennte

Reaktionsansätze anzufertigen. Durch die Verwendung von Primer-Mischung A in der Multiplex-PCR konnten *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lc. mesenteroides*, *O. oeni*, *P. damnosus*, *P. parvulus* und *W. paramesenteroides* nachgewiesen werden. Primer-Mischung B enthielt die Primer, die zur Identifikation von *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. hilgardii*, *P. acidilactici*, *P. inopinatus* und *P. pentosaceus* benötigt wurden. Um einheitlich starke PCR-Produkte zu erhalten, wurde die Primerkonzentration einiger Primer erhöht. Weiterhin war es erforderlich dem Reaktionsansatz, bei der Anwendung von Primer-Mischung B, Q-Solution hinzuzufügen.

Mit Hilfe dieser Nachweismethode konnten die 13 Milchsäurebakterien-Arten anhand der Bildung ihres spezifischen PCR-Amplifikats identifiziert werden (Abb. 3.9).

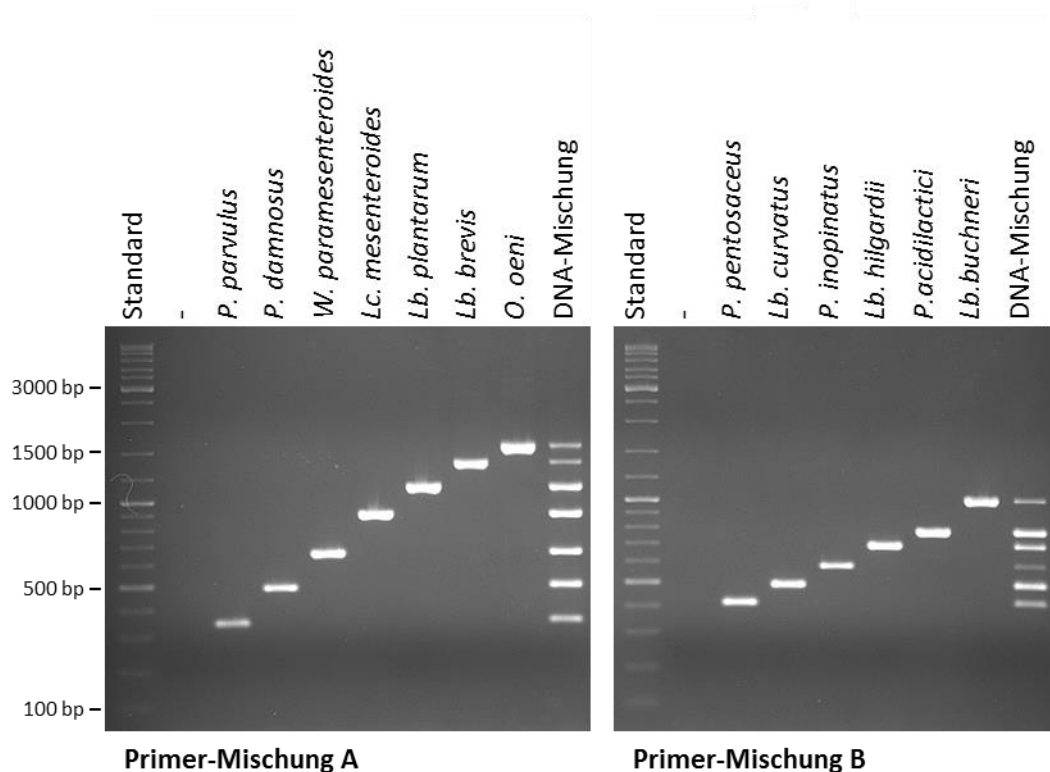


Abb. 3.9: Multiplex-PCR mit artspezifischen SCAR-Primern, welche in zwei getrennte Primer-Mischungen (A und B) aufgeteilt wurden. Als Template wurde die DNA des jeweiligen Typstammes eingesetzt. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo). Die DNA-Mischung setzte sich aus der DNA aller 13 Typstämme zusammen.

Die erwarteten Größen der spezifischen Amplikate, die aus der Multiplex-PCR mit den generierten SCAR-Primern resultierten, können Tabelle 3.5 entnommen werden.

Das optimierte Identifizierungssystem wurde nochmals einem Spezifitätstest unterzogen, um auszuschließen, dass weitere im Wein vorkommende Mikroorganismen zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Hierbei kamen neben den in den Tabellen 3.4 und 3.5 aufgeführten Typstämmen

weitere Milchsäurebakterien (*Lb. fermentum* DSM 20052^T, *Lb. paracasei* B230 und *Lb. rhamnosus* B 1/2-15), einige Essigsäurebakterien (*A. aceti* DSM 3508^T, *A. malorum* DSM 14337^T, *A. tropicalis* DSM15551^T und *G. liquefaciens* DSM 5603^T) sowie eine Hefe (*S. cerevisiae* DSM 70449^T) zum Einsatz.

Tab. 3.5: Größe der spezifischen PCR-Produkte zur Identifikation weinrelevanter Milchsäurebakterien

Spezies (Stamm)	Größe des Amplifikationsprodukts unter Verwendung von	
	Primer-Mischung A	Primer-Mischung B
<i>O. oeni</i> ¹	1588 bp	-
<i>Lb. brevis</i> ¹	1361 bp	-
<i>Lb. plantarum</i> ¹	1113 bp	-
<i>Lc. mesenteroides</i> ²	886 bp	-
<i>W. paramesenteroides</i> ¹	641 bp	-
<i>P. damnosus</i> ³	470 bp	-
<i>P. parvulus</i> ⁴	331 bp	-
<i>Lb. buchneri</i> ¹	-	1007 bp
<i>P. acidilactici</i> ⁵	-	776 bp
<i>Lb. hilgardii</i> ⁶	-	684 bp
<i>P. inopinatus</i> ⁷	-	567 bp
<i>Lb. curvatus</i> ¹	-	480 bp
<i>P. pentosaceus</i> ⁸	-	396 bp

-: kein PCR-Produkt

¹: getestete Stämme siehe Tabelle 3.3

²: positive *Lc. mesenteroides*-Stämme: DSM 20343^T, DSM 20346^T, DSM 20484^T, B27, B29, B39, B113, B114, B117

³: positive *P. damnosus*-Stämme: DSM 20331^T, B7, B8, B9, B12, B14, B15, B16, B47, B68, B69, B78, B89, B91, B93, B97, B98, B99, B451, B452, B455

⁴: positive *P. parvulus*-Stämme: DSM 20332^T, B13, B42, B44, B140, B141, B266, B267, B395, B397, B398, B399, B400, B401, B404, B405, B427, B428, B440, B441, B442, B443, B444, B445, B446, B447, B448, B449, B450, B453, B454, B456, B457, B458, B459, B460

⁵: positive *P. acidilactici*-Stämme: DSM 20284^T, DSM 1056, B473, B702

⁶: positive *Lb. hilgardii*-Stämme: DSM 20176^T, B146, B268, B271, B272, B706

⁷: positive *P. inopinatus*-Stämme: DSM 20285^T, DSM 20287^T

⁸: positive *P. pentosaceus*-Stämme: DSM 20336^T, B123, B125, B254, B474, B475

²⁻⁸: einige dieser Stämme wurden in der Arbeit von Pfannebecker (2008) getestet

3.2.1.4 Ermittlung der Nachweisgrenze des Multiplex-PCR-Systems

Für die praktische Anwendung einer mikrobiellen Identifizierungsmethode ist die Kenntnis über die minimale, nachweisbare Zellzahl von Bedeutung. Um die Nachweisgrenze der hier entwickelten Multiplex-PCR zu ermitteln, wurden sterile Most- und Weinproben mit Stämmen verschiedener Milchsäurebakterien-Arten versetzt. Hierzu wurden Reinkulturen von *Lb. plantarum* B35, *Lb. brevis* B18 und *Lb. hilgardii* DSM 20176^T auf 10⁸ Zellen/ml eingestellt. Danach wurden die Proben dekadisch verdünnt. Jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe wurde zur DNA-Isolierung und anschließender Multiplex-PCR verwendet. Die getesteten Stämme konnten bis zu einer Zellzahl zwischen 10⁴ und 10⁵ Zellen/ml zuverlässig nachgewiesen werden (Abb. 3.10).

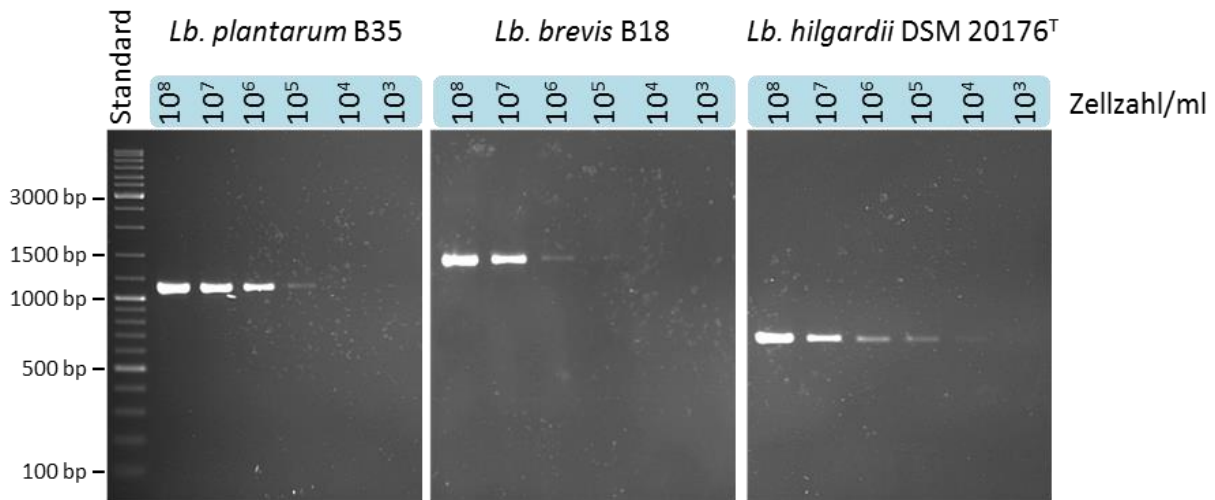


Abb. 3.10: Nachweis verschiedener Zelltiter der Stämme *Lb. plantarum* B35, *Lb. brevis* B18 und *Lb. hilgardii* DSM 20176^T mittels Multiplex-PCR. Die Zellzahlen wurden in sterilem Wein eingestellt. Anschließend wurde jeweils 1 ml zur DNA-Extraktion verwendet. Standard: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo), ^T: Typstamm.

Weiterhin kamen künstliche Mischkulturen, bei denen die Zellzahl der unterschiedlichen Stämme variierte, zum Einsatz. Eine Mischkultur aus *Lb. brevis* B18, *Lb. plantarum* DSM 20174^T und *P. parvulus* B841 mit den jeweiligen Ausgangszellzahlen von 10^8 , 10^6 bzw. 10^7 Zellen wurde dekadisch mit sterilem Most verdünnt. Von einem ml jeder Verdünnungsstufe wurde DNA extrahiert, welche für die Multiplex-PCR als Template verwendet wurde (Abb. 3.11A).

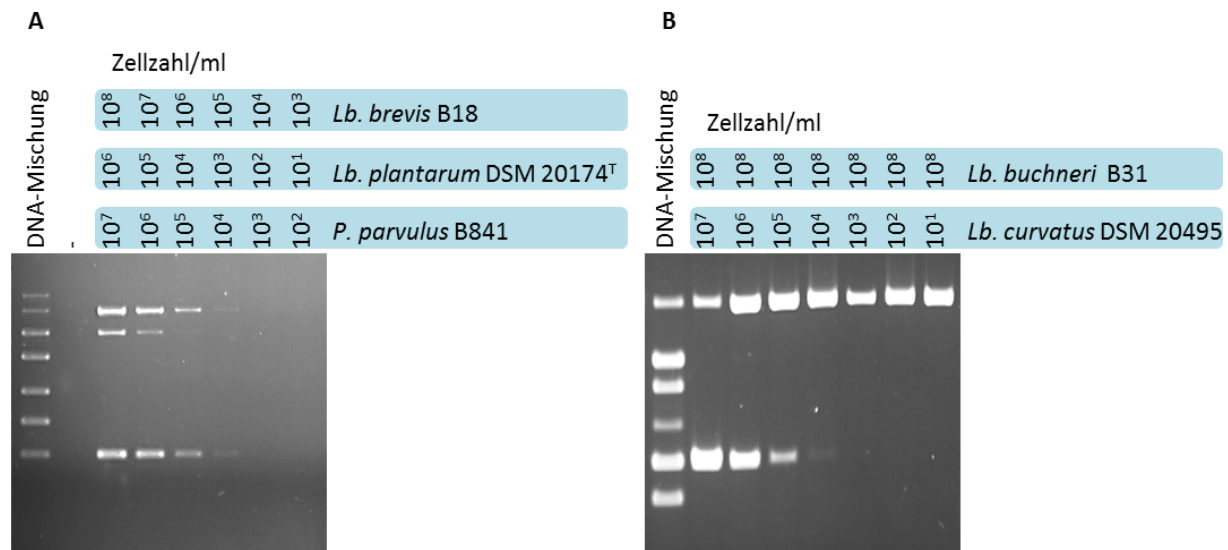


Abb. 3.11: Ermittlung der Nachweisgrenze der Multiplex-PCR in einem mit *Lb. brevis* B18, *Lb. plantarum* DSM 20174^T und *P. parvulus* B841 (A) oder *Lb. buchneri* B31 und *Lb. curvatus* DSM 20495 (B) versetzten Most. Zur DNA-Extraktion wurde jeweils 1 ml Probe verwendet. DNA-Mischung: DNA aller 13 Typstämme (vergl. Abb. 3.9), ^T: Typstamm.

Eine weitere Mischkultur, bei der die Zellzahl des Stammes *Lb. buchneri* B31 konstant 10^8 Zellen/ml betrug und die eines zweiten Stammes (*Lb. curvatus* DSM 20495) zwischen 10^1 und 10^7 Zellen/ml variierte, wurde mittels Multiplex PCR untersucht (Abb. 3.11B). Die Versuche zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Mischkulturen lieferten ähnliche Ergebnisse wie die in Reinkulturen, auch hier konnten Zelltitern von 10^4 bis 10^5 Zellen/ml nachgewiesen werden.

3.2.1.5 Praktische Anwendung der Schnellidentifizierungsmethode

Anhand 21 verschiedener Weinproben (Tab. 2.5), welche bei Winzern in Rheinhessen gesammelt wurden, sollte das entwickelte Nachweisverfahren auf seine Praxistauglichkeit getestet werden. Der bakterielle Titer der Jungweine wurde über das Auszählen von Kolonie bildenden Einheiten (KBE) auf cycloheximidhaltigen Agar-Platten bestimmt. Zur Extraktion der DNA wurden jeweils 1 ml und 10 ml

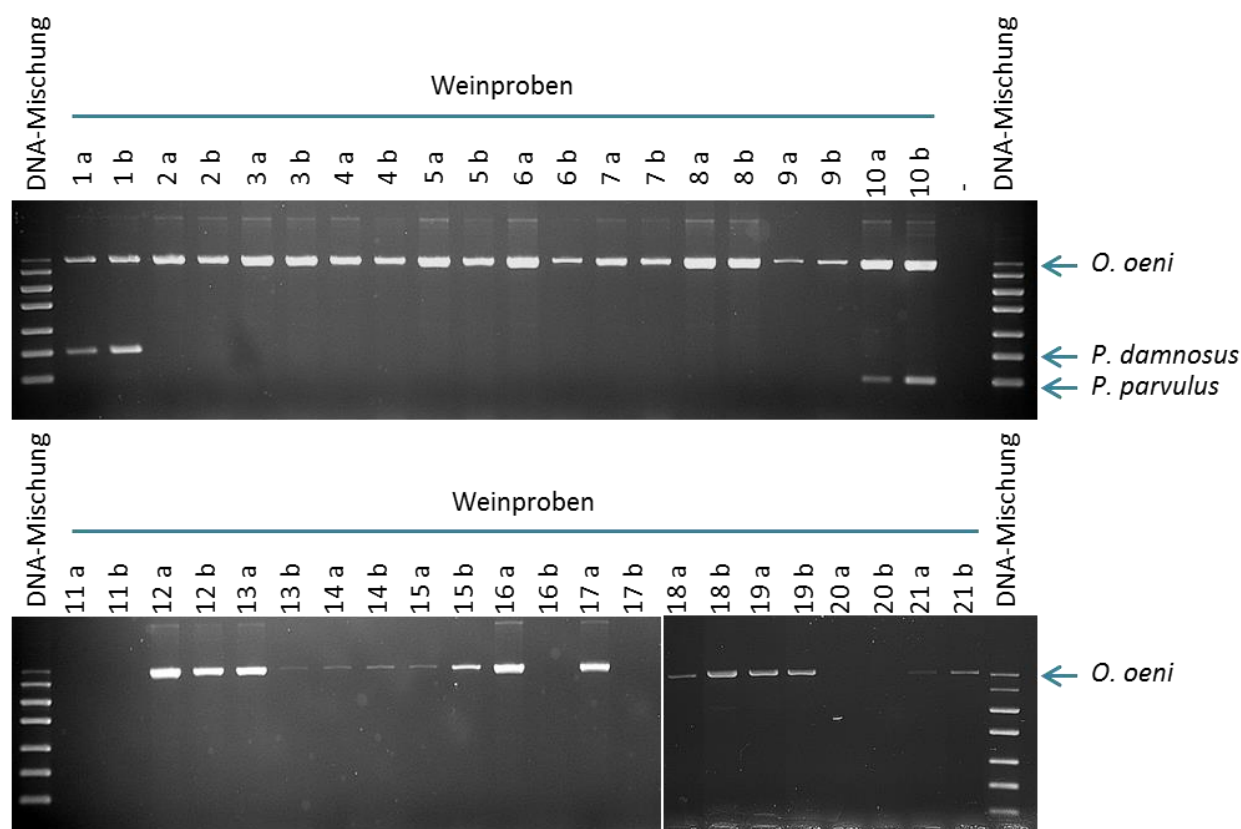


Abb. 3.12: Praxistest der Schnellidentifizierung mittels Multiplex-PCR. Zur DNA-Extraktion aus den 21 verschiedenen Jungweinen wurden jeweils 1 ml (a) und 10 ml (b) Probe verwendet. Bei der anschließenden Multiplex-PCR mit der Primer-Mischung A konnten für *O. oeni*, *P. damnosus* und *P. parvulus* spezifische PCR-Produkte amplifiziert werden. Milchsäurebakterien, welche mit Primer-Mischung B nachgewiesen werden, wurden in den Proben nicht detektiert (in Abbildung nicht dargestellt). DNA-Mischung: DNA der 13 Typstämme (vergl. Abb. 3.9).

jeder Weinprobe verwendet. Anschließend wurde eine Multiplex-PCR mit der isolierten Gesamt-DNA durchgeführt. In 19 der 21 Jungweine konnte ein spezifisches Amplifikat für *O. oeni* gebildet werden. In einer der Weinproben wurde darüber hinaus *P. parvulus* nachgewiesen, wohingegen in einer weiteren Weinprobe ein spezifisches PCR-Produkt für *P. damnosus* amplifiziert wurde (Abb. 3.12). In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse des Praxistests zusammengefasst.

Tab. 3.6: Praxistest des Multiplex-PCR-basierten Nachweisverfahrens mit 21 verschiedenen Jungweinproben

Weinprobe ^a	Bakterielle Zellzahl (KBE/ml)	Mittels Multiplex-PCR detektierte Milchsäurebakterien-Arten
1	4 x 10 ⁴	<i>O. oeni</i> , <i>P. damnosus</i>
2	5 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
3	1 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i>
4	2 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i>
5	1 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i>
6	3 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i>
7	5 x 10 ⁴	<i>O. oeni</i>
8	8 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
9	7 x 10 ⁴	<i>O. oeni</i>
10	5 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i> , <i>P. parvulus</i>
11	9 x 10 ²	-
12	8 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
13	3 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
14	7 x 10 ²	<i>O. oeni</i>
15	2 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
16	3 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
17	3 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i>
18	3 x 10 ⁵	<i>O. oeni</i>
19	6 x 10 ⁶	<i>O. oeni</i>
20	6 x 10 ³	-
21	9 x 10 ²	<i>O. oeni</i>

-: in diesen Weinproben konnten keine Milchsäurebakterien mittels Multiplex-PCR nachgewiesen werden

^a: vergl. Tab. 2.5

Die gebildeten spezifischen PCR-Produkte der Weinproben 1 und 10 wurden zur Überprüfung aus dem Gel eluiert, reamplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen der oberen Banden beider Proben stimmten zu 100 % mit der erwarteten Sequenz von *O. oeni* überein. Die Sequenz der unteren Bande aus Weinprobe 1 zeigte 99,8 % Übereinstimmung mit der Sequenz des Fragments aus *P. damnosus*. Die DNA-Sequenz der unteren Bande aus Weinprobe 10 entsprach zu 99,3 % der bekannten Sequenz aus *P. parvulus*.

Um die Ergebnisse des Praxistests zu stützen, sollten aus einigen ausgewählten Weinproben (1, 3, 5, 6, 10) Milchsäurebakterien isoliert werden. Hierzu wurden die Agar-Platten, welche zur KBE-Bestimmung dienen, verwendet. Morphologisch unterschiedlich aussehende Kolonien wurden in Flüssigmedium

überführt und anschließend weiter vereinzelt. Insgesamt wurden aus den fünf Jungweinen 48 bakterielle Kulturen isoliert, deren Identifizierung mittels SAPD-PCR erfolgte. Anhand ihrer charakteristischen Bandenmuster ließen sich die Isolate in Gruppen einteilen (Abb. 3.13). Von jeder Gruppe wurde mindestens ein Isolat ausgewählt und dessen 16S rDNA sequenziert (Anhang 8.1.4). Anschließend wurde diese Sequenz mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen.

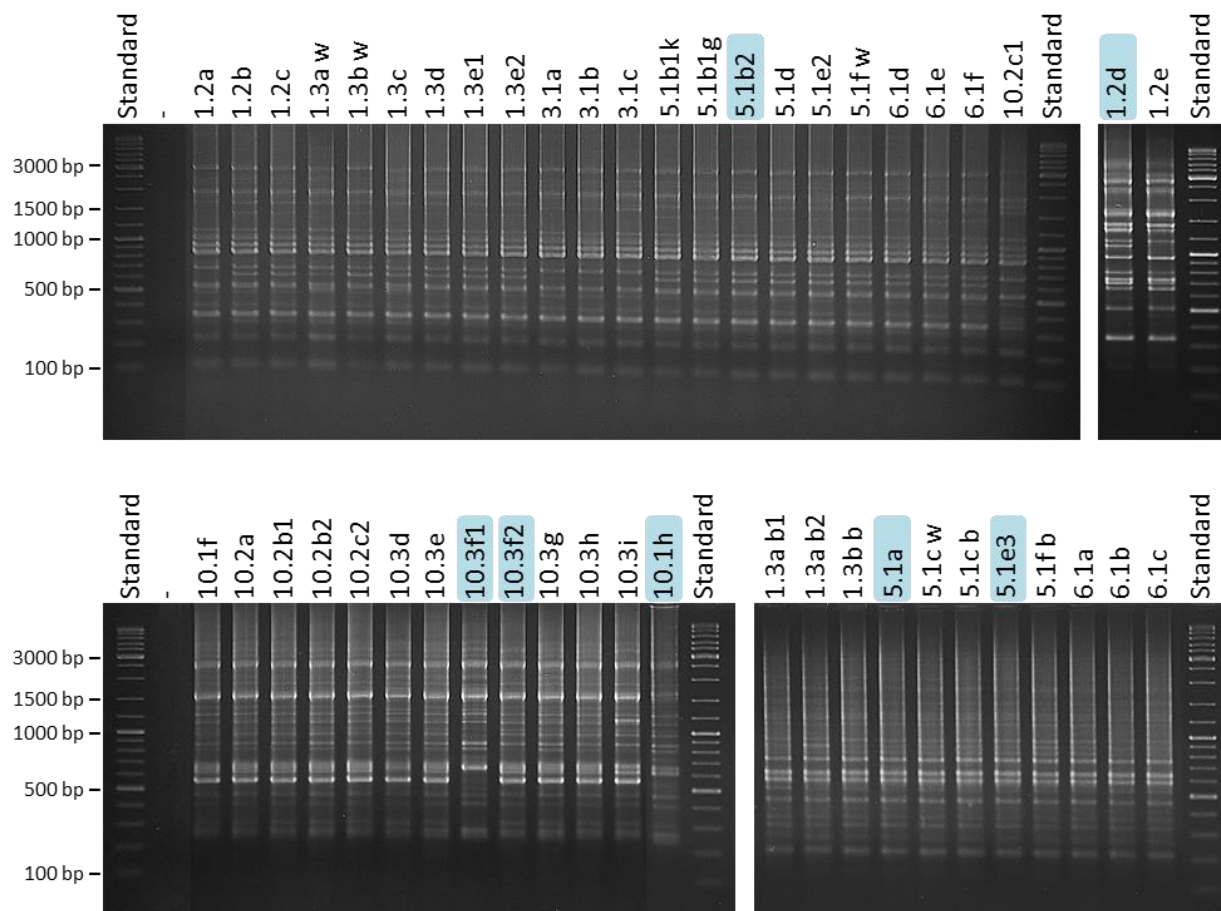


Abb. 3.13: Identifizierung der Isolate mittels SAPD-PCR mit dem Primer G-Not. Die verschiedenen Isolate wurden anhand ihres charakteristischen Bandenmusters sortiert. Von ausgewählten Isolaten (blau markiert) wurde die 16S rDNA ansequenziert. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo).

Aus allen fünf Weinproben konnte *O. oeni* isoliert werden. Zwei der Isolate, welche aus Weinprobe Nr. 1 stammten, konnten als *P. damnosus* identifiziert werden. Zahlreiche Isolate aus Weinprobe Nr. 10 konnten der Art *P. parvulus* zugeordnet werden. Neben diesen Milchsäurebakterien wurden auch einige Essigsäurebakterien aus den meisten Weinproben isoliert; diese konnten anhand der 16S rDNA-Sequenzierung der Gattung *Acetobacter* zugeordnet werden. Die genauere Identifizierung dieser Stämme wurde von Kristina Wirth mit Hilfe einer Multiplex-PCR mit spezifischen Primern zum Nachweis von Essigsäurebakterien durchgeführt (Wirth, persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit isolierten

Stämme wurden in der Stammsammlung des IMW hinterlegt. Die Ergebnisse der Identifizierung der Isolate sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tab. 3.7: Identifizierung der Isolate aus Weinproben

Weinprobe ^a	Isolat (Art)	Stamm-Nr (IMW)	Identifizierungsmethode
1	1.2a (<i>O. oeni</i>)	B976	SAPD-PCR
	1.2b (<i>O. oeni</i>)	B977	SAPD-PCR
	1.2c (<i>O. oeni</i>)	-	SAPD-PCR
	1.3a w (<i>O. oeni</i>)	B981	SAPD-PCR
	1.3b w (<i>O. oeni</i>)	B978	SAPD-PCR
	1.3c (<i>O. oeni</i>)	B982	SAPD-PCR
	1.3d (<i>O. oeni</i>)	B979	SAPD-PCR
	1.3e1 (<i>O. oeni</i>)	-	SAPD-PCR
	1.3e2 (<i>O. oeni</i>)	B980	SAPD-PCR
	1.2d (<i>P. damnosus</i>)	-	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung
	1.2e (<i>P. damnosus</i>)	-	SAPD-PCR
	1.3a b1 (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B987	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	1.3a b2 (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B988	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	1.3b b (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B989	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	3	3.1a (<i>O. oeni</i>)	-
3.1b (<i>O. oeni</i>)		B983	SAPD-PCR
3.1c (<i>O. oeni</i>)		B984	SAPD-PCR
5	5.1b 1k (<i>O. oeni</i>)	B985	SAPD-PCR
	5.1b 1g (<i>O. oeni</i>)	B986	SAPD-PCR
	5.1b2 (<i>O. oeni</i>)	-	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung
	5.1d (<i>O. oeni</i>)	-	SAPD-PCR
	5.1e2 (<i>O. oeni</i>)	B975	SAPD-PCR
	5.1f w (<i>O. oeni</i>)	-	SAPD-PCR
	5.1a (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B990	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung, Multiplex-PCR ¹
	5.1c w (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B991	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	5.1c b (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B992	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	5.1e3 (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B993	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung, Multiplex-PCR ¹
5.1f b (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B994	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹	
6	6.1a (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B995	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	6.1b (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B996	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	6.1c (<i>A. malorum/A. cerevisiae</i>)	B997	SAPD-PCR, Multiplex-PCR ¹
	6.1d (<i>O. oeni</i>)	B972	SAPD-PCR
	6.1e (<i>O. oeni</i>)	B973	SAPD-PCR
	6.1f (<i>O. oeni</i>)	B974	SAPD-PCR
10	10.1f (<i>P. parvulus</i>)	B960	SAPD-PCR
	10.1h (<i>P. parvulus</i>)	B970	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung
	10.2a (<i>P. parvulus</i>)	B961	SAPD-PCR
	10.2b1 (<i>P. parvulus</i>)	B962	SAPD-PCR
	10.2b2 (<i>P. parvulus</i>)	B963	SAPD-PCR
	10.2c2 (<i>P. parvulus</i>)	B964	SAPD-PCR
	10.3d (<i>P. parvulus</i>)	B965	SAPD-PCR
	10.3e (<i>P. parvulus</i>)	-	SAPD-PCR
	10.3f1 (<i>P. parvulus</i>)	B966	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung
	10.3f2 (<i>P. parvulus</i>)	-	SAPD-PCR, 16S rDNA-Sequenzierung
	10.3g (<i>P. parvulus</i>)	B967	SAPD-PCR
	10.3h (<i>P. parvulus</i>)	B968	SAPD-PCR
	10.3i (<i>P. parvulus</i>)	B969	SAPD-PCR

Fortsetzung Tab. 3.7: Identifizierung der Isolate aus Weinproben

Wein- probe ^a	Isolat (Art)	Stamm-Nr (IMW)	Identifizierungsmethode
10	10.2c1 (<i>O. oeni</i>)	B971	SAPD-PCR

^a: vergl. Tab. 2.5

¹: die Multiplex-PCR zur Identifizierung der Essigsäurebakterien wurde von Kristina Wirth durchgeführt (Wirth, persönliche Mitteilung)

-: das Isolat ist nach mehrmaligem Überimpfen nicht mehr angewachsen

3.2.2 Nachweis und Differenzierung weinrelevanter Milchsäurebakterien unter Verwendung der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese

Zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften mit Hilfe der DGGE werden häufig 16S rDNA basierte Primer verwendet. Da die ribosomalen Gene oft in mehreren Kopien im Genom vorliegen, kann es hierbei zur Entstehung multipler Banden kommen. Um dies zu vermeiden, können alternative Zielgene, wie *rpoB* (β -Untereinheit der RNA Polymerase) herangezogen werden (Renouf et al., 2006a; Rantsiou et al., 2004; Dahllöf et al., 2000). Die in vorhergehenden Arbeiten beschriebenen Primer zur Amplifikation verschiedener Teilbereiche von *rpoB* (Renouf et al., 2006b; Dahllöf et al., 2000) konnten mit den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen teilweise nicht zuverlässig angewandt werden. Auf der Grundlage bekannter *rpoB*-Sequenzen einiger Milchsäurebakterien-Arten (Anhang 8.1.5) wurden Primerpaare abgeleitet und hinsichtlich ihrer Eignung für eine Differenzierung mittels DGGE getestet. Mit Hilfe der beiden Primer ropB-F und rpoB-R war die Amplifikation eines 512 bp großen DNA-Fragments von allen in dieser Arbeit untersuchten weinrelevanten Milchsäurebakterien-Arten möglich. Die PCR-Produkte der Essigsäurebakterien-Stämme *A. aceti* DSM 3508^T, *A. tropicalis* DSM 15551^T und *G. liquefaciens* DSM 5603^T, die zur Kontrolle mitgeführt wurden, waren deutlich größer (ca. 900 bp) als die der Milchsäurebakterien, was eine Unterscheidung dieser beiden Bakteriengruppen bereits nach diesem Schritt erlaubt. Die Amplifikate der Milchsäurebakterien wurden anschließend in einem Polyacrylamid-Gradientengel separiert, wobei die beste Auftrennung unter Verwendung eines denaturierenden Gradienten von 25 % - 50 % erreicht werden konnte (Abb. 3.14).

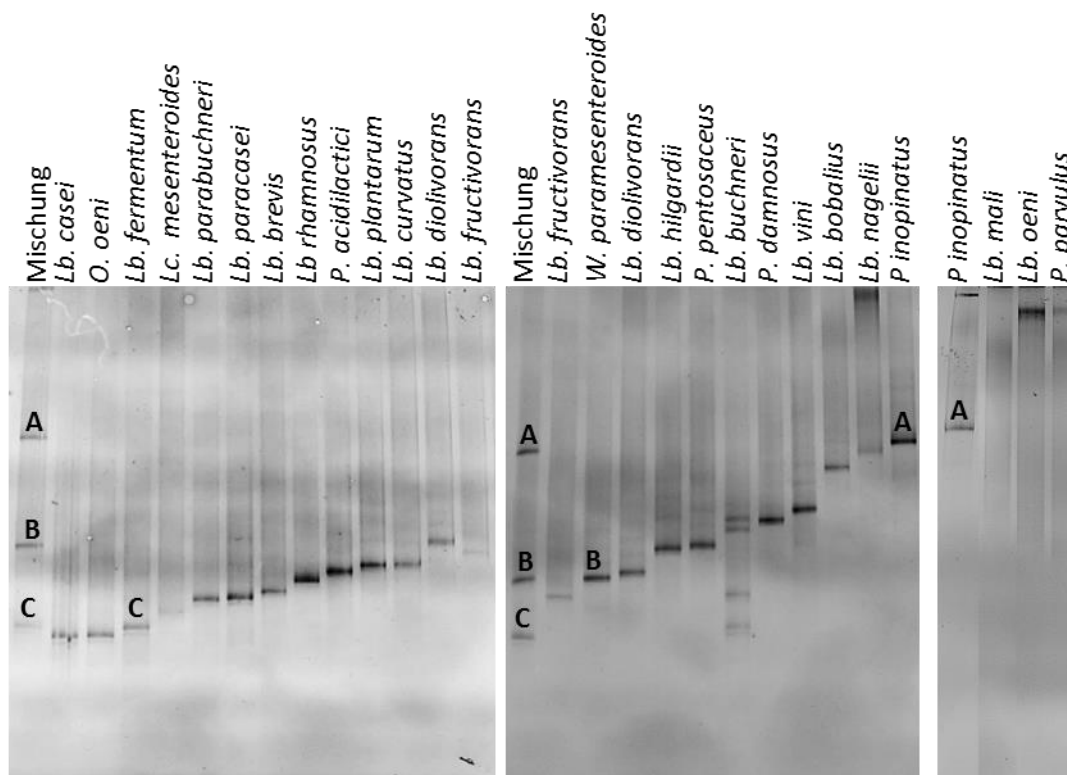


Abb. 3.14: DGGE-Analyse eines 512 bp langen Teilbereichs des *rpoB*-Gens verschiedener weinassoziierter Milchsäurebakterien. Bei der Mischung handelte es sich um ein Gemisch der PCR-Produkte von *P. inopinatus* (A), *W. paramesenteroides* (B) und *Lb. fermentum* (C). Mit Ausnahme der folgenden Stämme wurden jeweils die Typstämme verwendet: *Lb. curvatus* DSM 20495, *Lb. parabuchneri* DSM 5987, *Lb. paracasei* B230, *Lb. rhamnosus* B 1/2-15, *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* DSM 20346^T, *W. paramesenteroides* DSM 5623.

Die einzelnen Milchsäurebakterien-Arten ließen sich aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens der PCR-Produkte eindeutig voneinander differenzieren. Bei den Arten *Lb. buchneri*, *Lb. nagelii* und *P. inopinatus* war das Auftreten mehrerer Banden zu beobachten. Unter den gewählten Bedingungen konnte für *Lb. mali* keine distinkte Bande gebildet werden.

Die beschriebene DGGE-Methode wurde herangezogen, um einige der Jungweinproben, welche bereits mittels Multiplex-PCR analysiert wurden, auf ihre mikrobielle Biodiversität zu untersuchen. Die aufgrund der Multiplex-PCR in diesen Weinproben zu erwartenden Milchsäurebakterien-Arten *O. oeni*, *P. damnosus* und *P. parvulus* wurden ebenfalls mitgeführt (Abb. 3.15).

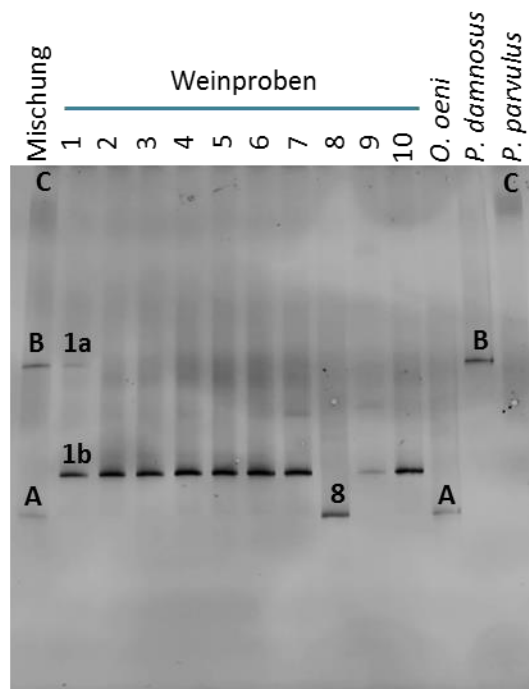


Abb. 3.15: DGGE-Analyse von verschiedenen Jungweinproben auf Basis eines Teilbereichs des *rpoB*-Gens. Mischung: Gemisch der PCR-Produkte von *O. oeni* B139^T (A), *P. damnosus* DSM 20331^T (B) und *P. parvulus* DSM 20332^T (C). Die Banden 1a, 1b und 8 konnten nach dem Ausschneiden reamplifiziert und sequenziert werden.

In allen Proben war eine deutliche Bande in der unteren Hälfte des Gels feststellbar. Die Bande der Weinprobe Nr. 8 kam etwas tiefer zum Liegen, als die der übrigen Weinproben und befand sich auf gleicher Höhe mit der Bande von *O. oeni* B139^T. Die Sequenzierung dieser Bande ergab eine Übereinstimmung von 97 % zu *O. oeni* PSU-1. Auch die höhere Bande 1b konnte *O. oeni* zugeordnet werden; ihre Sequenz zeigte 100 % Übereinstimmung zu *O. oeni* PSU-1. Der Vergleich der beiden Sequenzen ist im Anhang (8.1.6) dargestellt. In Weinprobe Nr. 1 war eine weitere Bande (1a) vorhanden, deren Sequenz (Anhang 8.1.6) keine hohe Übereinstimmung mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen aufwies, jedoch war diese Bande auf der gleichen Höhe wie die Bande von *P. damnosus* DSM 20331^T zu finden. Die Art *P. parvulus*, welche mittels Multiplex-PCR und Isolierung in Weinprobe Nr. 10 nachgewiesen wurde, konnte mit dieser Methode in keiner der Weinproben detektiert werden.

3.2.3 Stamm-Differenzierung von *Oenococcus oeni* mittels nSAPD-PCR und MALDI-TOF-MS

Für einige Anwendungen, beispielsweise im Bereich der Nahrungsmittelindustrie, ist eine Identifizierung auf Art-Ebene nicht immer ausreichend. Auch während der Weinherstellung werden des Öfteren

sogenannte Starterkulturen verwendet. Das Milchsäurebakterium *O. oeni*, welches beim biologischen Säureabbau von Bedeutung ist, wird häufig nach Abschluss der alkoholischen Fermentation zugesetzt. Um die Sicherheit und Qualität des Endproduktes zu gewährleisten, ist es erforderlich, einzelne Stämme differenzieren zu können. Hierfür kommen Methoden in Frage, welche einerseits äußerst sensitiv gegenüber geringen genotypischen Unterschieden sind, jedoch andererseits eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen. Die nSAPD-PCR (Pfannebecker, 2008; Fröhlich & Pfannebecker, 2007) ist eine Methode, die diesen Anforderungen entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf Stämme der Art *O. oeni* mittels nSAPD-PCR und anschließender Cluster-Analyse untersucht. Parallel hierzu wurden die gleichen Stämme in der Arbeitsgruppe von Dr. Jan Küver (MPA, Bremen) durch Dr. Andreas Rabenstein mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Von besonderem Interesse war es, die Ergebnisse beider Methoden miteinander zu vergleichen. Eine SAPD-PCR unter Verwendung des Primers C-Not führte zu einem für *O. oeni* charakteristischen Bandenmuster (Abb. 3.16). Bereits hier war erkennbar, dass einige Stämme geringfügige Unterschiede in ihrem SAPD-Muster aufwiesen.

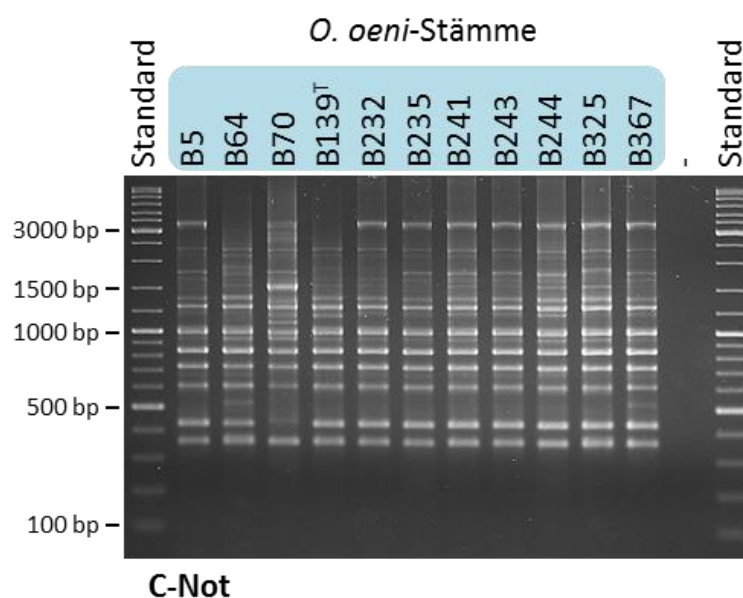


Abb. 3.16: SAPD-PCR mit verschiedenen *O. oeni*-Stämmen. Zur Amplifikation wurde der Primer C-Not verwendet. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo). ^T: Typstamm.

Die entstandenen PCR-Produkte der SAPD-PCR wurden anschließend als Template in einer nSAPD-PCR mit den Primern C-Not-A, C-Not-C und C-Not-T (Abb. 3.17) eingesetzt. Bei Verwendung des Primers C-Not-G in der nested PCR konnten keine stammspezifischen Unterschiede detektiert werden (in Abbildung nicht dargestellt).

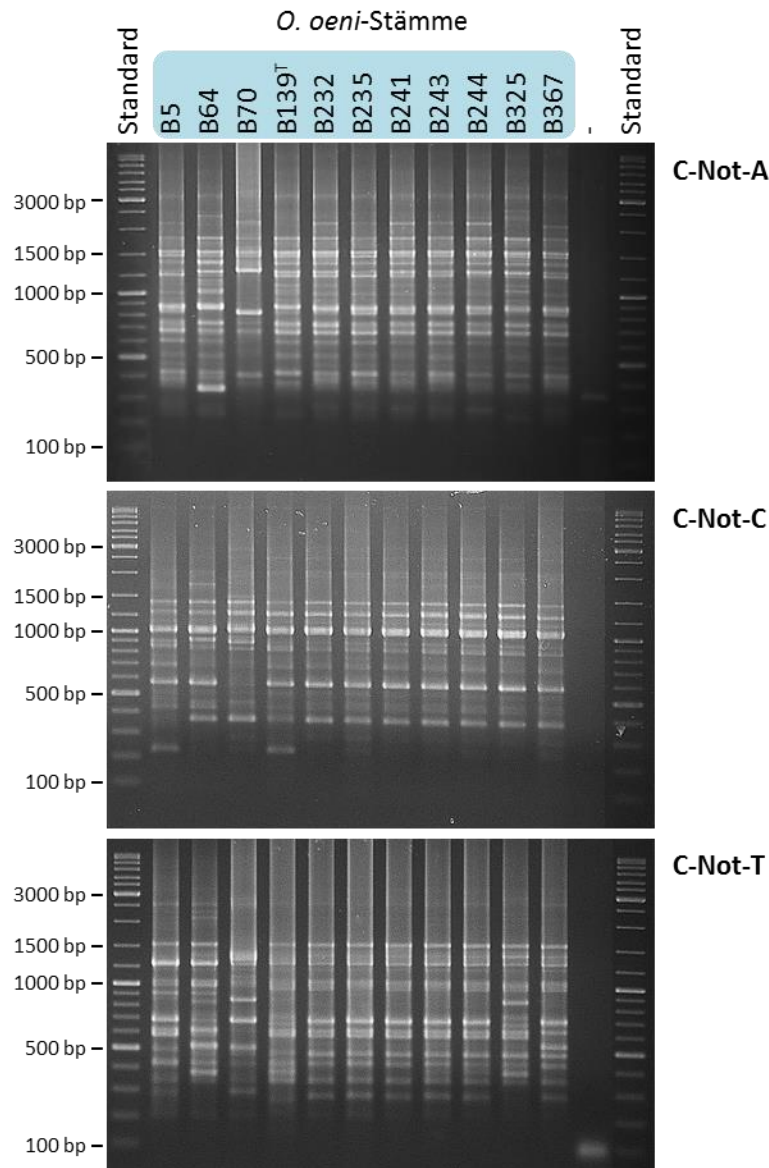


Abb. 3.17: nSAPD-PCR mit verschiedenen *O. oeni*-Stämmen zur Cluster-Analyse mit den Primern C-Not-A, C-Not-C und C-Not-T. Als Standard diente GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo). ^T: Typstamm.

Zur Cluster-Analyse wurden die Bandenmuster der nSAPD-PCR mit Hilfe der Software Bio-1D (Vilber-Lourmat) ausgewertet. Die amplifizierten Fragmente wurden anhand ihrer Sequenzlänge sortiert und anschließend in eine 1/0-Datenmatrix konvertiert (Tabellen 8.2 (Anhang 8.2) und 8.4 (Anhang 8.3)). Die resultierende Datenmatrix mit 62 Positionen wurde dazu verwendet einen Cluster-Baum zu berechnen (Abb. 3.18).

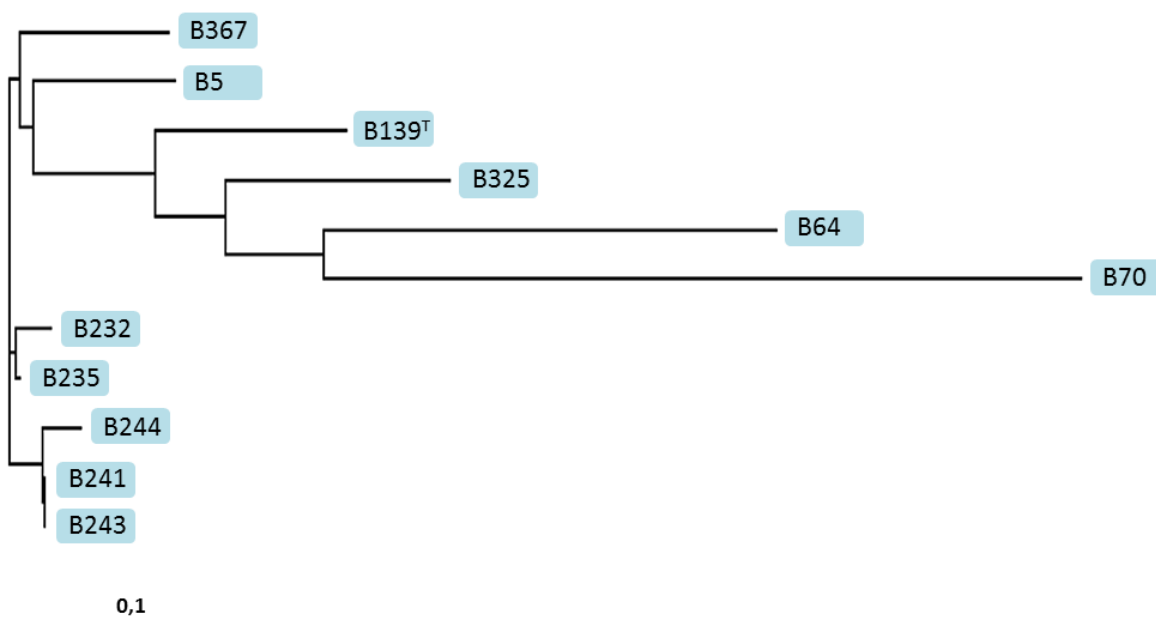


Abb. 3.18: Cluster-Analyse verschiedener *O. oeni*-Stämme auf Grundlage der nSAPD-PCR mit den Primern C-Not-A, C-Not-C und C-Not-T. Der Stammbaum wurde anhand einer Datenmatrix mit 62 Positionen unter Verwendung des Neighbor-Joining Algorithmus berechnet. Der Maßstab entspricht 10 % Merkmalsunterschied. ^T: Typstamm.

Die meisten der getesteten *O. oeni* Stämme konnten mit Hilfe der nSAPD-PCR eindeutig voneinander differenziert werden. Die Anordnung der Stämme im Cluster-Baum ließ sich zudem mit deren Herkunft korrelieren (vergl. Tab. 2.8). Der Stamm B70, welcher die größte genetische Distanz zu den anderen Stämmen aufwies, war auf dem gleichen Ast zu finden wie der Stamm B64, der aus einem Wein des gleichen Weinanbaugebietes isoliert wurde. Die Stämme B5, B325, B367 sowie der Typstamm B139^T stammen aus Weinen unterschiedlicher Anbaugebiete. Eine hohe genetische Ähnlichkeit konnte zwischen den Stämmen B232, B235, B241, B243 und B244 festgestellt werden, welche aus Weinen der gleichen Winzergenossenschaft isoliert wurden. Die Stämme B241 und B243 wiesen bei der Verwendung aller nSAPD-Primer identische Bandenmuster auf und ließen sich daher mit Hilfe dieser Methode nicht voneinander differenzieren.

Mittels MALDI-TOF-MS-Analyse der elf *O. oeni*-Stämme konnten spezifische Massenspektren generiert werden, die als Referenzspektren in die Biotyper-Datenbank aufgenommen wurden, da dort bisher keine Einträge von Isolaten dieser Art hinterlegt waren. Die erzeugten Spektren wiesen eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die erzielten „score“-Werte beim Abgleich der Spektren untereinander lagen in der Regel über 2 (Tab. 3.8), daher war eine korrekte Zuordnung aller Stämme zur Art *O. oeni* möglich. Zwar waren die Massenspektren einiger Stämme teilweise recht ähnlich zueinander, dennoch konnten auch in diesem Fall für die einzelnen Stämme Distanzwerte errechnet werden, die die Erstellung eines Dendrogramms und somit eine Differenzierung auf Stamm-Ebene ermöglichten.

Tab. 3.8: Ermittelte „score“-Werte der MALDI-TOF-MS-Spektren verschiedener *O. oeni*-Stämme

Stamm	„score“-Werte ^a von Massenspektren der folgenden Referenzstämme										
	B5	B64	B70	B139 ^T	B232	B235	B241	B243	B244	B325	B367
B5	3,000	2,440	2,199	2,507	2,692	2,652	2,763	2,685	2,759	2,282	2,560
B64	2,440	3,000	2,274	2,384	2,478	2,333	2,360	2,381	2,397	2,217	2,305
B70	2,212	2,274	3,000	2,245	2,271	2,163	2,156	2,173	2,151	1,949	2,089
B139 ^T	2,506	2,382	2,242	3,000	2,604	2,497	2,555	2,617	2,625	2,220	2,523
B232	2,682	2,463	2,254	2,593	3,000	2,694	2,755	2,787	2,700	2,426	2,611
B235	2,646	2,309	2,150	2,480	2,687	3,000	2,706	2,691	2,710	2,316	2,578
B241	2,757	2,337	2,144	2,545	2,755	2,714	3,000	2,742	2,818	2,318	2,661
B243	2,678	2,373	2,163	2,608	2,791	2,707	2,745	3,000	2,802	2,287	2,610
B244	2,746	2,376	2,127	2,612	2,695	2,716	2,818	2,798	3,000	2,342	2,707
B325	2,277	2,202	1,940	2,215	2,433	2,320	2,317	2,287	2,349	3,000	2,433
B367	2,542	2,283	2,061	2,500	2,611	2,577	2,658	2,605	2,708	2,315	3,000

^a: der „score“-Wert gibt die Validität eines Treffers in der Datenbank an (vergl. Kap. 3.1.2)

In dem auf Grundlage dieser Spektren erzeugten Dendrogramm (Abb. 3.19) wird deutlich, dass die Stämme B325, B70 und B64 eine recht hohe Distanz zu den übrigen Stämmen aufwiesen. Die weiteren acht *O. oeni*-Stämme bildeten ein loses Cluster, in dem weitere Untergruppen zu erkennen waren. Eine Korrelation zwischen der Herkunft eines Isolats und der ermittelten Distanz aufgrund der MALDI-TOF-MS-Analyse ist allerdings nur bedingt möglich. Die drei Stämme B232, B243 und B244, welche aus Wein der gleichen Winzergenossenschaft isoliert wurden, wiesen eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Allerdings

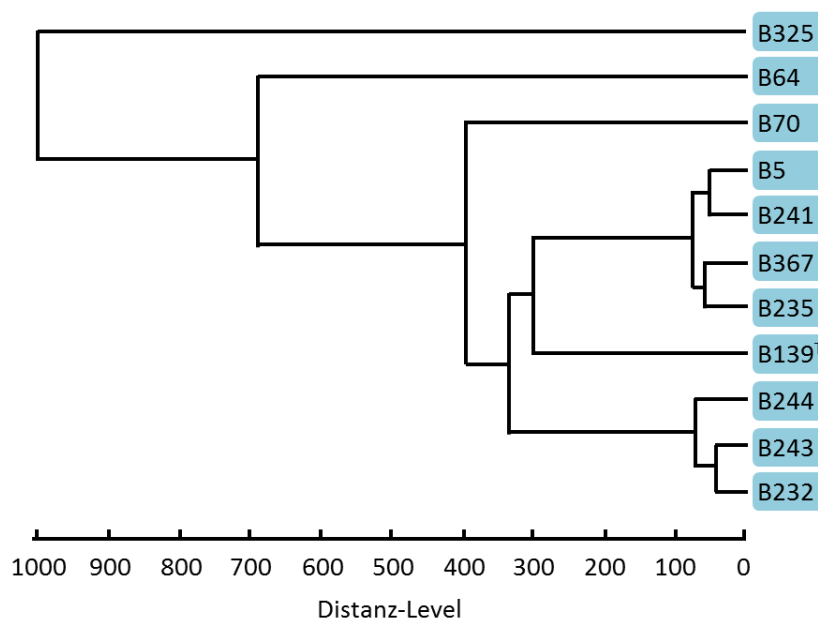


Abb. 3.19: Auf Grundlage von MALDI-TOF-MS-Spektren generiertes Dendrogramm elf verschiedener *O. oeni*-Stämme. Die Berechnung des Cluster-Baums wurde mit Hilfe der Software MALDI Biotyper (Version 3.1) von Dr. Andreas Rabenstein (MPA, Bremen) durchgeführt. Hierzu wurden die aus den verschiedenen Massenspektren der einzelnen Stämme errechneten Distanzwerte verwendet. ^T: Typstamm.

gruppierten die beiden Stämme B241 und B235, welche ebenfalls aus Wein dieser Winzergenossenschaft stammen, jeweils mit Stämmen anderer Herkunft.

4 DISKUSSION

Hefearten, welche der Gattung *Saccharomyces* angehören, und Milchsäurebakterien sind bei der Weinbereitung von besonderer Bedeutung. Neben der alkoholischen Gärung sind Hefen an der Ausbildung von Aromastoffen beteiligt. Milchsäurebakterien spielen eine Rolle beim biologischen Säureabbau, können jedoch aufgrund ihrer Stoffwechseleigenschaft weitere Aromamodifikationen bewirken. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Flora zu verschiedenen Zeitpunkten der Weinbereitung hat jedoch auch einen direkten Einfluss auf die Qualität der Weine, welche sich sowohl positiv als auch negativ verändern kann. Aus diesem Grund ist eine eindeutige Identifizierung verschiedener Mikroorganismen auf Art- aber auch Stamm-Ebene von großer Bedeutung. Hierzu wurden in der Vergangenheit bereits verschiedene molekularbiologische und biochemische Verfahren entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten einige dieser Verfahren erweitert und optimiert werden und bezüglich ihrer Eignung miteinander verglichen werden.

4.1 Differenzierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces*

Nach Vaughan-Martini und Martini (2011) gehören der Gattung *Saccharomyces* folgende Spezies an: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* und *S. pastorianus*, wobei im Falle der Art *S. bayanus* zwischen zwei Varietäten (var. *bayanus* und var. *uvarum*) unterschieden wird. Libkind et al. (2011) gelang es kürzlich, in patagonischen Wäldern Vertreter der neuen Art *S. eubayanus* zu isolieren. Die verschiedenen *Saccharomyces*-Arten zeichnen sich durch hohe Verwandtschaftsverhältnisse und große Ähnlichkeit zueinander aus, was sich sowohl in phänotypischen, als auch genotypischen Eigenschaften widerspiegelt. Zur physiologischen Charakterisierung von Hefen wird üblicherweise das Spektrum verwertbarer Fermentations- und Assimilationssubstrate herangezogen. Dieses Verfahren ist jedoch zur Differenzierung der Saccharomyceten ungeeignet. Weiterhin ist eine eindeutige Identifizierung mit Hilfe typischer phylogenetische Marker wie 18S rDNA und 23S rDNA aufgrund der hohen genetischen Übereinstimmung nur eingeschränkt möglich (Almeida & Araujo, 2013; Naumov et al., 2000a). Selbst die ITS-Bereiche, welche in der Regel eine höhere interspezifische Variabilität aufweisen (Josepa et al., 2000), ermöglichen keine eindeutige Differenzierung der *Saccharomyces*-Arten. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten zwischen einigen Arten nur wenige Nukleotid-Variationen in dieser DNA-Region festgestellt werden. Die beiden Typstämme von *S. bayanus* und *S. pastorianus* zeigten eine 100 %-ige Übereinstimmung in ihrer

DNA-Sequenz, was in dem phylogenetischen Stammbaum (Abb. 3.6) deutlich wird. Weiterhin ermöglichen diese Methoden keine zweifelsfreie Identifizierung zwischenartlicher Hybrid-Stämme. Da mit Ausnahme von *S. pastorianus*, bei dem es sich um einen Hybrid handelt, die taxonomische Klassifizierung der einzelnen Spezies im Einklang mit dem biologischen Artbegriff steht, ist deren Unterscheidung mit Hilfe von Kreuzungsexperimenten möglich. Die Durchführung dieser Versuche sowie die anschließende Überprüfung der Sporenvitalität ist sowohl aufwendig als auch zeitintensiv und daher nicht als Standard-Identifizierungsmethode geeignet. Aus diesem Grund wurden im Laufe der Zeit stetig neue Differenzierungsmethoden entwickelt und optimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Identifizierung der *Saccharomyces*-Arten angewandt. Hierzu wurde die DNA-Fingerprint-Methode SAPD-PCR sowie eine RFLP-Analyse verschiedener genetischer Marker herangezogen. Eine, von der MPA Bremen durchgeführte MALDI-TOF-MS-Analyse, erfolgte mit den gleichen Stämmen, um die jeweiligen Ergebnisse miteinander vergleichen und bewerten zu können. Im Folgenden werden zunächst die genutzten Methoden, sowie ihre bisherige Anwendung bezüglich der Differenzierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces* erläutert.

Bei der nSAPD-PCR handelt es sich um ein DNA-Fingerprint-Verfahren, welches als Weiterentwicklung der RAPD-PCR (Williams et al., 1990) gesehen werden kann. Auch hier führt die Verwendung kurzer Primer, welche an verschiedene Regionen im gesamten Genom binden, zur simultanen Amplifikation mehrerer DNA-Bereiche. Im Falle der nSAPD-PCR werden Primer verwendet, welche von der NotI-Erkennungssequenz abgeleitet wurden. Diese Sequenz wurde herangezogen, da sie in geringerer Anzahl im Genom vorliegt als Erkennungssequenzen anderer Endonukleasen, wodurch die spätere Auswertung erleichtert wird (Pfannebecker, 2008). Zur Durchführung einer ersten PCR (SAPD-PCR) können vier verschiedene Primer verwendet werden, welche zur Ausbildung unterschiedlicher Bandenmuster führen, die in der Regel eine Differenzierung auf Art-Ebene erlauben. Mit Hilfe der nested PCR, in der leicht modifizierte Primer eingesetzt werden, können stammspezifische Unterschiede detektiert werden (Fröhlich, 2009). In vorhergehenden Arbeiten von Pfannebecker (2008) und Blättel (2012) konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung verschiedener *Saccharomyces*-Arten mit Hilfe der nSAPD-PCR (Fröhlich & Pfannebecker, 2007) möglich ist. In dieser Arbeit wurden weitere Stämme mit dieser Methode untersucht, wobei insbesondere die Analyse der neu beschriebenen Art *S. eubayanus* von Bedeutung war.

González et al. (2006) gelang es durch DNA-Sequenzvergleiche verschiedener *Saccharomyces*-Arten genetische Marker zu detektieren, welche ausreichende Unterschiede aufwiesen, um die jeweiligen Arten zu differenzieren. Der Fokus dieser Studie lag hierbei auf der Charakterisierung interspezifischer Hybride, weshalb Genbereiche ausgewählt wurden, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert

waren, um eine Kopplung dieser Gene zu vermeiden. Anhand *in silico*-Analysen gelang es ihnen geeignete Restriktionsenzyme zu finden, mit denen die Sequenzunterschiede der verschiedenen Arten nachweisbar waren. Mittels RFLP-Analyse dieser Marker war es möglich *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus*, *S. mikatae* sowie Hybride zwischen einigen dieser Arten zu differenzieren. Weiterhin konnte durch die Sequenzierung des Gens *COX2* der mitochondriale Ursprung der Hybride ermittelt werden. Aufgrund der fehlenden Gesamtgenomsequenz wurde *S. cariocanus* in diese Studie nicht mit einbezogen. Gleiches gilt für die Arten *S. arboricola* und *S. eubayanus*, die damals noch nicht beschrieben waren.

Seit einigen Jahren findet die MALDI-TOF-MS, die ursprünglich zur Analyse von Proteinen, Peptiden und anderen Makromolekülen entwickelt wurde, zunehmend Anwendung zur Differenzierung von Mikroorganismen (Schubert & Wieser, 2010). Die mittels MALDI-TOF-MS erzeugten Gesamt-Massenspektren der jeweiligen Zellen werden maßgeblich durch die ribosomalen Proteine beeinflusst, da diese einen Großteil der Zellbestandteile ausmachen. Durch den Vergleich der generierten Spektren mit einer Datenbank ist es möglich eine Vielzahl an Mikroorganismen zu identifizieren (Marklein et al., 2009; Mellmann et al., 2008). Die Methode wird häufig zum Nachweis klinisch relevanter Hefearten wie *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. und *Trichosporon* spp. herangezogen (Jensen & Arendrup, 2011; Stevenson et al., 2010). Zur Differenzierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces* mit Hilfe der MALDI-TOF-MS ist bisher wenig bekannt. Lohmann et al. (2013) untersuchten die Eignung zweier verschiedener MALDI-TOF-MS-Systeme zur Hefe-Identifizierung. Unter den über 300 getesteten Stämmen befanden sich auch einige *S. cerevisiae*-Isolate, welche von Hefen anderer Gattungen differenziert werden konnten. In einer kürzlich erschienen Veröffentlichung wird die Identifizierung von *S. cerevisiae*-Isolaten aus Chicha, einem traditionellen fermentierten Getränk aus Südamerika, mittels MALDI-TOF-MS beschrieben. Hierbei wurden auch Typstämme der Arten *S. bayanus*, *S. paradoxus* und *S. pastorianus* analysiert, welche anhand ihrer charakteristischen Massenspektren voneinander unterschieden werden konnten (Vallejo et al., 2013).

4.1.1 Vergleich von Methoden zur Aufklärung der taxonomischen Stellung verschiedener *Saccharomyces*-Arten

Mittels SAPD-PCR konnten unter Verwendung aller Primer spezifische Fingerprint-Muster erzeugt werden (Abb. 3.1). Die aus der Amplifikation mit dem Primer G-Not hervorgegangenen SAPD-Muster waren ebenfalls charakteristisch für unterschiedliche *Saccharomyces*-Arten, wiesen jedoch eine vergleichsweise große Anzahl an Banden auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Da die Auswertung solcher

Bandenmuster sehr komplex sein kann, wurden zur SAPD-PCR und späteren Cluster-Analyse die Primer A-Not, C-Not und T-Not herangezogen. Die Fingerprint-Muster verschiedener Stämme einer Art zeigten große Übereinstimmung mit den jeweiligen Typstämmen und bildeten im berechneten Dendrogramm deutlich abgrenzbare Cluster (Abb. 3.2). Auch die MALDI-TOF-MS-Analyse erlaubte eine zuverlässige Differenzierung der verschiedenen *Saccharomyces*-Arten (Abb. 3.5). Beim Abgleich von Spektren mit der Datenbank ermittelt die Software einen sogenannten „score“-Wert, der eine Aussage über die Validität der gefundenen Treffer macht. In der Regel deuten Werte zwischen 2,3 und 3 auf eine korrekte Identifizierung auf Art-Ebene hin, aber auch Zahlenwerte über 2 können noch zur Art-Differenzierung herangezogen werden, wohingegen „score“-Werte zwischen 1,7 und 2 eine Zuordnung auf Gattungsniveau erlauben (Vallejo et al., 2013). Da nur das Referenzspektrum von *S. cerevisiae* in der MALDI-Biotyper-Datenbank hinterlegt war, lagen die ermittelten „score“-Werte vieler Stämme unter 2. Die untersuchten *S. cerevisiae*-Stämme konnten jedoch diesem Referenzspektrum zugeordnet werden (Tab. 3.1). Nach der Aufnahme der neu generierten Spektren in die Datenbank, wiesen die Stämme „score“-Werte über 2,3 zu ihrem jeweiligen Spektrum auf. Das auf Basis der Massenspektren erzeugte Dendrogramm unterscheidet sich bezüglich seiner Topologie von dem SAPD-Cluster-Baum. Da diesen beiden Methoden unterschiedliche Prinzipien zugrunde liegen, war dies durchaus zu erwarten. Mittels MALDI-TOF-MS werden Unterschiede in der Proteinzusammensetzung untersucht, wohingegen mit Hilfe der SAPD-PCR Unterschiede auf genetischer Ebene detektiert werden. Weiterhin war auch mit Hilfe der modifizierten RFLP-Analyse nach González et al. (2006) eine Differenzierung aller zurzeit beschriebenen *Saccharomyces*-Arten möglich. Verschiedene Stämme einer Art wiesen in der Regel das gleiche Restriktionsmuster auf, während sich unterschiedliche Arten in mindestens einem der zehn RFLP-Muster unterschieden (vergl. Tab. 3.2).

Eine Ausnahme bildeten die untersuchten *S. kudriavzevii*-Stämme, zwischen denen eine größere Heterogenität festgestellt werden konnte. Die beiden Stämme CBS 8840^T und NCYC 2969 zeigten bei der SAPD-PCR im Gegensatz zu den anderen Arten eine größere Variabilität in ihrem Bandenmuster. Die Differenz zwischen diesen beiden Stämmen wurde bei der MALDI-TOF-MS-Analyse noch deutlicher. Im Gegensatz zum SAPD-PCR-basierten Baum, in dem die beiden Stämme eine größere Distanz zueinander aufwiesen, befanden sie sich hier an unterschiedlichen Positionen im Dendrogramm. Ebenso konnte mittels RFLP-Analyse des *CAT8*-Gens ein Unterschied zwischen diesen Stämmen festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, in denen ebenfalls genetische Varianzen zwischen diesen beiden Stämmen festgestellt wurden (Liti et al., 2006; Kurtzman & Robnett, 2003). Naumov et al. (2013) beschrieben für *S. kudriavzevii* eine intraspezifische Variabilität der ITS1- und D1/D2-Region, einer Domäne der 26S rDNA, anhand der unterschiedliche Stämme zwei Gruppen

zugeordnet werden können. Weiterhin ist eine Korrelation zwischen Sequenzunterschieden in der ITS1-Region und der Fertilität intraspezifischer Hybride zu beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere *S. kudriavzevii*-Stämme 727 und NCYC 3494 mittels SAPD-PCR (Abb. 3.3) und RFLP-Analyse (Tab. 3.2) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass vor allem der Stamm NCYC 3494 eine hohe Übereinstimmung zum Typstamm CBS 8840^T aufwies, was mit den Ergebnissen von Liti et al. (2006) und Naumov et al. (2013) übereinstimmt.

Neben diesen Ergebnissen bezüglich des Verwandtschaftsverhältnisses der *S. kudriavzevii*-Stämme, konnten auch neue Erkenntnisse über die beiden Arten *S. paradoxus* und *S. cariocanus* gewonnen werden. In einer Studie von Naumov et al. (2000a) führte die Kreuzung von Stämmen dieser beiden Arten trotz hoher DNA-Reassoziationswerte von 97 % zu sterilen Hybriden. Daher, und auf der Grundlage anderer genetischer Studien (Kurtzman & Robnett, 2003), beschrieben Vaughan-Martini und Martini (2011) *S. cariocanus* als eigenständige Art. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Untersuchungen von Liti et al. (2006), die darauf hindeuten, dass es sich bei *S. cariocanus* um eine Mutante von *S. paradoxus* handeln könnte (Hittinger, 2013). *S. paradoxus* ist eine heterogene Spezies, die sich in mehrere Subpopulationen unterteilen lässt. Die Zuordnung der *S. paradoxus*-Stämme korreliert hierbei mit der geographischen Herkunft der Isolate. Hohe genetische Ähnlichkeit bezüglich der DNA-Sequenz konnte zwischen *S. cariocanus* und der amerikanischen Subpopulation von *S. paradoxus* gefunden werden, wobei die Stämme sich jedoch in ihrer Chromosomen-Organisation unterscheiden (Liti et al., 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *S. paradoxus*-Stämme zeigten untereinander bei allen angewandten Identifizierungsmethoden eine große Übereinstimmung. *S. cariocanus* ließ sich sowohl mittels SAPD-PCR (Abb. 3.2) als auch MALDI-TOF-MS-Analyse (Abb. 3.5) deutlich von *S. paradoxus* differenzieren. Weiterhin wiesen die RFLP-Muster der beiden Arten für mehrere genetische Marker deutliche Unterschiede auf (Tab. 3.2). Obgleich es vorstellbar ist, dass eine veränderte Chromosomen-Organisation durchaus Auswirkungen auf das DNA-Fingerprintmuster haben kann, sprechen die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS und der RFLP-Analyse dafür, *S. cariocanus* als eigenständige Art anzusehen. Dennoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Herkunft des *S. paradoxus*-Typstamms CBS 432^T nicht genau bekannt ist und die beiden hier verwendeten Stämme 28 und 35 zur Gruppe der europäischen Subpopulation gehören (Pfeiffer & Radler, 1982; Radler & Schütz, 1982). Folglich könnten Stämme amerikanischer Herkunft eine größere Ähnlichkeit zu *S. cariocanus* aufweisen.

Weiterhin war im Rahmen dieser Arbeit die Verwandtschaftsbeziehung von *S. bayanus* und *S. uvarum* von Interesse. Diese beiden Arten wurden in früheren Studien in dem Taxon *S. bayanus* zusammengefasst. Hierfür sprachen neben der hohen DNA-Homologie von 95 % weitere

Sequenzanalysen unterschiedlicher genetischer Marker (Vaughan-Martini & Martini, 2011; Kurtzman & Robnett, 2003; Rosini et al., 1982). Andere Studien deuten jedoch darauf hin, dass *S. bayanus*-Stämme eine große Heterogenität aufweisen, aufgrund derer man diese zwei Gruppen zuordnen kann. Hybride zwischen der „*bayanus*“-Gruppe und der „*uvarum*“-Gruppe zeigen eine reduzierte Sporenvitalität (9 % - 39 %) gegenüber Hybriden innerhalb einer Gruppe, deren Sporen eine Vitalität von 64 % - 96 % besitzen. Weiterhin konnten auch Unterschiede in der ITS-Region sowie der D2-Domäne und mittels DNA-Fingerprinting zwischen verschiedenen Stämmen festgestellt werden, weshalb zwischen den beiden Varietäten var. *bayanus* und var. *uvarum* unterschieden wird (Vaughan-Martini & Martini, 2011; Naumov et al., 2000b). In dieser Arbeit wurden drei *S. bayanus*-Stämme untersucht. Hierzu zählten der *S. bayanus*-Typstamm DSM 70412^T, der frühere Typstamm von *S. uvarum* CBS 395, sowie der Stamm CBS 7001, der *S. bayanus* var. *uvarum* zugeordnet werden kann. Die SAPD-PCR-Muster dieser Stämme zeigten keine große Variabilität und auch mittels MALDI-TOF-MS-Analyse war keine Differenzierung der beiden Varietäten möglich. Fernández-Espinar et al. (2003) konnten im Gegensatz hierzu mittels RAPD-PCR unterschiedliche Fingerprint-Muster der beiden Untergruppen feststellen. Die Variabilität der beiden Subgruppen scheint die SAPD-PCR- und MALDI-TOF-MS-Analyse weniger zu beeinflussen, als dies bei der RAPD-PCR der Fall ist. Ein generelles Problem stellt die Wahl des *S. bayanus*-Typstamms dar, bei dem es sich möglicherweise um einen Hybrid handelt (Libkind et al., 2011; Nguyen & Gaillardin, 2005; Nguyen et al., 2000; Rainieri et al., 1999). Da dieser Stamm in einem Großteil der Studien als Referenzstamm diente und aufgrund neuer Erkenntnisse infolge der Beschreibung von *S. eubayanus*, wird unter anderem die taxonomische Stellung von *S. bayanus* und *S. uvarum* erneut diskutiert (Libkind et al., 2011; vergl. Abb. 1.1). Nguyen et al. (2011) konnten im Genom von *S. bayanus* genetisches Material von *S. uvarum* und *S. cerevisiae*, sowie das einer weiteren, zum damaligen Zeitpunkt noch undefinierten *Saccharomyces*-Art feststellen. Bei dieser Spezies scheint es sich um *S. eubayanus* zu handeln. Libkind et al. (2011) stellten auf Basis des Vergleichs von Draft-Genom-Sequenzen die Hypothese auf, dass *S. bayanus* ein Triple-Hybrid sei, der durch mehrere Hybridisierungsereignisse aus *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* und *S. uvarum* hervorgegangen sein könnte. Weitere Untersuchungen der DNA-Sequenz von *S. eubayanus* zeigten, dass diese zu 99,5 % mit der Sequenz von einer der beiden parental Spezies des Hybrids *S. pastorianus* übereinstimmt (Libkind et al., 2011). Dies würde bedeuten, dass *S. pastorianus* ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. eubayanus* wäre. Zusammengefasst würden diese Ergebnisse dafür sprechen, dass es sich bei *S. uvarum* und *S. eubayanus* um eigenständige natürliche Arten handelt, während *S. bayanus* und *S. pastorianus* als domestizierte Hybride angesehen werden können, welche sich innerhalb den Bedingungen der Brauereiindustrie entwickeln konnten.

Diese Hypothese ist aufgrund der Ergebnisse der SAPD-PCR (Abb. 3.2) und der MALDI-TOF-MS (Abb. 3.5) nicht belegbar, da keine eindeutige Differenzierung zwischen *S. bayanus* var. *bayanus* und *S. bayanus* var. *uvarum* möglich war. Zwar zeigten die DNA-Fingerprint-Muster des *S. bayanus* Typstamms (DSM 70412^T) einige DNA-Fragmente, die ebenfalls in *S. cerevisiae* und *S. eubayanus* vorkamen, jedoch nicht in den beiden *S. bayanus* var. *uvarum*-Stämmen, dennoch war die Anzahl dieser Fragmente sehr gering und das SAPD-PCR-Muster der drei Stämme eher homogen. Dies spiegelte sich auch in der Cluster-Analyse wider. In dem abgeleiteten Dendrogramm (Abb. 3.5) gruppierten diese Stämme zusammen und ließen sich deutlich von anderen *Saccharomyces*-Arten differenzieren. *S. eubayanus* zeigte hier eine größere Ähnlichkeit zu *S. pastorianus*, wohingegen mittels MALDI-TOF-MS-Analyse eine größere Ähnlichkeit zu *S. bayanus* festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse der RFLP-Analyse zeigten, dass sich der *S. bayanus*-Typstamm in zwei der untersuchten genetischen Marker (*MET6* und *OPY1*) von den beiden *S. bayanus* var. *uvarum*-Stämmen unterschied. Die erzeugten RFLP-Muster (Tab. 3.2) waren in diesen beiden Fällen eine Kombination aus dem „*uvarum*“-Muster und dem einer anderen *Saccharomyces*-Art. Die Anzahl der untersuchten genetischen Marker ist zu gering und die Ähnlichkeit zwischen den *Saccharomyces*-Arten, welche sich teilweise nur in einem der zehn RFLP-Muster unterschieden, zu hoch, um eine Aussage über die Annahme von Libkind et al. (2011) zu machen. Allerdings stehen die Ergebnisse der RFLP-Analyse nicht im Widerspruch zu dieser Hypothese.

4.1.2 Eignung der angewandten Methoden zur Detektion und Charakterisierung interspezifischer Hybride

Die verschiedenen Arten der Gattung *Saccharomyces* sind dazu in der Lage interspezifische Hybride zu bilden. Aus Kreuzungsexperimenten geht hervor, dass jedoch weniger als 1 % der Sporen dieser zwischenartlichen Hybrid-Stämme lebensfähig sind (Greig et al., 2002; Naumov et al., 2000a). Eine Ausnahme stellen hier die beiden Arten *S. eubayanus* und *S. uvarum* dar, deren Hybride Sporen generieren, die eine Lebensfähigkeit von 7,3 % aufweisen (Libkind et al., 2011). Einige Mechanismen, die eine solche postzygotische Isolation bewirken können sind bekannt. In *Saccharomyces* scheint diese reproduktive Barriere seltener durch Chromosomen-Rearrangements als durch einfache DNA-Sequenzunterschiede und die Funktion des Mismatch-Repair-Systems verursacht zu werden (Greig, 2009; Louis, 2009). Hierbei lässt sich eine Korrelation zwischen der Divergenz der DNA-Sequenz der Elternspezies eines Hybriden und seiner Sporenvitalität feststellen (Hittinger, 2013; Liti et al., 2006). Zudem resultiert die gezielte Mutation des Mismatch-Repair-Systems in einer erhöhten Vitalität der Sporen von Hybrid-Stämmen (Greig et al., 2003; Hunter et al., 1996). Des Weiteren kann die

Inkompatibilität von Genprodukten dazu beitragen, dass eine reproduktive Isolation zwischen zwei Arten entsteht. Beispielsweise konnten Lee et al. (2008) zeigen, dass das chromosomal codierte Protein Aep2 aus *S. bayanus*, welches die Translation der mitochondrialen mRNA *OLI1* (Untereinheit der ATP-Synthase) reguliert, seine Funktion nicht in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* ausüben kann. Da die Mitochondrien von Hybrid-Stämmen nur von einem der Elternspezies stammen, ist die Inkompatibilität zwischen chromosomalen und mitochondrialen Genomen ein wirkungsvoller Mechanismus zur Erhaltung der reproduktiven Isolation. Das Vorkommen von interspezifischen Hybriden wird sowohl an natürlichen Standorten, als auch im Umfeld der Fermentationsindustrie beschrieben, wobei man letztere als domestizierte Hybride bezeichnet. Hierzu gehört *S. pastorianus*, eine Gruppe von Hybriden, die eine DNA-Homologie von über 90 % aufweisen und unter denen aufgrund ihrer industriellen Bedeutung die wohl am besten untersuchtesten Hybrid-Stämme zu finden sind (Vaughan-Martini & Martini, 2011). *S. pastorianus*-Stämme sind allopolyploid; ihr Genom setzt sich aus den Chromosomensätzen beider Elternspezies zusammen, wobei jedoch zahlreiche Chromosomen-Rearrangements festgestellt werden konnten (Casaregola et al., 2001). Die in dieser Arbeit untersuchten *S. pastorianus*-Stämme zeigten entgegen den Erwartungen recht homogene SAPD-PCR-Muster (Abb. 3.1), wodurch sich diese Gruppe jedoch gut von den anderen *Saccharomyces*-Arten differenzieren ließ. Anhand der Cluster-Analyse konnte die größte Ähnlichkeit zu *S. eubayanus*, welcher möglicherweise eine der beiden parentalen Spezies darstellt, festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine große Distanz der beiden *S. pastorianus*-Stämme in der MALDI-TOF-MS-Analyse, welche im berechneten Cluster-Baum nicht zusammen gruppierten (Abb. 3.5). In anderen Studien konnte unter Verwendung der DNA-Fingerprint-Methode RAPD-PCR ebenfalls eine Diversität zwischen verschiedenen *S. pastorianus*-Stämmen beobachtet werden (Brito dos Santos et al., 2007; Fernández-Espinar et al., 2003). Hier ist allerdings hinzuzufügen, dass einige der von Fernández-Espinar et al. (2003) herangezogenen Stämme derzeit anderen Arten zugeordnet wurden und die Heterogenität der übrigen Stämme eher mit den Ergebnissen der SAPD-PCR vergleichbar ist. Die beiden Typstämme von *S. pastorianus* und *S. bayanus* wiesen eine 100 % Übereinstimmung in ihrer ITS-Sequenz auf. Die RFLP-Analyse (Tab. 3.2) verschiedener genetischer Marker zeigte jedoch deutlich, dass sich das Genom von *S. pastorianus* aus dem seiner Elternspezies zusammensetzt. In allen untersuchten Genabschnitten, mit Ausnahme von *GSY1* konnte der *S. cerevisiae*-Anteil nachgewiesen werden. In den Genbereichen, in denen *S. eubayanus* und *S. bayanus* Unterschiede in ihrem RFLP-Muster aufwiesen (*CAT8*, *MET6* und *OPY1*) konnte bei den *S. pastorianus*-Stämmen das RFLP-Muster von *S. eubayanus* detektiert werden. Dies würde dafür sprechen, dass *S. eubayanus* die zweite parentale Spezies, neben *S. cerevisiae*, dieser Hybride darstellt. Aus Untersuchungen von Piškur et al. (1998) geht hervor, dass die Mitochondrien in *S. pastorianus* von dem Nicht-*S. cerevisiae*-Elternteil

stammen. Zur Bestimmung des mitochondrialen Ursprungs von Hybrid-Stämmen können mitochondriale Gene analysiert werden. Kurtzman & Robnett (2003) konnten bereits eine gewisse Übereinstimmung der mitochondrialen DNA zwischen *S. bayanus* und *S. pastorianus* feststellen. Der, auf Grundlage des mitochondrialen Gens *COX2*, berechnete Stammbaum (Abb. 3.7) zeigte eine Ähnlichkeit zwischen *S. bayanus*, *S. eubayanus* und *S. pastorianus*, was auf einen gemeinsamen mitochondrialen Ursprung dieser Arten hinweisen könnte.

Neben *S. pastorianus* wurden zwei weitere Hybrid-Stämme in dieser Arbeit untersucht. Bei CBS 8614 handelt es sich um einen sogenannten Triple-Hybrid, der genetisches Material von *S. bayanus*, *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* besitzt (Naumova et al., 2005). Der Stamm NCYC 3518 stammt von der National Collection of Yeast Cultures (Norwich) und ist dort als *S. kudriavzevii* hinterlegt. Aufgrund von Ergebnissen der SAPD-PCR-Analyse sowie einem spezifischen PCR-Nachweis (Torriani et al., 2004) wurde jedoch festgestellt, dass dieser Stamm ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* ist (Blättel, 2012). Mittels SAPD-PCR-Analyse dieser beiden Stämme konnten charakteristische DNA-Fragmente der jeweiligen Elternspezies detektiert werden (Abb. 3.1). Die anschließende Cluster-Analyse zeigte, dass der Triple-Hybrid CBS 8614 die größte Übereinstimmung seiner Fingerprint-Muster zu *S. bayanus* aufwies, wohingegen auf Grundlage der MALDI-TOF-MS eine größere Ähnlichkeit zu *S. kudriavzevii* festgestellt werden konnte (Abb. 3.5). Auch in Hinblick auf den Stamm NCYC 3518 waren die Ergebnisse von SAPD-PCR und MALDI-TOF-MS widersprüchlich. Während sich der Hybrid-Stamm anhand seiner Massenspektren keiner seiner Elternspezies zuordnen ließ, konnte mittels SAPD-PCR eine Ähnlichkeit zu *S. cerevisiae* festgestellt werden. Wie bereits erwähnt sind aufgrund der verschiedenen Prinzipien dieser beiden Methoden unterschiedliche Ergebnisse durchaus möglich. Anhand der erstellten Stammbäume konnte lediglich festgestellt werden zu welchem anderen Stamm der jeweilige Hybrid insgesamt die größte Ähnlichkeit aufwies, eine Bestimmung der parentalen Spezies ist mit Hilfe der beiden Methoden schwierig. Allerdings lassen sich die beiden Hybrid-Stämme deutlich von anderen Spezies differenzieren, da diese nicht mit einer der anderen *Saccharomyces*-Arten in einem Cluster zu finden waren.

Bei SAPD-PCR-Analysen mit verschiedenen *S. kudriavzevii*-Stämmen fiel auf, dass der Stamm NCYC 3739 ein Fingerprint-Muster mit großer Ähnlichkeit zu dem Stamm NCYC 3518 aufwies (Abb. 3.3). Die Vermutung lag daher nah, dass auch dieser Stamm ein Hybrid aus *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* sein könnte. Um sicherzustellen, dass die verwendete Kultur keine Mischkultur aus den beiden Arten *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* darstellt, wurden Zellen dieser Kultur mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt. In der anschließenden SAPD-PCR-Analyse der, aus Einzelzellen hervorgegangenen, Kulturen konnte ein identisches Muster mit der ursprünglichen Kultur festgestellt werden (Abb. 3.4). Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals die hohe Reproduzierbarkeit der SAPD-PCR, da verschiedene

Kulturen des gleichen Stammes nach getrennten DNA-Extraktionen sowie PCR-Ansätzen zu einem identischen Fingerprint-Muster führten.

Im Folgenden wurden die Hybrid-Stämme mittels DNA-Sequenzvergleich und RFLP-Analyse näher charakterisiert, um deren Elternspezies bestimmen zu können. Die Sequenz der ITS-Region des Stamms CBS 8614 stimmt zu 100 % mit der von *S. bayanus* var. *uvarum* überein, während sich die beiden anderen Hybrid-Stämme *S. kudriavzevii* zuordnen lassen. Da der ITS-Sequenzvergleich eine der Standardmethoden zur Identifizierung von Hefen ist, könnte dies erklären weshalb die beiden Stämme NCYC 3518 und NCYC 3739 ursprünglich als *S. kudriavzevii* hinterlegt wurden. In Hybrid-Stämmen ist eine starke Variation der Zusammensetzung des Genoms feststellbar. Einige Stämme weisen die kompletten Chromosomensätze ihrer Elternspezies auf, wohingegen in anderen Hybrid-Stämmen nur Teile der Elterngenome in Form von Translokationen oder zusätzlichen Chromosomen vorkommen (Sipiczki, 2008). Um interspezifische Hybride zu identifizieren, ist demzufolge die Analyse mehrerer Gene erforderlich, da sonst der Hybrid-Charakter eines Stamms möglicherweise nicht erkannt wird. Diese Gefahr besteht vor allem dann, wenn der genetische Anteil einer Elternspezies stark reduziert ist. Die Amplifikation der *MET6*-Genregion war in den Hybrid-Stämmen sowohl mit dem universellen als auch mit dem *S. kudriavzevii*-spezifischen Primerpaar möglich. Die drei Hybride tragen demnach das *S. kudriavzevii*-spezifische Allel dieses Gens sowie ein weiteres, welches von einer anderen *Saccharomyces*-Art stammt. Ähnlich wie bei *S. pastorianus*, wiesen die Hybrid-Stämme RFLP-Muster auf, welche sich aus denen ihrer Elternspezies zusammensetzten. Weiterhin konnte teilweise das Auftreten zusätzlicher DNA-Fragmente beobachtet werden, welche in keiner der untersuchten Nicht-Hybrid-Stämme vorkamen. Wie bereits erwähnt unterschieden sich die verschiedenen *Saccharomyces*-Arten häufig nur in einem der Restriktionsmuster, daher kann auch nicht jeder analysierte genetische Marker eindeutig einer Elternspezies zugeordnet werden. Was den Stamm NCYC 3739 betrifft, so erlaubt jedoch das Restriktionsmuster der Genregionen *CAT8* und *GSY1* eine sichere Identifizierung dieses Hybrids als *S. cerevisiae* x *kudriavzevii*. Anhand des Sequenzvergleichs eines Teilbereiches des *COX2*-Gens war es möglich den mitochondrialen Ursprung der Hybrid-Stämme zu bestimmen. Aus den Studien von Kurtzman & Robnett (2003) geht hervor, dass vor allem Stämme, die den Arten *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* angehören, eine große Heterogenität in diesem Gen aufweisen. Daher wurden neben der Sequenz des Typstamms zusätzlich die Sequenzen einiger Vergleichsstämme zur Berechnung des Stammbaums herangezogen. Groth et al. (1999) konnten zeigen, dass die mitochondriale DNA des Hybrid-Stamms CBS 8614 ähnlich zu der von *S. kudriavzevii* ist. Auch anhand des *COX2*-basierten Stammbaumes lässt sich eine gewisse Ähnlichkeit feststellen, weshalb angenommen werden kann, dass die Mitochondrien des Triple-Hybrid von *S. kudriavzevii* stammen. Die beiden Stämme NCYC 3518 und

NCYC 3739 gruppierten jeweils mit zwei verschiedenen *S. cerevisiae*-Clustern. Die Mitochondrien dieser Stämme scheinen demnach auf *S. cerevisiae* zurückzugehen. Hierdurch wird nochmals der Hybrid-Charakter der beiden Stämme verdeutlicht. Die falsche Hinterlegung von Hybriden zwischen *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* wurde des Öfteren beschrieben, wobei hier die Hybrid-Stämme irrtümlicherweise als *S. cerevisiae* identifiziert wurden. Bei einigen dieser Stämme handelt es sich um kommerzielle Starterkulturen, welche zu Fermentation in kälteren Gebieten empfohlen werden (Querol & Bond, 2009). Diese Tatsache demonstriert nochmals die Schwierigkeit der Identifizierung von Hefen der Gattung *Saccharomyces*.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die SAPD-PCR als auch die MALDI-TOF-MS zur Differenzierung dieser taxonomisch sehr nah verwandten Arten eignen. Die SAPD-PCR zeichnet sich durch eine relativ schnelle und einfache Durchführbarkeit aus. Zudem ist die Methode recht günstig, da nur die Standard-Ausrüstung eines molekularbiologischen Labors benötigt wird. Die Kosten eines MALDI-TOF-MS sind vergleichbar mit denen eines DNA-Sequenzierers, jedoch überzeugt diese Methode aufgrund der kurzen Analysezeiten, einer automatisierten Auswertung und geringen Materialkosten pro Messung (Dhiman et al., 2011). Weiterhin ist die Identifizierung von Hybrid-Stämmen prinzipiell möglich, was insbesondere am Beispiel des Stammes NCYC 3739 für die SAPD-PCR gezeigt werden konnte. Zur Bestimmung der Elternspezies sind jedoch weiterführende Genanalysen empfehlenswert. Wie von González et al. (2006) beschrieben, eignet sich hierzu die Analyse verschiedener genetischer Marker, wobei mit einer steigenden Anzahl an untersuchten Genregionen die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Identifizierung abnimmt.

4.2 Entwicklung und Anwendung von Techniken zur Kontrolle der Population von Milchsäurebakterien im Verlauf der Vinifikation

Milchsäurebakterien gehören, neben Hefen und Essigsäurebakterien, zur natürlichen mikrobiellen Flora von Most und Wein. Aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität während der Weinbereitung können sie einen direkten Einfluss auf die Qualität des Endprodukts haben. Von besonderer Bedeutung sind sie für die malolaktische Fermentation. Die Umsetzung von L-Malat zu L-Lactat und Kohlendioxid bewirkt eine Verminderung des Säuregehalts im Wein. Im Zuge des biologischen Säureabbaus, kann es jedoch zu weiteren Aromamodifikationen kommen (Liu, 2002; Lonvaud-Funel, 1999). Da sie an der Ausbildung schwerwiegender Weinfehler wie zum Beispiel dem Essigstich, dem Milchsäureton oder dem Mäuseln beteiligt sind, ist es wichtig das mikrobielle Wachstum zu beobachten. Das sogenannte Monitoring der

Milchsäurebakterien-Population während dem gesamten Prozess der Weinherstellung erlaubt dem Winzer zeitnah entsprechende Maßnahmen, wie beispielsweise den Zusatz von Schwefeldioxid oder Lysozym, zur Kontrolle des mikrobiologischen Wachstums durchzuführen (Weiland, 2002; Lonvaud-Funel, 1999). Aus diesem Grund gibt es einen Bedarf für Nachweismethoden, welche eine zuverlässige Identifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien, sowohl auf Art- als auch auf Stamm-Ebene, ermöglichen.

4.2.1 Entwicklung einer Schnellidentifizierungsmethode zum direkten Nachweis wichtiger Milchsäurebakterien-Arten während der Weinbereitung

Da zur Gewinnung von Reinkulturen aus einer komplexen mikrobiellen Flora und der anschließenden Identifizierung der Isolate mehrere Tage benötigt werden, ist die Anwendung direkter Nachweismethoden zur Kontrolle des mikrobiellen Wachstums sinnvoll. Hierzu können, unter Verwendung spezifischer Primer, PCR-basierte Methoden herangezogen werden. Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Schnellidentifizierungsmethode zum Nachweis potentiell weinschädigender Milchsäurebakterien. Aus diesem Grund wurde nach charakteristischen genetischen Markern gesucht, welche die Ableitung artspezifischer Primer ermöglichen. Einige Milchsäurebakterien-Arten weisen sehr enge Verwandtschaftsverhältnisse auf, so dass der 16S rDNA und auch der 23S rDNA-Sequenzvergleich nicht immer eine sichere Identifizierung auf Art-Niveau erlaubt (Aymerich et al., 2003). Auch Moraes et al. (2013) konnten anhand der 16S rDNA einige Milchsäurebakterien, welche aus Rohmilch und Käse isoliert wurden, nur ihrer Gattung zuordnen. Erst durch die Verwendung speziesspezifischer Primer konnten sie diese Stämme auf Art-Ebene identifizieren. Da die ribosomalen Gene nicht genügend Variabilität aufweisen, werden weitere genetische Informationen benötigt, um DNA-Bereiche zu detektieren, die eine eindeutige Unterscheidung verschiedener Milchsäurebakterien-Arten ermöglichen. Komplette Genomsequenzen sind derzeit nur von wenigen weinrelevanten Milchsäurebakterien wie beispielsweise *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lc. mesenteroides*, *O. oeni* und *P. pentosaceus* verfügbar (Liu et al., 2011; Makarova et al., 2006; Kleerebezem et al., 2003). Zum Screening nach genetischen Markern wurde daher eine von Paran & Michelmore (1993) entwickelte Technik, in etwas modifizierter Form, herangezogen. So konnten mit Hilfe der RAPD-PCR spezifische Banden detektieren werden, auf deren Basis, sogenannte SCAR-Primer (Sequence Characterized Amplified Region), abgeleitet werden konnten. Seither wurde diese Technik in vielen Bereichen

angewandt, wobei auch die AFLP-Analysen (Amplified Fragment-Length Polymorphism), die auf der selektiven Amplifikation von Restriktionsfragmenten beruht, zur Detektion von spezifischen Markern genutzt wurde. Neben dem Nachweis verschiedener Resistenzgene wurde die SCAR-Technik auch zur Geschlechtsbestimmung von Pflanzen und zur art- oder stammspezifischen Identifizierung von Mikroorganismen herangezogen (Solieri & Giudici, 2010; Isenegger et al., 2003; Giovannelli et al., 2002; Parasnis et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die nSAPD-PCR für das Screening nach artspezifischen Marker genutzt. Diese DNA-Fingerprint-Methode ermöglicht eine zuverlässige Differenzierung verschiedener weinrelevanter Milchsäurebakterien (Sebastian et al., 2011; Pfannebecker & Fröhlich, 2008). Auf der Grundlage charakteristischer SAPD- und nSAPD-PCR-Banden konnte Pfannebecker (2008) bereits spezifische SCAR-Primer zur Identifizierung von *Lb. hilgardii*, *Lc. mesenteroides*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* und *P. pentosaceus* entwickeln. Da die verschiedenen Amplifikationsprodukte unterschiedliche Fragmentlängen aufwiesen, konnten diese in Form einer Multiplex-PCR angewandt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es spezifische SCAR-Primer für weitere, häufig im Wein vorkommende, Milchsäurebakterien zu generieren und diese in das zuvor beschriebene Multiplex-PCR-System zu integrieren. Auf der Grundlage von SAPD-PCR-Mustern war es so möglich artspezifische Marker für *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *O. oeni* und *W. paramesenteroides* zu detektieren (Abb. 3.8). Anhand deren Sequenzen wurden Primer abgeleitet, welche sowohl durch einen Abgleich der BLAST-Datenbank als auch mittels PCR auf ihre Spezifität hin überprüft wurden (Tab. 3.4). Obwohl die entwickelten SCAR-Primer eine hohe Spezifität aufwiesen, traten bei der Integration einiger Primerpaare in das Multiplex-PCR-System unspezifische DNA-Fragmente auf. Diese Amplifikate wurden insbesondere bei Negativkontrollen mit Essigsäurebakterien gebildet. Durch das Testen verschiedener Primer-Kombinationen, konnte festgestellt werden, dass die Bildung dieser PCR-Produkte auf Primer unterschiedlicher Primerpaare zurückzuführen war. Die SCAR-Primer wurden daher in zwei separate Primer-Mischungen aufgeteilt, um diese in getrennten PCR-Reaktionen zu verwenden. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen, konnte so ein spezifisches Nachweissystem zur simultanen Identifizierung weinrelevanter Milchsäurebakterien entwickelt werden (Abb. 3.9).

Ein wichtiger Aspekt für die spätere Anwendung einer solchen Schnellidentifizierungsmethode ist deren Nachweisgrenze. Die minimale Zellzahl, welche mit Hilfe der Multiplex-PCR detektiert werden konnte, lag sowohl in Reinkulturen, als auch künstlich erzeugten Mischkulturen bei 10^4 - 10^5 Zellen/ml (Abb. 3.10 & 3.11). Zwar ist der Zelltiter der Milchsäurebakterien direkt nach dem Pressen der Trauben im Most gering, jedoch steigt die Population innerhalb der ersten Tage der Fermentation auf 10^4 - 10^5 KBE/ml an und kann während der malolaktischen Fermentation bis zu 10^7 - 10^8 KBE/ml erreichen (Lonvaud-Funel et

al., 1991; Lafon-Lafourcade et al., 1983). Die Nachweisgrenze des Multiplex-PCR-Systems würde somit im Bereich der zu erwartenden Zelltitern liegen. Die hier verwendete DNA-Extraktionsmethode ist auf die Verwendung höherer Zellzahlen ausgelegt. Laut Hersteller sollte die DNA-Isolierung standardmäßig mit etwa 10^9 Zellen/ml durchgeführt werden. Für Mischkulturen, bei der die Zellzahl von *Lb. buchneri* konstant 10^8 Zellen/ml betrug, während die Zellzahl von *Lb. curvatus* zwischen 10^1 und 10^7 Zellen/ml variierte, konnte jedoch keine Verbesserung der Nachweisgrenze festgestellt werden (Abb. 3.11B). Die DNA-Extraktionsmethode scheint demnach nicht die Ursache dafür zu sein, dass geringere Zellzahlen nicht detektiert werden konnten. Weiterhin zeigt dieser Versuch, dass das Vorhandensein einer Art mit hoher Zellzahl den Nachweis einer anderen Art deutlich geringerer Zellzahl nicht negativ beeinflusst. Die verwendeten SCAR-Primerpaare binden spezifisch das Template einer Milchsäurebakterien-Art und stehen daher nicht in Konkurrenz zueinander, wie es bei universellen Primern möglicherweise der Fall wäre. In einigen Studien werden niedrigere Nachweisgrenzen von bis zu 10^1 Zellen/ml beschrieben (Bester et al., 2010), jedoch konnten beispielsweise Isenegger et al. (2003) ähnliche Nachweisgrenzen von 10^3 - 10^4 KBE/ml ermitteln. Prinzipiell kann zur DNA-Extraktion ein größeres Volumen an Most verwendet werden, hierdurch wäre es möglich Milchsäurebakterien, welche in niedrigerer Zellzahl vorkommen zu detektieren.

Zur Durchführung eines Tests unter realen Anwendungsbedingungen wurden 21 verschiedene Weinproben bei Winzern in Rheinhessen gesammelt (Tab. 2.5), deren bakterielle Population nach Ausplattieren anhand der koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt wurde. In 19 der 21 Jungweine konnte *O. oeni* mittels Multiplex-PCR nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in Weinprobe Nr. 1 zusätzlich *P. damnosus* und in Weinprobe Nr. 10 *P. parvulus* detektiert (Abb. 3.12). In zwei der Weinproben wurden keine der 13 Arten, welche mit Hilfe des entwickelten Identifizierungssystems nachweisbar sind, gefunden. Eine direkte Korrelation zwischen den ermittelten KBE und der Nachweisgrenze ist schwierig. Zum einen können in den Weinproben zusätzlich Essigsäurebakterien und andere Milchsäurebakterien-Arten vorhanden sein, welche ebenfalls auf den verwendeten Agar-Platten wachsen können. Zum anderen können mittels PCR-Nachweis möglicherweise auch Zellen detektiert werden, die nicht in der Lage sind auf Kulturplatten zu wachsen. Dennoch kann man feststellen, dass es im Zuge des Anwendungstests möglich war, in Weinproben, mit Zelltitern unter 10^3 KBE/ml, Milchsäurebakterien nachzuweisen (Tab 3.6). In einigen Fällen führte ein erhöhtes Probenvolumen zur DNA-Extraktion dazu, dass ein schwächeres oder kein Amplifikat gebildet wurde. Dies könnte auf mögliche PCR-Inhibitoren wie z.B. Phenole zurückzuführen sein. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben um bereits durchgegangene Jungweine handelt, die sich teilweise mitten in, oder bereits am Ende der malolaktischen Fermentation befanden, erscheint die

Detektion von *O. oeni*, *P. damnosus* und *P. parvulus* plausibel. Aufgrund der Toleranz gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen dominiert die Art *O. oeni* häufig in diesen Phasen der Weinbereitung (Ruiz et al., 2010; Lonvaud-Funel et al., 1991). *P. damnosus* und *P. parvulus*-Stämme können ebenfalls hohe Ethanol-toleranz aufweisen. Dies trifft insbesondere auf Stämme zu, welche in der Lage sind Schleime zu bilden. Daher wird das Vorkommen dieser beiden Arten während oder nach der alkoholischen Fermentation des Öfteren beschrieben (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009; Renouf et al., 2006a).

Um die Ergebnisse des Anwendungstests zu überprüfen, wurden einige der Multiplex-PCR-Amplifikate sequenziert. Hierbei konnte eine Übereinstimmung von 99 - 100 % zu den SCAR-Markern, auf deren Grundlage die spezifischen Primer generiert wurden, festgestellt werden. Weiterhin wurden aus einigen ausgewählten Weinproben (Nr. 1, 3, 5, 6, 10) Bakterien isoliert. Mit Hilfe dieser Stämme sollte überprüft werden, ob weitere nicht mittels Multiplex-PCR detektierbare Milchsäurebakterien in den Jungweinen vorkamen. Die 48 verschiedenen Isolate aus den oben beschriebenen Weinproben (Tab. 3.7) wurden mittels SAPD-PCR und 16S rDNA-Sequenzvergleich analysiert. *O. oeni* kam in allen Weinproben vor, wobei in Weinprobe Nr. 10, aus der zahlreiche *P. parvulus*-Stämme isoliert wurden, nur ein Isolat dieser Art zugeordnet werden konnte. Zwei der Isolate aus Weinprobe Nr. 1 wurden als *P. damnosus* identifiziert. Demnach wurden mittels Isolierung und anschließender Identifizierung die gleichen Milchsäurebakterien-Arten nachgewiesen, die anhand der Multiplex-PCR unter Verwendung spezifischer SCAR-Primer detektiert wurden. Neben Milchsäurebakterien waren in den Jungweinen Nr. 1, 5 und 6 auch Essigsäurebakterien zu finden. Diese konnten anhand eines 16S rDNA-Sequenzvergleichs der Gattung *Acetobacter* zugeordnet werden. Die genaue Bestimmung von Essigsäurebakterien ist recht komplex. Mit Hilfe eines PCR-Nachweises mit spezifischen Primern konnten die Isolate jedoch als *A. malorum* oder *A. cerevisiae* identifiziert werden (Wirth, persönliche Mitteilung).

Das in dieser Arbeit entwickelte Identifizierungssystem erlaubt den direkten und simultanen Nachweis 13 verschiedener weinrelevanter Milchsäurebakterien. Hierbei handelt es sich um Arten, welche einerseits häufig im Wein vorkommen und andererseits mit der Ausbildung von Weinfehlern in Verbindung gebracht werden können. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit. So dauert das gesamte Verfahren, von DNA-Extraktion über Multiplex-PCR bis hin zur Auswertung der Ergebnisse, etwa 7 Stunden, wodurch dem Winzer ein zeitnahes Eingreifen möglich ist.

4.2.2 Kontrolle der bakteriellen Population während der Weinbereitung mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese

Die DGGE stellt eine der wichtigsten Methoden zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften dar (Muyzer & Smalla, 1998). Daher findet diese Technik auch im Bereich der Weinforschung zur Untersuchung der Milchsäurebakterien-Population und deren Sukzession im Verlauf der Fermentation Anwendung. Hierbei werden häufig variable Teilbereiche der ribosomalen Gene herangezogen. Beispielsweise konnten Lopez et al. (2003) unter Verwendung der variablen Regionen V7 und V8 der 16S rDNA zahlreiche weinrelevante Milchsäurebakterien differenzieren, wohingegen die V4- und V5-Regionen ein geringeres Auflösungsvermögen zu haben scheinen. Zur Identifizierung von Arten der Gattungen *Leuconostoc*, *Oenococcus* und *Weissella* mittels DGGE erwies sich die V3-Region der 16S rDNA als geeignet (Guerrini et al., 2003). In einigen Studien wurde jedoch beobachtet, dass die DGGE-Analyse ribosomaler Genabschnitte problematisch sein kann. Da rRNA-Operons im Genom in mehreren Kopien vorliegen, welche eine gewisse Heterogenität aufweisen, kann es zur Ausbildung multipler Banden kommen (Dahllöf et al., 2000; Fogel et al., 1999). Um dies zu vermeiden, können alternative Genbereiche herangezogen werden, welche nur als einfache Kopie im Genom vorliegen. Das Gen der β -Untereinheit der RNA Polymerase (*rpoB*) eignet sich aufgrund seines universellen Vorkommens und seiner Zusammensetzung aus konservierten sowie variablen Bereichen, ähnlich wie die 16S rDNA, als phylogenetischer Marker (Dahllöf et al., 2000; Mollet et al., 1997). So konnten Renouf et al. (2006a) unter Verwendung eines Teilbereichs des *rpoB*-Gens mittels DGGE-Analyse die Entwicklung der Milchsäurebakterien-Population während der Fermentation verfolgen.

Die bereits beschriebenen Primer zur Amplifikation von *rpoB*-Teilbereichen (Renouf et al., 2006b; Dahllöf et al., 2000) erlaubten bei einigen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Milchsäurebakterien-Stämme keine zuverlässige Amplifikation. Daher wurden neue Primer abgeleitet und die jeweiligen amplifizierten Teilbereiche in Bezug auf ihre Eignung zur DGGE-Analyse getestet. Die Verwendung des Primerpaars *rpoB*-F und *rpoB*-R erlaubte die Amplifikation eines etwa 500 bp großen DNA-Fragments der untersuchten Milchsäurebakterien, wohingegen die gleichen Primer bei einigen Essigsäurebakterien zur Bildung eines PCR-Produkts von 900 bp führten. Möglicherweise könnte man bei der Analyse von Most- oder Weinproben die Größe des entstandenen Amplifikats als Indiz für das Vorkommen dieser beiden Bakteriengruppen deuten. Weiterhin wäre es möglich mittels Agarose-Gelelektrophorese die beiden Fragmente zu separieren und anschließend aus dem Gel zu eluieren. So könnte man sich bei der anschließenden DGGE-Analyse auf die Population der Milchsäurebakterien konzentrieren. Der amplifizierte 500 bp große Teilbereich eignete sich zur Differenzierung zahlreicher Milchsäurebakterien

(Abb. 3.14). Lediglich *Lb. buchneri*, *Lb. nagelii* und *P. inopinatus* wiesen zwei oder mehrere Banden auf, welche auch weiterhin bei veränderten PCR- und DGGE-Bedingungen zu beobachten waren. Da wie bereits erwähnt nur eine Kopie des *rpoB*-Gens im Genom vorliegt, war dies nicht zu erwarten. Allerdings konnten auch González-Arenzana et al. (2013) bei der Analyse von Weinproben mittels *rpoB*-DGGE feststellen, dass verschiedene Banden derselben Art zugeordnet werden können. Weiterhin konnte unter den gewählten Bedingungen keine distinkte DGGE-Bande für *Lb. mali* erzeugt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten DGGE-Primer wurden einem ersten Anwendungstest unterzogen (Abb. 3.15). Hierzu wurden die Jungweinproben Nr. 1 - 10 verwendet, welche bereits mittels Multiplex-PCR untersucht wurden. Obwohl aus den Weinproben Nr. 1, 5 und 6 Essigsäurebakterien isoliert wurden, wurde kein 900 bp großes PCR-Produkt gebildet. Möglicherweise weisen *A. cerevisiae* oder *A. malorum* keine komplementären Bereiche zu diesen Primern auf. In allen der 10 Weinproben konnte mittels DGGE *O. oeni* nachgewiesen werden, was sowohl mit den Ergebnissen der Schnellidentifizierung als auch der Isolierung übereinstimmte. Die DGGE-Banden wiesen unterschiedliches Laufverhalten auf. So kam das DNA-Fragment aus Weinprobe Nr. 8 auf gleicher Höhe zum Liegen wie das entsprechende PCR-Produkt des *O. oeni*-Typstamms, welcher als Referenz mitgeführt wurde. Die Amplifikate der übrigen Weinproben liefen weniger weit im Gradienten als das des Typstamms, konnten aber aufgrund einer Sequenz-Übereinstimmung von 100 % zu *O. oeni* PSU-1 eindeutig dieser Art zugeordnet werden. Bei einem Sequenzvergleich der beiden Fragmente 1b und 8 (Anhang 8.1.6), konnte ein Austausch mehrerer Nukleotide festgestellt werden, welche das unterschiedliche Laufverhalten dieser Fragmente erklären. Renouf et al. (2009) konnten ebenfalls zwei verschiedene DGGE-Banden bei der Analyse eines 250 bp großen *rpoB*-Teilbereichs detektieren, welche zwei unterschiedlichen *O. oeni*-Subgruppen zuordneten wurden. In diesem Fall war das veränderte Laufverhalten auf den Austausch eines einzigen Nukleotids zurückzuführen. Nähere Untersuchungen dieser Stämme ergaben, dass die beiden Gruppen auch phänotypische sowie genotypische Unterschiede aufwiesen und zu unterschiedlichen Phasen der Fermentation dominierten.

In Weinprobe Nr. 1 konnte weiterhin eine DGGE-Bande detektiert werden, welche auf gleicher Höhe mit der des *P. damnosus*-Typstamms zum Liegen kam. Die Sequenz dieser Bande wies keine hohe Übereinstimmung zu hinterlegten *rpoB*-Sequenzen in der NCBI-Datenbank auf. An dieser Stelle wird der Nachteil der Verwendung alternativer Genbereiche zur DGGE-Analyse deutlich. Da routinemäßig ribosomale Gene zur Identifizierung von Mikroorganismen verwendet werden, sind die Sequenzen unzähliger Stämme in den Datenbanken hinterlegt, während die Sequenzen anderer Gene teilweise gar nicht vorhanden sind. Im Fall von *P. damnosus* ist lediglich ein Teilbereich, des *rpoB*-Gens in der NCBI-Datenbank zu finden, welcher sich jedoch nicht mit dem hier verwendeten 500 bp-Fragment

überschneidet. Aufgrund des gleichen Laufverhaltens dieses Fragments mit dem des *P. damnosus*-Typstamms, der Ergebnisse der Multiplex-PCR-Analyse sowie der Identifizierung von Isolaten aus dieser Weinprobe, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass diese Bande *P. damnosus* repräsentiert. *P. parvulus*, welcher aus Weinprobe Nr. 10 isoliert wurde und auch mittels Multiplex-PCR nachgewiesen wurde, konnte mittels *rpoB*-DGGE nicht detektiert werden. Die verwendeten DGGE-Primer sollten jedoch die Amplifikation eines *rpoB*-Teilbereichs aller Milchsäurebakterien-Arten ermöglichen. Möglicherweise war die DNA von *O. oeni* in deutlich höherer Konzentration im DNA-Extrakt dieser Weinprobe vorhanden, oder aber die Primer wiesen eine geringere Komplementarität zur *rpoB*-Sequenz von *P. parvulus* auf. Dies könnte dazu geführt haben, dass das Amplifikationsprodukt von *O. oeni* verstärkt gebildet wurde und daher *P. parvulus* nicht nachgewiesen werden konnte. Bester et al. (2010) ermittelten in einer Studie die Nachweisgrenze verschiedener weinschädigender Mikroorganismen unter der Verwendung verschiedener Primer mittels PCR- sowie DGGE-Analyse. Hierbei konnten sie feststellen, dass die minimale detektierbare Zellzahl in DGGE-Analysen generell höher war als die der PCR-basierten Methode. Zudem lag die Nachweisgrenze der DGGE in Mischkulturen nochmals höher als in Reinkulturen, während der direkte PCR-Nachweis hiervon nicht beeinflusst wurde.

Die vorgestellte DGGE-Analyse auf Grundlage einer Teilregion des *rpoB*-Gens ermöglicht eine zuverlässige Identifizierung vieler verschiedener Milchsäurebakterien-Arten. Der Vorteil dieser Methode ist ihre universelle Einsetzbarkeit. Die verwendeten Primer sind nicht spezifisch für bestimmte Arten und somit können prinzipiell alle Mikroorganismen eines Habitats erfasst werden. Zudem weist die Methode eine hohe Sensitivität auf, die es erlaubt sehr geringe Sequenzunterschiede zu detektieren. Allerdings ist die Durchführung der DGGE aufwendig und auch deren Auswertung nicht immer eindeutig. Das Laufverhalten von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Stämme kann bereits variieren, und auch nach Sequenzierung der DGGE-Banden können diese nicht immer einer Art zugeordnet werden, da teilweise die entsprechenden Sequenzen nicht in der Datenbank hinterlegt sind.

4.2.3 Vergleich von Methoden zur Differenzierung von *Oenococcus oeni* auf Stamm-Ebene

Stämme der Art *O. oeni* gehören zu den wichtigsten Milchsäurebakterien während der Weinbereitung und werden häufig in Form kommerzieller Starterkulturen zum biologischen Säureabbau eingesetzt. Verschiedene Stämme können hierbei starke Unterschiede beispielsweise bezüglich ihrer Ethanol- und Säuretoleranz, ihrer sensorischen Eigenschaften sowie ihrer Effizienz bei der malolaktischen Fermentation aufweisen (Zapparoli et al., 2012; Sato et al., 2001; Britz & Tracey, 1990). Eine

Differenzierung unterschiedlicher Stämme ist daher notwendig. Für Firmen, die Starterkulturen herstellen, ist es von Bedeutung die Identität eines bestimmten Stammes zweifelsfrei feststellen zu können, während es für den Winzer wichtig ist das Wachstum eines inokulierten Stammes im Vergleich zur natürlich vorkommenden Milchsäurebakterien-Population zu kontrollieren. Die physiologische Diversität verschiedener *O. oeni*-Stämme scheint sich auf genetischer Ebene nicht widerzuspiegeln. Mittels DNA-DNA-Homologiestudien, dem Sequenzvergleich der intergenen Region zwischen 16S und 23S rDNA sowie dem Vergleich von Genkarten und Ribotyping wurde eine starke Homogenität zwischen unterschiedlichen Stämmen festgestellt (Zé-Zé et al., 2000; Le Jeune & Lonvaud-Funel, 1997; Viti et al., 1996; Dicks et al., 1990). Um eine Differenzierung von verschiedenen Stämmen zu erreichen, werden daher Methoden benötigt, die einerseits äußerst sensitiv gegenüber geringen genotypischen Unterschieden sind, andererseits jedoch eine hohe Reproduzierbarkeit aufweisen. Unter Verwendung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), der RAPD-PCR oder aber auch von Multigenanalysen ist eine Differenzierung verschiedener *O. oeni*-Stämme möglich (Zapparoli et al., 2012; Bihère et al., 2009; De las Rivas et al., 2004; Larisika et al., 2008; Zapparoli et al., 2000). Weiterhin konnten Claisse & Lonvaud-Funel (2012) mittels VNTR-Analyse (Variable Number of Tandem Repeats) verschiedener Loci eine große Anzahl an Stämmen differenzieren. Wie Pfannebecker (2008) zeigen konnte, weist die nSAPD-PCR ebenfalls genügend Sensitivität auf, um eine Unterscheidung einzelner *O. oeni*-Stämme zu ermöglichen. In den letzten Jahren beschäftigen sich viele Studien mit der Anwendung der MALDI-TOF-MS zur Differenzierung auf Stamm-Niveau, wobei der Fokus hierbei auf medizinisch relevanten Stämmen wie beispielsweise methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) lag (Charyulu et al., 2012; Sandrin et al., 2012; Jackson et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die MALDI-TOF-MS-Analyse, ebenfalls für die Unterscheidung von *O. oeni*-Stämmen herangezogen werden kann. Diese Untersuchungen wurde in der MPA Bremen von Dr. Andreas Rabenstein durchgeführt und deren Ergebnisse der nSAPD-PCR gegenübergestellt.

Die nSAPD-PCR-Fingerprint-Muster der elf Stämme zeigten eine recht hohe Homogenität, wobei jedoch stammspezifische Unterschiede detektierbar waren (Abb. 3.17). In dem aufgrund dieser nSAPD-Muster berechneten Cluster-Baum wurde die große genetische Distanz des Stamms B70 deutlich (Abb. 3.18), welche bereits in anderen Analysen festgestellt werden konnte (Pfannebecker, 2008). Weiterhin war eine Korrelation der Gruppierung einzelner Stämme im Stammbaum mit der Herkunft der verschiedenen Isolate zu beobachten. Die Stämme B232, B235, B241, B243 und B244, welche in einem Cluster zu finden waren, wurden aus Weinen der gleichen Winzergenossenschaft des Weinbaugebiets Saale-Unstrut isoliert. Die beiden Stämme B241 und B243 zeigten bei der Verwendung aller Primer identische Bandenmuster auf, was auf eine hohe genetische Ähnlichkeit dieser Stämme hindeutet. Mittels nSPAD-

PCR war eine Unterscheidung dieser beiden Stämme daher nicht möglich. Der Typstamm sowie auch die weiteren *O. oeni*-Stämme unterschiedlicher Herkunft konnten deutlich voneinander differenziert werden. Die Gruppierung von Stämmen, welche aus der gleichen Region isoliert wurden, wurde auch durch Anwendung der RAPD-PCR und VNTR-Analyse gezeigt, während andere Methoden wie z. B. die PFGE keine Korrelation zwischen Clusterbildung und geographischer Herkunft erlauben (Claisse & Lonvaud-Funel, 2012; Larisika et al., 2008; Zapparoli et al., 2000).

Die mittels MALDI-TOF-MS-Analyse erzeugten Spektren verschiedener Stämme wiesen ausreichende Unterschiede auf, um diese voneinander differenzieren zu können. Das anhand der Spektren abgeleitete Dendrogramm ließ allerdings keine eindeutige Regionsbezogenheit der Stämme erkennen (Abb. 3.19). Die fünf Stämme aus Weinen der Winzergenossenschaft Saale-Unstrut gruppierten zwar in einem losen Cluster, jedoch lag beispielsweise der Stamm B241 mit dem Stamm B5, der aus einem südaustralischen Wein isoliert wurde, auf einem Ast. Bei einem Spektren-Abgleich der Stämme B232, B235, B241, B243 und B244 konnten „score“-Werte über 2,7 ermittelt werden (Tab. 3.8). Hierbei war der Wert zwischen B241 und B244 sogar etwas höher als der aus dem Vergleich der Spektren von B241 und B5. Infolge des, bei der Stammbaumerstellung zugrundeliegenden Algorithmus, wurde dies jedoch im Dendrogramm nicht deutlich. Ähnliches konnte auch bei dem Stamm B235 beobachtet werden, dessen Spektrum zum Referenzspektrum von B241 zwar einen höheren „score“-Wert aufwies, der aber dennoch mit B367 gruppierte.

Prinzipiell besitzen sowohl die nSAPD-PCR als auch die MALDI-TOF-MS das Potential stammrelevante Unterschiede der untersuchten *O. oeni*-Stämme zu detektieren. Zudem zeichnen sich beide Methoden durch ihre schnelle und einfache Durchführbarkeit aus. Der direkte Nachweis von Mikroorganismen während der Fermentation ist jedoch unter Verwendung dieser Techniken nicht möglich, da zur Analyse Reinkulturen benötigt werden. Die MALDI-TOF-MS-Analyse erlaubte, im Gegensatz zur nSAPD-PCR, die beiden Stämme B241 und B243, welche eine sehr hohe genetische Übereinstimmung aufwiesen, zu differenzieren. Allerdings war es mittels nSAPD-PCR und anschließender Cluster-Analyse möglich, die Regionsbezogenheit von Stämmen des gleichen Anbaugebiets herauszuarbeiten.

5 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das DNA-Fingerprintverfahren SAPD-PCR, die RFLP-Analyse verschiedener genetischer Marker sowie die MALDI-TOF-MS zur Differenzierung der taxonomisch sehr nah verwandten Arten der Gattung *Saccharomyces* eignen. Die Analyse weiterer Stämme könnte hierbei hilfreich sein, um einige zurzeit noch nicht vollständig geklärte Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Spezies zu verstehen. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung von *S. paradoxus*-Stämmen aus unterschiedlichen Regionen interessant, da beschrieben wurde, dass Stämme amerikanischer Herkunft eine hohe Ähnlichkeit zu *S. cariocanus* aufweisen. Weiterhin wäre die umfangreiche Analyse einer großen Zahl an *S. bayanus*-Stämmen von Bedeutung. Hierbei könnten die angewandten Methoden durch nested SAPD-PCR-Analysen vertieft werden, um zu überprüfen, ob Unterschiede zwischen den beiden Varietäten var. *bayanus* und var. *uvarum* festgestellt werden können. Anhand dieser Untersuchungen könnten Ergebnisse gewonnen werden, welche zur Aufklärung der komplexen taxonomischen Beziehung zwischen *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* und *S. pastorianus* beitragen könnten.

Die Bestimmung der parentalen Spezies zwischenartlicher Hybride mit Hilfe der herangezogenen Methoden war nur bedingt möglich. Die Charakterisierung von Hybrid-Stämmen könnte durch die Verwendung spezifischer genetischer Marker erleichtert werden. Genetische Marker könnten beispielsweise mit Hilfe der SAPD-PCR detektiert werden. Es wäre jedoch auch denkbar Marker auf Protein-Ebene heranzuziehen, welche mittels MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden könnten.

Das in dieser Arbeit entwickelte Schnellidentifizierungssystem ermöglicht einen direkten und simultanen Nachweis potentiell weinschädigender Milchsäurebakterien. Zwar werden mit Hilfe dieser Methode die wichtigsten weinrelevanten Arten detektiert, dennoch wäre eine Erweiterung des Systems möglich, um tiefere Einblicke in die Sukzession der Milchsäurebakterien während der Fermentation zu erhalten. Ebenso könnte die verwendete SCAR-Technik genutzt werden, um stammspezifische Primer zu entwickeln, mit deren Hilfe die Identität eines bestimmten Stammes eindeutig sichergestellt werden könnte. Durch eine Anwendung der spezifischen Primer in Form einer Realtime-PCR, könnte das Wachstum bestimmter Arten oder Stämme während der Vinifikation quantifiziert werden.

Durch die DGGE-Analyse eines Teilbereichs des *rpoB*-Gens, war es möglich eine Vielzahl an Milchsäurebakterien zu differenzieren. Da zurzeit jedoch nur wenige Kompletsequenzen dieses Gens in den Datenbank hinterlegt sind, müsste diese mit den Sequenzen der Typstämme sowie einiger

Vergleichsstämme erweitert werden. So könnte man vermeiden, dass eine große Zahl an Referenzstämmen bei der DGGE-Analyse mitgeführt werden müssen.

Anhand erster Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass neben der nSAPD-PCR auch die MALDI-TOF-MS-Analyse das Potential besitzt, verschiedene *O. oeni*-Stämme zu differenzieren. Möglicherweise könnte man die Auswertung der MALDI-TOF-MS noch optimieren. Hierbei könnten beispielsweise charakteristische Peaks in den Massenspektren der verschiedenen Stämme stärker gewichtet werden, um die einzelnen Stämme noch deutlicher zu unterscheiden. Möglicherweise könnten die so ermittelten Unterschiede auch in Zusammenhang mit der geographischen Herkunft der Isolate gebracht werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die mikrobielle Flora auf der Traube und im Most hat einen großen Einfluss auf die Qualität und den Charakter eines Weins. Daher ist die zuverlässige Identifizierung und Differenzierung von Hefen und Milchsäurebakterien während der Vinifikation von Bedeutung. Das sogenannte Monitoring des mikrobiellen Wachstums während der Fermentation ermöglicht dem Winzer ein zeitnahes Eingreifen. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden können dazu beitragen, den Prozess der Weinherstellung besser zu kontrollieren und so eine hohe Qualität des Endproduktes zu gewährleisten.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Differenzierung von Arten der Gattung *Saccharomyces*. Unter Verwendung des DNA-Fingerprintverfahrens SAPD-PCR sowie der MALDI-TOF-MS war eine Differenzierung dieser taxonomisch sehr nah verwandten Arten möglich. Weiterhin konnten interspezifische Hybrid-Stämme detektiert werden. In diesem Zusammenhang wurde der Hybridcharakter des Stammes NCYC 3739 (*S. cerevisiae* x *kudriavzevii*) entdeckt. Um jedoch die einzelnen Elternspezies eines Hybrid-Stammes zuverlässig zu bestimmen, sind weiterführende Genanalysen notwendig. Hierzu konnte eine RFLP-Analyse verschiedener genetischer Marker erfolgreich herangezogen werden.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Schnellidentifizierungssystem zum Nachweis verschiedener weinrelevanter Milchsäurebakterien entwickelt. Hierzu wurden, unter Verwendung der SCAR-Technik artspezifische Primer generiert, welche auf der Grundlage charakteristischer Fragmente der SAPD-PCR abgeleitet wurden. Durch die Anwendung dieser Primer in einer Multiplex-PCR-Reaktion war die Detektion verschiedener, einerseits häufig in Wein vorkommender und andererseits potentiell an der Ausbildung von Weinfehlern beteiligter Milchsäurebakterien-Arten möglich. Die ermittelte Nachweisgrenze dieser Methode lag mit 10^4 - 10^5 Zellen/ml im Bereich der Zelltitel, die in Most und Wein anzutreffen sind. Weiterhin wurde anhand der Untersuchung verschiedener Weinproben die Praxistauglichkeit dieses Verfahrens demonstriert.

Zur Kontrolle der gesamten Milchsäurebakterien-Population im Verlauf der Weinbereitung kann die DGGE herangezogen werden. Hierzu wurden Primer zur Amplifikation eines Teilbereichs des *rpoB*-Gens abgeleitet, da dieses Gen eine Alternative zur 16S rDNA darstellt. Die DNA-Region erwies sich als geeignet, um zahlreiche weinrelevante Milchsäurebakterien-Arten zu differenzieren. In einigen ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese Methode für eine praktische Anwendung in Frage kommt. Stämme der Art *O. oeni* gehören zu den wichtigsten Milchsäurebakterien während der malolaktischen Fermentation und werden häufig in Form kommerzieller Starterkulturen eingesetzt. Da verschiedene

Stämme unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können, ist es von Bedeutung, die Identität eines bestimmten Stammes zweifelsfrei feststellen zu können. Anhand der Analyse elf verschiedener *O. oeni*-Stämme konnte gezeigt werden, dass sowohl die nSAPD-PCR als auch die MALDI-TOF-MS genügend Sensitivität aufweisen, um eine Unterscheidung auf Stamm-Ebene zu ermöglichen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die mittels nSAPD-PCR ermittelten Distanzen der Stämme zueinander mit deren geographischer Herkunft korrelierte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Almeida LA, Araujo R (2013) Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol* 13: 67-75.

Amiel C, Mariey L, Curk-Daubie MC, Pichon P, Travert J (2000) Potentiality of Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Lait* 80: 445-459.

Aymerich T, Martín B, Garriga M, Hugas M (2003) Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl Environ Microbiol* 69: 4583-4594.

Bae S, Fleet GH, Heard GM (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* 100: 712-727.

Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012a) The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 153: 243-259.

Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012b) Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 154: 152-161.

Barnett JA (1998) A history of research on yeasts 1: work by chemists and biologists 1789-1850. *Yeast* 14: 1439-1451.

Bartowsky EJ (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett Appl Microbiol* 48: 149-156.

Bartowsky EJ, Henschke PA (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - A review. *Int J Food Microbiol* 125: 60-70.

Bartowsky EJ, Xia D, Gibson RL, Fleet GH, Henschke PA (2003) Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* 36: 307-314.

Belloch C, Querol A, García MD, Barrio E (2000) Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 405-416.

Bester L, Cameron M, du Toit M, Witthuhn RC (2010) PCR and DGGE detection limits for wine spoilage microbes. *S Afr J Enol Vitic* 31: 26-33.

Bilhère E, Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2009) Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Appl Environ Microbiol* 75: 1291-1300.

Bisson LF, Joseph CML (2009) Yeasts. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. König H, Uden G, Fröhlich J (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg, 47-60.

Blättel V (2012) Identifizierung, Quantifizierung und Hemmung von ausgewählten Hefen im Wein. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Blättel V, Larisika M, Pfeiffer P, Nowak C, Eich A, Eckelt J, König H (2011) β -1,3-Glucanase from *Delftia tsuruhatensis* strain MV01 and its potential application in vinification. *Appl Environ Microbiol* 77: 983-990.

Blasco L, Ferrer S, Pardo I (2003) Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 225: 115-123.

Brito dos Santos SK, Moreira Brasilio AC, Valente Brasileiro BTR, Simoes, DA, Alves da Silva-Filho E, de Morais M (2007) Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1613-1620.

Britz TJ, Tracey RP (1990) The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol* 68: 23-31.

Cagniard-Latour CC (1838) Mémoire sur la fermentation vineuse. *Annales de Chimie et de Physique* 68: 206-222.

Casaregola S, Nguyen HV, Lapathitis G, Kotyk A, Gaillardin C (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1607-1618.

Chang HW, Nam YD, Sung Y, Kim KH, Roh SW, Yoon JH, An KG, Bae JW (2007) Quantitative real time PCR assays for the enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and the *Saccharomyces sensu stricto* complex in human feces. *J Microbiol Methods* 71: 191-201.

Charyulu EM, Gnanamani A, Mandal AB (2012) Identification and discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wound sites using PCR and authentication with MALDI-TOF-MS. *Indian J Microbiol* 52: 337-345.

Chavagnat F, Haueter M, Jimeno J, Casey MG (2002) Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol Lett* 217: 177-183.

Claisse O, Lonvaud-Funel A (2012) Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 30: 340-347.

Claisse O, Renouf V, Lonvaud-Funel A (2007) Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *J Microbiol Methods* 69: 387-390.

Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Coton E (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol* 27: 1078-1085.

Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S (2000) *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 66: 3376-3380.

- De las Rivas B, Marcobal Á, Muñoz R** (2004) Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 70: 7210-7219.
- Delaherche A, Claisse O, Lonvaud-Funel A** (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 97: 910-915.
- Demerec M, Adelberg EA, Clark AJ, Hartman PE** (1968) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *J Gen Microbiol* 50: 1-14.
- Dicks LTM, Dellaglio F, Collins MD** (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrig.) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 395-397.
- Dicks LTM, van Vuuren HJJ, Dellaglio F** (1990) Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base composition and DNA-DNA hybridization. *Int J of Syst Bacteriol* 40: 83-91.
- Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL** (2011) Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 49: 1614-1616
- Dittrich HH** (1984) Essigstich - Noch immer Weinfehler Nr. 1. Ursachen und Zusammenhänge. *Deutsch Weinb* 39: 1154-1163.
- Dittrich HH, Großmann M** (2005) *Mikrobiologie des Weines*. Ulmer-Verlag, Stuttgart, 3. Auflage.
- Doan NT, Van Hoorde K, Cnockaert M, De Brandt E, Aerts M, Le Thanh B, Vandamme P** (2012) Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Lett Appl Microbiol* 55: 265-273.
- Dols-Lafargue M, Lonvaud-Funel A** (2009) Polysaccharide production by grapes, must and wine microorganisms. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. König H, Uden G, Fröhlich J (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg, 241-258.
- Du Toit M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S** (2011) *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures - an overview. *Food Bioprocess Technol* 4: 876-906.
- Dušková M, Šedo O, Kšicová K, Zdráhal Z, Karpíšková R** (2012) Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *Int J Food Microbiol* 159: 107-114.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S** (2001) Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol* 42: 199-202.
- Eschstruth A, Divol B** (2011) Comparative characterization of endo-polygalacturonase (*Pgu1*) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 623-634.
- Fernández-Espinar M, Barrio E, Querol A** (2003) Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* 20: 1213-1226.

- Fleet GH** (2003) Yeast interaction and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86: 11-22.
- Fleet GH** (1999) Microorganisms in food ecosystems. *Int J Food Microbiol* 50: 101-117.
- Fogel GB, Collins CR, Li J, Brunk CF** (1999) Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb Ecol* 38: 93-113.
- Fröhlich J, König H, Claus H** (2009) Rapid detection and identification with molecular methods. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. König H, Uden G, Fröhlich J (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg, 429-450.
- Fröhlich J, Pfannebecker J** (2007) Species-independent DNA fingerprint analysis with primers derived from the NotI identification sequence. Patent number: EP2027285 (A1).
- Fugelsang KC, Edwards CG** (2007) *Wine microbiology. Practical applications and procedures*. Springer-Verlag, New York, 2. Auflage.
- Gay-Lussac JL** (1815) Sur l'analyse de l'alcool et de l'éther sulfurique, et sur les produits de la fermentation. *Annales de Chimie et de Physique* 95: 311-318.
- Giovannelli JL, Farnham MW, Wang M** (2002) Development of sequence characterized amplified region markers linked to downy mildew resistance in broccoli. *J Amer Soc Hort Sc* 127: 597-601.
- González SS, Barrio E, Gafner J, Querol A** (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS yeast res* 6: 1221-1234.
- González-Arenzana L, López R, Santamaría P, López-Alfaro I** (2013) Dynamics of lactic acid bacteria populations in Rioja wines by PCR-DGGE, comparison with culture-dependent methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 6931-6941.
- Grbin PR, Henschke PA** (2000) Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Aust J Grape Wine Res* 6: 255-262.
- Greig D** (2009) Reproductive isolation in *Saccharomyces*. *Heredity* 102: 39-44.
- Greig D, Borts RH, Louis EJ, Travisano M** (2002) Epistasis and hybrid sterility in *Saccharomyces*. *Proc Biol Sci* 269: 1167-1171.
- Greig D, Travisano M, Louis EJ, Borts RH** (2003) A role for the mismatch repair system during incipient speciation in *Saccharomyces*. *J Evol Biol* 16: 429-437.
- Groth C, Hansen J, Piškur J** (1999) A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1933-1938.
- Guerrini S, Bastianini A, Blaiotta G, Granchi L, Moschetti G, Coppola S, Romano P, Vincenzini M** (2003) Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int J Food Microbiol* 83: 1-14.

Guillamón JM, Mas A (2009) Acetic acid bacteria. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. König H, Uden G, Fröhlich J (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg, 31-46.

Heider J (2007) Mikrobielle Gärungen. In: Allgemeine Mikrobiologie. Fuchs G (Hrsg.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 347-378.

Hittinger CT (2013) *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus. Trends Genet. 29: 309-317.

Huang CH, Lee FL, Tai CJ (2009) The beta-tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Antonie van Leeuwenhoek 95: 135-142.

Huang CH, Lee FL, Tai CJ (2008) A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. J Microbiol Methods 75: 531-534.

Hunter N, Chambers SR, Louis EJ, Borts RH (1996) The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. EMBO J 15: 1726-1733.

Hutzler M (2009) Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. Dissertation, Technische Universität, München.

Isenegger DA, Taylor PW, Mullins K, McGregor GR, Barlass M, Hutchinson JF (2003) Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures. Plant Cell Rep 21: 814–820.

Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW, Fox AJ (2005) Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Methods 62: 273-284.

Jensen RH, Arendrup MC (2011) *Candida palmioleophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. J Clin Microbiol 49: 549-556.

Josepa S, Guillamon JM, Cano J (2000) PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus* using specific primers. FEMS Microbiol Lett 193: 255-259.

Johnson EA, Echavarri-Erasun C (2011) Yeast Biotechnology. In: The yeasts, a Taxonomic Study. 5th edn. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds) Elsevier, Amsterdam, 21-44.

Kaschak E, Göhring N, König H, Pfeiffer P (2009) Biogene Amine in deutschen Weinen: Analyse und Bewertung nach Anwendung verschiedener HPLC-Verfahren. Dtsch Lebensm-Rundsch 105: 375-384.

Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci USA 100: 1990-1995.

- König H, Blättel V, Claus H, Pfeiffer P, Ultee A** (2013a) Umwandlung von Most in Wein durch Hefen. In: Kulturgut Rebe und Wein. König H, Decker H (Hrsg.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 121-141.
- König H, Kaschak E, Sebastian P, Petri A, Blättel V, Wirth K, Claus H, Pfeiffer P** (2013b) Biogene Amine: analytische, mikrobiologische und gesundheitliche Aspekte. In: Kulturgut Rebe und Wein. König H, Decker H (Hrsg.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 207-220.
- König H, Fröhlich J** (2009) Lactic acid bacteria. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. König H, Uden G, Fröhlich J (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg, 3-29.
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM** (2005) Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol* 28: 527-540.
- Kützing FT** (1837) Mikroskopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren andern dazu gehörigen vegetabilischen Gebilden. *Journ f prakt Chemie* 11: 385-409.
- Kurtzman CP** (2006) Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience* 47: 65-71.
- Kurtzman CP** (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Res* 4: 233-245.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T** (2011) Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. In: The yeasts, a Taxonomic Study. 5th edn. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds) Elsevier, Amsterdam, 137-144.
- Kurtzman CP, Robnett CJ** (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 3: 417-432.
- Lafon-Lafourcade S, Carre E, Ribéreau-Gayon P** (1983) Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl Environ Microbiol* 46: 874-880.
- Larisika M, Claus H, König H** (2008) Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *Int J Food Microbiol* 123: 171-176.
- Lavoisier AL** (1789) *Traité Élémentaire de Chimie*. Cuchet, Paris (übersetzt durch Kerr R (1790) *Elements of Chemistry*. Creech, Edinburgh).
- Le Jeune C, Lollier M, Demuyter C, Erny C, Legras JL, Aigle M, Masneuf-Pomarède I** (2007) Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res* 7: 540-549.
- Le Jeune C, Lonvaud-Funel A** (1997) Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*), application to strain differentiation. *Res Microbiol* 148: 79-86.

- Lee HY, Chou JY, Cheong L, Chang NH, Yang SY, Leu JY** (2008) Incompatibility of nuclear and mitochondrial genomes causes hybrid sterility between two yeast species. *Cell* 135: 1065-1073.
- Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio J** (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 14539-14544.
- Liti G, Barton DB, Louis EJ** (2006) Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics* 174: 839-850.
- Lohmann C, Sabou M, Moussaoui W, Prévost G, Delarbre JM, Candolfi E, Gravet A, Letscher-Bru V** (2013) Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51: 1231-1236.
- Lonvaud-Funel A** (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 199: 9-13.
- Lonvaud-Funel A** (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 317-331.
- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Ledoux O** (1991) Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J Appl Bacteriol* 71: 501-508.
- Lopandic K, Gangl H, Wallner E, Tschek G, Leitner G, Querol A, Borth N, Breitenbach M, Prillinger H, Tiefenbrunner W** (2007) Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vinegrowing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res* 7: 953-965.
- Lopes CA, Barrio E, Querol A** (2010) Natural hybrids of *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* share alleles with European wild populations of *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res* 10: 412-421.
- Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, Orr E, Phister T, Marshall M, VanderGheynst J, Mills DA** (2003) Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69: 6801-6807.
- Louis EJ** (2009) Evolutionary genetics: Origins of reproductive isolation. *Nature* 457: 549-550.
- Loureiro V, Malfeito-Ferreira M** (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86: 23-50.
- Loureiro V, Querol A** (1999) The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. *Trends Food Sci Technol* 10: 356-365.
- Liu S, Leathers TD, Copeland A, Chertkov O, Goodwin L, Mills DA** (2011) Complete genome sequence of *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929, a novel strain from a commercial ethanol plant. *J Bacteriol* 193: 4019-4020.
- Liu SQ** (2002) Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J Appl Microbiol* 92: 589-601.

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15611-15616.

Mancini A, Lazzi C, Bernini V, Neviani E, Gatti M (2012) Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP. *J Microbiol Methods* 91: 380-390.

Mañes-Lázaro R, Ferrer S, Roselló-Mora R, Pardo I (2009) *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2010-2014.

Mañes-Lázaro R, Ferrer S, Rodas AM, Urdiain M, Pardo I (2008a) *Lactobacillus bobalius* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2699-2703.

Mañes-Lázaro R, Ferrer S, Roselló-Mora R, Pardo I (2008b) *Lactobacillus uvarum* sp. nov. - a new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Syst Appl Microbiol* 31: 425-433.

Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl H-G (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47: 2912-2917.

Martineau B, Acree T, Henick-Kling T (1995) Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Res Int* 28: 139-143.

Martini A (2003) Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Microbiol* 6: 207-209.

Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J, Dubourdieu D (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl Environ Microbiol* 64: 3887-3892.

McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nuñez A, Butrym ED, Richards MP, Wang CS, Cheng G, Zhao Z, Wang C (2004) Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17593-17598.

McGovern PE, Hartung U, Badler VR, Glusker DL, Exner LJ (1997) The beginnings of winemaking and viniculture in the ancient Near East and Egypt. *Expedition* 39: 3-21.

Mederer C (1992) Die antibiotische Aktivität von *Leuconostoc*-Stämmen und die Untersuchung von Neuisolaten aus Weinen des Saale-Unstrut-Gebiets. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, Lasala P, Kostrzewa M, Harmsen D (2008) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 46: 1946-1954.

- Mesas JM, Rodríguez MC, Alegre MT** (2011) Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Lett Appl Microbiol* 52: 258-268.
- Millet V, Lonvaud-Funel A** (2000) The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett Appl Microbiol* 30: 136-141
- Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O, Yadav H** (2008) Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis* 9: 190-198.
- Mollet C, Drancourt M, Raoult D** (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 26: 1005-1011.
- Monterisino S, Prieto A, Muñoz R, de Las Rivas B** (2008) Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from wine. *J Food Sci* 73: M196-M199.
- Montrocher R, Verner MC, Briolay J, Gautier C, Marmeisse R** (1998) Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48: 295-303.
- Moraes PM, Perin LM, Júnior AS, Nero LA** (2013) Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol* 44: 109-112.
- Mülhardt C** (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 6. Auflage.
- Muir A, Harrison E, Wheals A** (2011) A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Res* 11: 552-563.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitierlinden AG** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer G, Smalla K** (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T** (2009) Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res* 16: 115-129.
- Nannelli F, Claisse O, Gindreau E, de Revel G, Lonvaud-Funel A, Lucas PM** (2008) Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett Appl Microbiol* 47: 594-599.
- Naumov GI, Lee CF, Naumova ES** (2013) Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *S. arboricola*, *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 217-228.

Naumov GI, Naumova ES, Masneuf-Pomarède I (2010) Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 1-7.

Naumov GI, James SA, Naumova ES, Louis EJ, Roberts IN (2000a) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudravzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1931-1942.

Naumov GI, Masneuf I, Naumova ES, Aigle M, Dubourdieu D (2000b) Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res Microbiol* 151: 683-691.

Naumov GI, Naumova ES, Louis EJ (1995) Two new genetically isolated populations of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Japan. *J Gen Appl Microbiol* 41: 499-505.

Naumov GI, Naumova ES, Lantto RA, Louis EJ, Korhola M (1992) Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast* 8: 599-612.

Naumova ES, Naumov GI, Michailova YV, Martynenko NN, Masneuf-Pomarède I (2011) Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Res Microbiol* 162: 204-213.

Naumova ES, Naumov GI, Masneuf-Pomarède I, Aigle M, Dubourdieu D (2005) Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* 22: 1099-1115.

Naumova ES, Bulat SA, Mironenko NV, Naumov GI (2003) Differentiation of six sibling species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex by multilocus enzyme electrophoresis and UP-PCR analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 155-166.

Neeley ET, Phister TG, Mills DA (2005) Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine. *Appl Environ Microbiol* 71: 8954-8957.

Nguyen HV, Legras JL, Neuvéglise C, Gaillardin C (2011) Deciphering the hybridisation history leading to the Lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380. *PLoS One* 6: e25821.

Nguyen HV, Gaillardin C (2005) Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Res* 5: 471-483.

Nguyen HV, Lepingle A, Gaillardin CA (2000) Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst Appl Microbiol* 23: 71-85.

Nour M (1998) 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Res Microbiol* 149: 433-448.

Orlić S, Arroyo-López FN, Huić-Babić K, Lucilla I, Querol A, Barrio E (2010) A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *J Appl Microbiol* 108: 73-80.

Page RD (1996) Tree view: an application to display Phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.

Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85: 985-993.

Parasnis AS, Gupta VS, Tamhankar, SA, Ranjekar PK (2000) A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Mol Breeding* 6, 337-344.

Peris D, Belloch C, Lopandić K, Alvarez-Pérez JM, Querol A, Barrio E (2012) The molecular characterization of new types of *Saccharomyces cerevisiae* x *S. kudriavzevii* hybrid yeasts unveils a high genetic diversity. *Yeast* 29: 81-91.

Pfannebecker J (2008) Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Pfannebecker J, Fröhlich J (2008) Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int J Food Microbiol* 128: 288-296.

Pfeiffer P, Radler F (1982) Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol* 128: 2699-2706.

Pinzani P, Bonciani L, Pazzagli M, Orlando C, Guerrini S, Granchi L (2004) Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett Appl Microbiol* 38: 118-124.

Piškur J, Smole S, Groth C, Petersen RF, Pedersen MB (1998) Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1015-1024.

Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 4: 865-877.

Querol A, Bond U (2009) The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 293: 1-10.

Radler F, Schütz H (1982) Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *Am J Enol Vitic* 33: 36-40.

Rainieri S, Zambonelli C, Kaneko Y (2003) *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. *J Biosci Bioeng* 96: 1-9.

Rainieri S, Zambonelli C, Hallsworth JE, Pulvirenti A, Giudici P (1999) *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters* 177: 177-185.

Ramos A, Lolkema JS, Konings WN, Santos H (1995) Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. Appl Environ Microbiol 61: 1303-1310.

Rantsiou K, Comi G, Cocolin L (2004) The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. Food Microbiology 21: 481-487.

Redžepović S, Orlić S, Majdak A, Kozina B, Volschenk H, Viljoen-Bloom M (2003) Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. Int J Food Microbiol 83: 49-61.

Redžepović S, Orlić S, Sikora S, Majdak A, Pretorius IS (2002) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. Lett Appl Microbiol 35: 305-310.

Reguant C, Bordons A (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. J Appl Microbiol 95: 344-353.

Renouf V, Vayssieres LC, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2009) Genetic and phenotypic evidence for two groups of *Oenococcus oeni* strains and their prevalence during winemaking. Appl Microbiol Biotechnol 83: 85-97.

Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl Microbiol Biotechnol 75: 149-164.

Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A (2006a) Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. Food Microbiology 23: 136-145.

Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2006b) *rpoB* gene: A target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR. J Microbiol Methods 67: 162-170.

Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2005) Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Aust J Grape Wine Res 11: 316-327.

Röder C, von Walbrunn C, Fröhlich J (2007): Detektion und Untersuchung der Verbreitung der Wein-relevanten Schädlingshefe *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* in Rheinhessen. Dtsch Lebensm-Rundsch 103: 353-359.

Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2003) 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Syst Appl Microbiol 26: 412-422.

Rosini G, Fededci F, Vaughan AE, Martini A (1982) Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. European J Appl Microbiol Biotechnol 15: 188-193.

Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, Palop ML (2010) Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). Appl Microbiol Biotechnol 86: 1555-1562.

Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, Palop ML (2008) Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol* 25: 942-948.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Samelis J, Bleicher A, Delbès-Paus C, Kakouri A, Neuhaus K, Montel MC (2011) FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiol* 28: 76-83.

Sampaio JP, Gonçalves P (2008) Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microbiol* 74: 2144-2152.

Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S (2012) MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev* 32: 188-217.

Sato H, Yanagida F, Shinohara T, Suzuki M, Suzuki K, Yokotsuka K (2001) Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during winemaking in Japan. *FEMS Microbiology Letters* 202: 109-114.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49: 543-551.

Silla Santos MH (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* 29: 213-231.

Sipiczki M (2008) Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res* 8: 996-1007.

Schwann T (1837) Vorläufige Mitteilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulnis. *Annalen der Physik und Chemie* 41: 184-193.

Schubert S, Wieser A (2010) MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum* 07.10: 760-762.

Sebastian P, Herr P, Fischer U, König H (2011) Molecular identification of lactic acid bacteria occurring in must and wine. *S Afr J Enol Vitic* 32: 300-309.

Seiler H, Scherer S (2003) FTIR-Spektrenbibliotheken für die Identifizierung von Mikroorganismen. *BIOspektrum* 04.03: 369-371.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 232-236.

Snowdon EM, Bowyer MC, Grbin PR, Bowyer PK (2006) Mousy off-flavor: A review. *J Agric Food Chem* 54: 6465-6474.

Sohier D, Coulon J, Lonvaud-Funel A (1999) Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1075-1081.

Solieri L, Giudici P (2010) Development of a sequence-characterized amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. *Appl Environ Microbiol* 76: 7765-7774.

Spano G, Beneduce L, Tarantino D, Zapparoli G, Massa S (2002) Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Lett Appl Microbiol* 35: 370-374.

Staley JT (2006) The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Phil Trans R Soc* 361: 1899-1909.

Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny M, Murray PR (2010) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 48: 3482-3486.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

Tornai-Lehoczki J, Péter G, Dlačny D, Deák T (1996) Some remarks on "a taxonomic key for the genus *Saccharomyces*" (Vaughan Martini and Martini 1993). *Antonie Van Leeuwenhoek* 69: 229-233.

Torriani S, Zapparoli G, Malacrinò P, Suzzi G, Dellaglio F (2004) Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol* 38: 239-244.

Türkes T (2013) Differenzierung von Hefearten der *Saccharomyces sensu stricto* - Gruppe und Hybrid - Stämmen mittels Enzym- und Chromosomenanalyse. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Vallejo JA, Miranda P, Flores-Félix JD, Sánchez-Juanes F, Ageitos JM, González-Buitrago JM, Velázquez E, Villa TG (2013) Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Syst Appl Microbiol* 36: 560-564.

Vaughan-Martini A (1989) *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies. *Syst Appl Microbiol* 12 : 179-182.

Vaughan-Martini A, Martini A (2011) *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: *The yeasts, a Taxonomic Study*. 5th edn. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds) Elsevier, Amsterdam, 733-746.

Vaughan-Martini A, Martini A (1987) Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 77-84.

- Viti C, Giovannetti L, Granchi L, Ventura S** (1996) Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Res Microbiol* 147: 651-660.
- Walling E, Gindreau E, Lonvaud-Funel A** (2005) A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *Int J Food Microbiol* 98: 53-62.
- Wang SA, Bai FY** (2008) *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 510-514.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG** (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37: 463-464.
- Weiland J** (2002) Mit Lysozym den BSA im Griff? *Schweiz Z Obst-Weinbau* 8: 185-189.
- Weiller H** (1969) Klassifizierung und Untersuchung des N-Stoffwechsels von neu isolierten *Pediococcus*-, *Leuconostoc*- und *Lactobacillus*-Stämmen aus Wein. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wenning M, Seiler H, Scherer S** (2002) Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 68: 4717-4721.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) Academic Press, Inc., New York, 315-322.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Wirth K, Sebastian P, Schneider I, König H** (2011) Essigsäurebakterien: neue Arten isoliert. *Der Deutsche Weinbau* 6: 36-37.
- Zapparoli G, Fracchetti F, Stefanelli E, Torriani S** (2012) Genetic and phenotypic strain heterogeneity within a natural population of *Oenococcus oeni* from Amarone wine. *J Appl Microbiol* 113: 1087-1096.
- Zapparoli G, Reguant C, Bordons A, Torriani S, Dellaglio F** (2000) Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr Microbiol* 40: 351-355.
- Zé-Zé L, Tenreiro R, Paveia H** (2000) The *Oenococcus oeni* genome: physical and genetic mapping of strain GM and comparison with the genome of a 'divergent' strain, PSU-1. *Microbiology* 146: 3195-3204.

8 ANHANG

8.1 Nukleotid-Sequenzen

8.1.1 Sequenzen der ITS-Region (ITS1-5,8S rDNA-ITS2) von Arten der Gattung *Saccharomyces*

Die ITS-Regionen wurden entweder in der vorliegenden Arbeit sequenziert oder stammen aus Datenbanken (NCBI oder CBS). Bei Sequenzen aus der NCBI-Datenbank sind die accession numbers angegeben. Der Stamm NCYC 3518 wurde bereits in einer vorhergehenden Arbeit sequenziert (Blättel, 2012).

S. arboricola CBS 10644^T (AS 2.3317)

Accession number: EF580917

```
AACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGC
AAGAGTATAAGAGATGGAGAGTTCCAGGCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTTCTAGACTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCC
AACAGTGAGAGATTTCTCTGTTTTTGTATAGGACAAATAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTATATCTTTGCAAC
TTTTTCTTTGGGTTTTTCGAGCAATCGGAGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAA
GAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATG
CCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAATGCTGGCCTTTTC
ATTGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTACGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGG
CTAATCTTTTTTGTACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAA
ATCAGGTAGGAGTACCC
```

S. bayanus DSM 70412^T (NRRL Y-12624^T)

Accession number: AY046152

```
AAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA
GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAATTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGACTTCTCTGTT
TTTGTATAGGACAATTTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGGTTTTCGAGCAA
TCGAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTA
AAAATAATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC
AGAATTCCTGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC
TCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGA
GAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGT
ATTGAAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT
```

S. bayanus var. uvarum NRRL Y-17034

Accession number: AY130306

```
AAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA
GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAATTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGACTTCTCTGTT
TTTGTATAGGACAATTTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCTTCGAGCAA
TCGAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTA
AAAATAATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC
AGAATTCCTGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC
TCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAATGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGA
GAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGT
ATTGAAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT
```

***S. cariocanus* CBS 8841^T (NRRL Y-27338^T)**

Accession number: AY130309

AAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA
 GTCCAGTCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTTGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGAGATTTCTGTG
 CTATTGTTATAGGACAATTTAAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTGAG
 CAATCGAGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAAT
 TTTAAAAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAAT
 TGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCC
 TTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAA
 AGAGAGGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAG
 CGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTAGGCCAACAATGTTCTTAAAGT

***S. cerevisiae* DSM 70449^T (CBS 1171^T)**

Accession number: AB018043

AAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAG
 AGTCCAGCCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGT
 GCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTGAG
 GCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAA
 TTTTAAAAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGA
 TTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCC
 TTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAA
 AGAGAGGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAG
 CGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTAGGCCAACAATGTTCTTAAAGT

***S. eubayanus* CBS 12357^T**

TTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC GCG
 GGTCTTGCTAGGCTTGCAAAATTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAGACTTCTCTGTTTTTTGTTATAGGACAATTTAAACCGTTTC
 AATACAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGAACCTTTTTCTTTGGGTTTCGAGCAATCGAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACA
 ATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAAAATAATTTAAAACTTTCAACAACGGAA
 TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGTAATGTAATTGCGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGA
 ACGCACATTTGCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCTCATTTCTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGAT
 ACTCTCTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGGAGGTATAA
 TGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGTATTGAAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
 GCTAGGCCAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTAA

***S. kudriavzevii* CBS 8840^T (ATCC MYA-4449^T)**

Accession number: FJ196779

TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTGTTTGGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAG
 CTTTTACTGGGCAAGTAGACAAGAGATGGAGAGTCCGGCCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAGTTTCTTT
 CTTGCTATTCCAAACAGTGAGAGATTTCTCTGTTTTCGTTATAGGACAATCAAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTA
 TATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCTGTGAGCAATCGGAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTT
 TGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGAAATTTTAAAAATATTTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA
 GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTCGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
 CCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTT
 GCTGGCCTTTTTCATTTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTT
 TACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTAGGCCAACAATATTCTTAAA
 GTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTAA

***S. kudriavzevii* NCYC 3494**

AAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTAAAAATGGATTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGTAGACA
 AGAGATGGAGAGTCCGGCCGGGCCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACAGTGAG
 AGATTTCTGTTTTCTGTTATAGGACAATCAAACCGTTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATATCTTTGCAACTTTTTCTTT
 GGGCTGTGAGCAATCGGAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCG
 TAACTGGAATTTTAAAAATATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC
 GTAATGTGAATTCGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGA
 GCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGT
 TTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTT
 TTTGTACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGCTAGGCCAACAATATTCTTAAA

***S. kudriavzevii* 727**

GTAAAAGCTCTCACGCTCTTGCCAAAACAAACAAATCCATTTTCAAATTATTAAATTTCTTTAACGATCCTTCCGTAGGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTGTTTGGTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTACTGGGCAAGT
AGACAAGAGATGGAGAGTCCGGCCGGGCCTGCCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAGTTTCTTTCTGCTATTCCAACA
GTGAGAGATTTCTCTGTTTTGTTATAGGACAATCAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATATCTTTGCAACTTTT
TCTTTGGGCTGTCGAGCAATCGGAGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAAT
TTTCGTAACGGAAATTTTAAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGC
GATACGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTG
TTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTG
GATGTTTTTTTTTCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGGAGTATAATGCAAGTACGGTCTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAA
TCTTTTTTGTACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATATCTTTAAAGTTGACCTC

***S. mikatae* CBS 8839^T (NRRL Y-27341^T)**

Accession number: AY046149

AAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGT
CCAGTGGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAACAGTGAGAGATTTCTGTGTT
TTTGTATAGGACAACATAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCTTTTCGAGCA
ATCGGAGCCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTT
TAAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTG
CAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCTT
CTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCAAAGA
GAGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGTATAATGCAAGTACGGTCTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGT
ATTGGAACGTTATCAATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT

***S. paradoxus* CBS 432^T (NRRL Y-17217^T)**

Accession number: AY046148.1

AAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAGGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA
GTCCAGTCCGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTTGGCTTGAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAACCGTGAGAGATTTCTGTG
CTATTGTTATAGGACAATTA AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAG
CAATCGAGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTT
TTAAAAATATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATG
TGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCC
TTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCAA
AGAGAGGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGTATAATGCAAGTACGGTCTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAG
CGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT

***S. pastorianus* DSM 6580^T (NRRL Y-27171^T)**

Accession number: AY046151

AAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA
GTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAACAGTGAGACTTCTCTGTT
TTTGTATAGGACAATTA AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGGCAACTTTTTCTTTGGGTTTCGAGCAA
TCGAGCCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACGGAAATTTTA
AAAATAATTA AAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC
AGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGGAGCGTCATTTCTTCT
TCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCAAAGA
GAGTTTTCTCTGCGTGCTTGGAGTATAATGCAAGTACGGTCTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTGTACTGAGCGT
ATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT

***S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii* CBS 8614**Sequenz von CBS-Homepage (<http://www.cbs.knaw.nl/>)

GGCAACTCCATCTCAGAGCGGAGAATTTGGACAACTTGGTCATTTAGAGGAACTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
 TGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGATATTGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTACTGGGCAAGA
 AGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAATTTCTTTCTGCTATTCCAACA
 GTGAGACTTCTCTGTTTTTTGTTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGCAACTTTTTC
 TTTGGGCTTCGAGCAATCGAGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTC
 GTAAC TGAAAATTTAAAAATAATTTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
 ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTT
 GAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCTGGAGTTAACTTGAAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGAT
 GTTTTTTTTCCAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCT
 TTTTTGTACTGAGCGTATTGAAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGAC

***S. cerevisiae x kudriavzevii* NCYC 3518**

GTGACGTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTGTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGG
 GCAAGTAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAGTTTCTTTCTTGCTATTC
 CAAACAGTGAGAGATTTCTCTGTTTTTTGTTATAGGACAATCAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATATCTTTGCA
 ACTTTTTCTTTGGGCTGTCGAGCAATCGGAGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAAC
 AAGAATTTTCGTAAC TGAAAATTTAAAAATAATTTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
 AAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCA
 TGCTGTTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTTGCTGGCCTTT
 TCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGC
 GGCTAATCTTTTTTGTACGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATATTCTTAAAGTTGACCTCAA
 ATCA

***S. cerevisiae x kudriavzevii* NCYC 3739**

GGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTGTTGTTTTGGCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGTAGACAAG
 AGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAGTTTCTTTCTTGCTATTTCAAACAGTGAGAG
 ATTTCTCTGTTTTTTGTTATAGGACAATCAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGG
 GCTGTCGAGCAATCGGAGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTA
 ACTGAAAATTTAAAAATAATTTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT
 AATGTGAATTGCAGAATTCCTGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
 GTCATTTCTTCTCAAACATTTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTT
 TTTTTCCAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTT
 TGTACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATATTCTTAAAGTTGACCTCAA

8.1.2 Sequenzen der COX2-Region von Arten der Gattung***Saccharomyces***

Die COX2-Regionen wurden entweder in der vorliegenden Arbeit sequenziert oder stammen aus der NCBI-Datenbank. Bei Sequenzen aus der NCBI-Datenbank sind die accession numbers angegeben. Die Sequenz des Stammes *S. cerevisiae* S288c stammt aus der SGD-Datenbank (<http://www.yeastgenome.org/>).

***S. arboricola* CBS 10644^T**

ATGTTTTATTTATAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATATTTATATACAATTTGTTATAACATATTCAAAAAATCCTATTGCATAT
 AAAATATATTAACATGGACAACTATTGAAGTAATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTATTAATTATTGCTTTTCCATCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTTCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTGTAACAGCTGCTGATTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCTGGTATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTTCAAAGAGAAGGTGTTTTTC
 TATGGACAATGTTTCAGAATTTGTGCGGACTGGGACATGCCAACATACCAATTTAAAT

***S. bayanus* DSM 70412^T**

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCCTGCTGTAGTTTTATTAATTATTGCTTTCCCATCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATGACTATTAAGCCATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
 TTATTAGATACAGATACTTCAATTGTAGTACCAGTAGATACACATATTAGATTTGTAGTAACAGCTGCAGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATTCCTAGTTTAGGTATTAAGTGGACGCTACTCCTGGAAGATTAACCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGATCTTGTCTGAATTGTGTGGAAGTGGCCATGCTAATATGCCGATTAATAAT

***S. bayanus* var. *uvarum* CBS 395 (NRRL Y-17034)**

Accession number: AY130328

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCCTGCTGTAGTTTTATTAATTATTGCTTTCCCATCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATGACTATTAAGCCATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
 TTATTAGATACAGATACTTCAATTGTAGTACCAGTAGATACACATATTAGATTTGTAGTAACAGCTGCAGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATTCCTAGTTTAGGTATTAAGTGGACGCTACTCCTGGAAGATTAACCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGATCTTGTCTGAATTGTGTGGAAGTGGCCATGCTAATATGCCGATTAATAAT

***S. cariocanus* CBS 8841^T**

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATATTTATATACTATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGTTATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTGGACGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
 TATGGCAATGCTCAGAGTTGTGTGGGACTGGTCATGCAAATATGCCGATTAATAAT

***S. cariocanus* NRRL Y-27338**

Accession number: AY130331

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATATTTATATACTATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGTTATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTGGACGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
 TATGGCAATGCTCAGAGTTGTGTGGGACTGGTCATGCAAATATGCCGATTAATAAT

***S. cerevisiae* DSM 70449^T**

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTGGACGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGACAATGTAGTGAATTGTGCGGACTGGGACATGCCAACATGCCGATTAATAAT

***S. cerevisiae* S288c**

(SGD-Datenbank)

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTGGACGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
 TATGGAGCATGTTCTGAGTTGTGTGGGACAGGTGATGCAAATATGCCAATTAAGATC

S. cerevisiae NRRL Y-2034

Accession number: AY130334

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATAT
AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAATTTTATAATTATTGCTTTCCCTTCATTT
ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTCCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
GCTATCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
TATGGACAATGTAGTGAATTGTGCGGACTGGGACATGCCAACATGCCGATTAATAAT

S. cerevisiae NRRL Y-12649

Accession number: AY130335

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATAT
AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAATTTTATAATTATTGCTTTCCCTTCATTT
ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTCCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
GCTATCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
TATGGGCATGTTCTGAGTTGTGTTGGGACAGGTCATGCAAATATGCCAATTAATAAT

S. cerevisiae NRRL Y-2416

Accession number: AY130332

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATAT
AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAATTTTATAATTATTGCTTTCCCTTCATTT
ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTCCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
GCTATCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
TATGGGCATGTTCTGAGTTGTGTTGGGACAGGTCATGCAAATATGCCAATTAAGATC

S. eubayanus CBS 12357^T

ATGTTTTATTTATTGTTATTTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTAGAACATATTCCTAATAATCCTATTGCATAT
AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAGTTTTATAATTATTGCTTTCCCATCATTT
ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTCCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATCCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
TTATTAGATACTGATACTTCTATCGTAGTACCTGTAGATACTCATATTAGATTCGTAGTAACTGCTGCGGATGTATCCATGATTTT
GCTATCCCTAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAACCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
TATGGTGAATGCTCAGAATTATGTGGTACTGGTCATGCTAATATGCCGATTAATAAT

S. kudriavzevii CBS 8840^T

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTTAGGTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTAATAACATATTCAAAAACCCATTGCTTATA
AATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACAATTTTCCAGCAGTAGTATTATAATTATTGCTTTCCCATCATTTA
TTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTCCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
CTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATCCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGAT
TATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCAGTAGATACACATATTAGATTCGTAGTTACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
CTATCCCTAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCAGGTAGATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTCTATT
ACGGTGCTTGCAGTGAGTTGTGTGGGACAGGTCATGCAAATATGCCAATTAATAAT

S. kudriavzevii NCYC 2969

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTAATAACATATTCAAAAACCCATTGCTTAT
AAATATATTAACATGGACAAACTATTGAAGTTATTTGAACAATTTTCCAGCAGTAGTATTATAATTATTGCTTTCCCATCATTT
ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTCCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATCCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCAGTAGATACACATATTAGATTCGTAGTTACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
GCTATCCCTAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCAGGAAGATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTCTTC
TATGGAAATGTTCTGAATTGTGTGGGCTAGGTCATGCTAACATGCCGATTAATAAT

***S. kudriavzevii* 727**

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACTATTGTAATAACATATTCAAAAACCTATTGCTTAT
 AAATATATTAACATGGACAAACATTGAAGTATTTGAACAATTTTCCAGCAGTAGTATTATTAATTATTGCTTTTCCATCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGTCAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCAGTAGATACACATATTAGATTCGTAGTTACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCTAGTTAGGTATTAAGTTGATGCAACTCCAGGTAGATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTCTAT
 TATGGTGCTTGCAAGTATTGTGTGGAACAGGTCATGCAAATATGCCAATTAATAATC

***S. mikatae* CBS 8839^T**

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATAACAATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGGCAAACATTGAAGTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAATTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGGGCATGCAGTGAGTTGTGCGGACTGGGACATGCCAACATGCCAATTAATAAT

***S. mikatae* NCYC 2970**

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATAACAATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGGCAAACATTGAAGTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAATTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGGGCATGCAGTGAGTTGTGCGGACTGGGACATGCCAACATGCCAATTAATAAT

***S. paradoxus* CBS 432^T**

ATGTTTTATTTATTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATAACAATTGTTATAACATATTCAAAAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACATTGAAGTATTTGAACAATTTTCCAGCTGTAATTTTATTAATTATTGCTTTTCCCTCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGGGCATGCAGTGAAATTGTGCGGGCTGGGACATGCCAACATACCAATTAATAAT

***S. pastorianus* DSM 6580^T**

ATGTTTTATTTATTTGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATAACAATTGTTAGAACATATTCCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTATTTGAACATTTTCCAGCAGTAGTTTTATTAATTATTGCTTTTCCATCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATCGTAGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTAGTAAACAGCTGCAGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATTCCTAGTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGAAGATTAACCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGTAATTGCTCAGAATTATGTGGAACAGGTCATGCTAATATGCCGATTAATAAT

***S. pastorianus* NRRL Y-1525**

Accession number: AY130325

ATGTTTTATTTATTTGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATAACAATTGTTAGAACATATTCCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTATTTGAACATTTTCCAGCAGTAGTTTTATTAATTATTGCTTTTCCATCATTT
 ATTTTATTATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATCGTAGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTAGTAAACAGCTGCAGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATTCCTAGTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGAAGATTAACCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGTAATTGCTCAGAATTATGTGGAACAGGTCATGCTAATATGCCGATTAATAAT

***S. pastorianus* NRRL Y-12693**

Accession number: AY130326

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTAGAACATATTCTAATAATCCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCAGTAGTTTTATAATTATTGCTTTCCATCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGATTTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATCGTAGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTAGTAACAGCTGCAGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCCGCATTAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGTAATTGCTCAGAATTATGTGGAAGTGGCCATGCTAATATGCCGATTAATAAT

***S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii* CBS 8614**

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTAATAACATATTCAAAAAACCTATTGCTTAT
 AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCAGTAGTATTATAATTATTGCTTTCCATCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCTGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTTGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGTTTTT
 TATGGACAATGCTCAGAGTTGTGCGGGCTGGGACATGCCAACATACCAATTAATAAT

***S. cerevisiae x kudriavzevii* NCYC 3518**

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTAATAACATATTCAAAAAACCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTATAATTATTGCTTTCCCTTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGACAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGCTTTC
 TATGGAGCATGTTCTGAGTTGTGCGGGACAGGTCATGCAAAATATGCCAATTAAGATC

***S. cerevisiae x kudriavzevii* NCYC 3739**

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCTTGAATGTTATATACAATTGTTAATAACATATTCAAAAAACCTATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGACAAACAATTGAAGTTATTTGAACATTTTTCCAGCTGTAATTTTATAATTATTGCTTTTCCCTTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCAGCTATAACTATTAAGCTATTGGATATCAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGATAGTGGTGAAACTGTTGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGATGAATTATTAGAAGAAGGCAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTATAGTTGTACCTGTAGATACACATATTAGATTCGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCAAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGCTTTC
 TATGGACAATGTTTCAAGATTATGTGGACTAGGACATGCTAACATGCCAATTAATAAT

***L. kluyveri* CECT 10677^T**

Accession number: AJ235918

ATGTTTTATTTATTTAGTTATTTAGGTTTAGTATCATGATTATTTACTATTCTAAGAACATATTCAAAAAACCAATTGCATAT
 AAATATATTAACATGGTCAACAATTGAGATTATTTGAACATTTTTCCAGCTGATGATTATAATTATTGCTTTTCCCTTCATTT
 ATTTTATTATATTTATGTGATGAAGTTATTTACCTGCTATGACTATTAAGCTATTGGTTTACAATGATATTGAAAATATGAATAT
 TCAGATTTTATTAATGAAAGTGGTGAAACAGTAGAATTTGAATCATATGTTATTCCTGAAGATTTATTAGAAGATGGTCAATTAAGA
 TTATTAGATACTGATACTTCTGTAGTAGTACCTGTTGATACTCATATTAGATTTGTTGTAACAGCTGCTGATGTTATTCATGATTTT
 GCTATCCCTAGTTTAGGTATTAAGTTGATGCTACTCCTGGTAGATTAATCAAGTTTCTGCTTAAATTCAAAGAGAAGGTGATTC
 TATGGACAATGTTTCAAGATTATGTGGTCTTNCATATTCAGGGGGCCCTATTAATAAT

8.1.3 Sequenzen der SCAR-Marker verschiedener Milchsäurebakterien

Sequenzen der SAPD-PCR Fragmente, die zur Ableitung spezifischer Primer verwendet wurden. Die Binstelle der SCAR-Primer ist blau hinterlegt, die verwendeten SAPD-Primer sind unterstrichen.

***Lb. brevis* - Amplifikationsprodukt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 1552 bp**

AGCGGCCGCCTTCCAAGAAACCTTAGATAAGCTGGGCTTAGACTATTTGGATCTGTACCTCATTCACTGGCCAGCCCCAGGTTATTT
AGACAGCTGGCGGGCGATGGAAGACCTGTATAAGGCCG GGAAGATCAAGAATATCGGTG TGTCGAACTTTAACCAGACGCAGATGGC
 TGATATCTTGGCTCACGGCACGGTCAAGCCGGTGTGATCAAAATGAAACGCATCCTTATTTCCAACAAAACGACATGCACGCTTA
 CTTGGAAAGCCAAGGGATTTGCATGAAGCGTGGAGTCCACTAGGCGGGGAAACAACAACGCATTGACCGATTCCGATTAATGA
 ATTGGCCGCTGCTCATGACGTGAGTGCCGCCAGATTATCTTACGGTGGCATGTTCAACGTGAAGAAGTTGTGATTCCTAAGTCAAT

TCACGAAGCTCGTATCCAACAAAATCGAGACATTTTTGCTTTTGGCCTGGATGAAGATGAAATGAAGGCGATTAGTGACCTCGATAC
 CGGCAAACGAGTGGGTCCAGACCAGACGATACCGCCTGGTTAAAGAAAGTCACAGACCTATTTCTGGTTCGCAAGTAAGTTACCGAAAAG
 GGTGGAATCCCTTGAGCCTTTGGCTTTTGGCTCTAATTTGCTCAGTTAGGGCATTTAGAAGTGAAGGGAACCTTTAGCGAAGGGACTC
 AGAAATCCGGGATGATCTGGATCGGGGACATCCTGATTAGCTTTAATTTAGGAATTAATGGGACTAGGTCCTTTCTTTGGGAGACCT
 AGTTTTTTGGCGTAGTAGACGGTCTCACGGTAAGTAAAGTTTTTGAATAGAAAGTAAAAACAACCACCCGCTGCGGTAAAGTACCAG
 AAGATGGTCCACTCTAGACCAATCTTAGCAGGGTCCAAAAGTTAGCCAGATGGCAGCGATGACAAAAGGACATAGAGTACCCT
 GAAACGCCAGCCAGCGCTGTTTTGTGTCAAATAACGGCCTCATCTCCATAATAGTATTGTATCCAGTGTACGGGGTAAACGGGT
 CAGAATTCAGCGATTTTATAAAATCATTGCCGATCATTTTCGTATTGCTTAACAGACGTGTATAATAACACAGTATTGTTACCAAT
 CGCTTTAAGAAATGAGAGGTAGACGACGTGAGTTAAGTTTCGAGACCATCCAACCAACTGATTACCAGCAGGTAGACCAATTGGTG
 CAAGCAGCCTTTGAACCCGTAGAAGATAGTCAAGGTAATGAGGTTGACCTGATTCATCAATTACGTAAGACTTATGATTATCAAGCT
 AGTTTGGAAAGTTTGGCCAAGCGTCCATTGACACAATAGTGGCCATGGGCTATTAAGTCCGGTGATGATTTCGTGGGAATCGGCAT
 ACAACGACAATTTGGCGCTGGCCCCATTAGCGGTGGCCCCGATTGGCAAGGCCAAGGTGTGGGGAGTGAATTGCTCAGTGAATTA
 GAGACCGGGCTAGAATGGCCGGCTTTGCGGCAGTGAGCGTCGTGGGTGATATGACCTATTATGGCGGCCGT

Lb. buchneri - Amplifikationsprodukt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 1077 bp

AGCGGCCGCCAAACGTTGGGAAAATCGAATCTATCTTTAACCGCATTGCGGTGATCGAATTTCAATCGTTGAAGATACCCCGGGTGT
 ACCCGGGACCGTATTTATCTCATGGTGAATGGCTGGCAACTAAATTTGCAATGATCGATACTGGTGAATTCAAATCAGTGTGCA
 CCTTTGCAACCAGATTAAGAGTCAGGCCGAAATTGCCATCGACGAAGCGGACGTGATTGTCTTTATCGTCAGCGGTAAGGAAGGG
 GTTACCGCAGAAGATGAACAAGTCGCCAAAATTTCTTTATCGAAGTGACAAACCGGTTGTTTTAGCGGTTAACAAAGGTCGATAATCCT
 GAGAGCCGTGAAGATATCTATGAGTTTTATCTACTGGGATTTGGCGATCCAATGCCGATTTCCGGAGTGCATGGTCTGGGATTTGGGA
 GATCTACTCGACAAGGTTGTTGAAAATTTCCAAAGACCGATGAAAAGACGGATAACGATGATTTCCGTTTCGATTATTGGCCGG
 CCCAATGTGGGCAAGTCGTCACTGGTTAACGCCATTTTGGGTGAAAGACCGGGTCATTGTTTTAGATATTGCCGGAACCACTCGAGAC
 GCAATCGATAACCGCTTTGAGGCGGATGGTATCAAGTTCACGATGGTCGATACGGCTGGAGCCAGAAAACCGGGGAAGGTTTACGAA
 AACACTGAACGATATAGTGTCTATCGGGGCGACGAAAGCCATTGACCAAAGTGTGTGATCTTATTCGTGATGAAACGCCGAAGAAGGC
 ATTCGTGAGCAGGATAAGAAAGTTGCCGGATACGCTCATGAAGCTGGAAGCAATCATCACGGTGGTGAATAAGTGGGATACGCTC
 AAAAAAGCAACACGCAACAGGACTTTGAAACCCTGATCAGAAATGAATTCAGTACATGTCATATTGCCCATCATTTTCGTT
 TCAGCCGTTACTAAGCAAAGAATCGAAAACCTACCGGCATTAATCAAACAGGTTTATGACAATCATGAGAAGCGTGTCAATCCTCA
 GCACTCAACGATGTCATTATGGGGCGGCCGCT

Lb. curvatus - Amplifikationsprodukt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 1696 bp

AGCGGCCGCATAGTAATGTGATTTTGGATTAATCAAGCGACCAATAAGATTTCTAGATTTAATCCGGCAGCTCGGTTTTCGCAAAAC
 CGTTATCGGTTCTTAATGCCTGGTGCCGATTATGTTAGTCCACCGCTGCAACCGGGGTTGATGGTTTTACACTGATTTAAAGACG
 CTTGATTGGTTAAGTTATTATAACGAAGCTGCTGATGAACAAGTCAAATGGTTACAACAACACTTCCAAGGGATGAGTCGTGAAAGT
 GCCGTTGAACTACAAACCCGTTTAAATGGATCATGACAATTATTTGGCGGTTGTGACTGATTTCTCAAGCAATTCGACCAAGTGACA
 CCACGTTAACAGTTGGTGAAGAAAGTCTGTTGTTACGGCCTTCCCATATGAGAGCCTGACAGGGACACTGAGCCATTTTGACACG
 TTGAGTGAGCTGTTAGACCAATATTACTTACACAAGGCGCAGCGTGACCGAGTGCAGCAACAAGGTGGTGGCCTCATCCACTTCATC
 CGCAACGAGATTTCAAAGGATGAAAAGAACTGAAAAAATACAAAAACGTTAAAAGCAGCGACAGTGTGATGATTACCGGAT
 AAGGTTGAAATTTTGGACCCTATTTGCGGGAAGTTCGAACGTGACAGTGAAGTCAAGTCAAGTTCGCAATTTCTACGACAAACGAA
 CCGCTTAAGATTACCTTGTGCAACCAGATTAGCCCTTCAAAAATGCGCAGAAGTATTTCTCGAAATATCAGAAGCTCCGGAATTCA
 ATTGCCTACGTCATGAACAATGGCAAAGACCGAAGCAGAACCTGCCTACTTCAACACGATTATGGCGCAAAATGAAATTCGTGAA
 CCCAAAGATTTAGAGGATATCAAAGCTGAATTACAGGCTGAAGTTATTTAAAGGCTAAGAAAACCGGTGCCAAGAAGCAGAAACGT
 TACAAGATTAGTGAACCTGAAGTTTCTATGCGAGTGTGTTACCCGGATTTTCGTTGGCAAGAATAACTATCAAATGATCAATTA
 ACCTTGAAAAAGCCCAATAAACTGATATCTGGTTGCATGTGAAGAACAATCCCGGGTCTCATGTGATTATGATAGCAGATCCA
 TCAGAAGATACGCTTCAAGAAGCCGGCAACTTAGCGCCCTACTTCTCGAAGGCGCGCTTATCAGCGCCGCTGCCAGTTGATTATATT
 CAGGTTAAGAAGATTAAAAAACCGAACGGTCCGCGACAGGTTTGTGATTTACGAAGGGCAACAAACACTTTATACACACCCAGAC
 GAGCAACTCGTTCAAAGCTACGTAACAACTGTGCAAGACTAATAAAAAGCGTTACTCCAAAGTGAATTGGGGTAAACGTTCTTT
 GATTGGTGGCGCTGATGGCACACGATAAACGTGTTCTGCAAGCATTACTTTCCGGTTAACACTCTATTCTAATGGGCGTCTGACCA
 TGCTTGTGGGCTTGGCGCCATTGATGAGTGTAGCTTGTCTGGAGTTAAGTTATCAGCGGCTTCTTCGACCGCTAATAAGGC
 GGAGAAATTCGATAAGGTCGTTAGTGGTAAGTTAGCAGTTGCGAAAATTTCTGTTGGCCGGCTGCTAGTTTCGTATGAAAAGATGCCAAA
 AATACCAAGGACTTCTGCGCCCTCTTTTGGAGCGCGGCCGCT

Lb. plantarum - Amplifikationsprodukt mit dem SAPD-Primer A-Not, Größe: 1383 bp

AGCGGCCGCACACCTGAATAGAAATGAATCACTATCCAAAGGATTTGCCCATCGGTTGATTGAAATAACGTTAGTTGGAATATAAGCC
 GAAATATCCCCAGCTTGCCTTTCGATAATTGGTAAGGCCGTCATTTGAAACCCGCAATTCATCGCTCAACTTGGCAGCCCGTTTCG
 AGTAACCGTGAGTGAAGTAGAAGACATCCCCAGGATAAGCTTACAGACCTGAGGACGACGAGGATCAAGGAAAGTTACAGGTAA
 GCCGTTGCTTGTGAAAGGTCATCATAGACGATCAAAACGTTGCTTGGCGTTTCATCATAAAATTTTACCCATCGCTGCCCCAGCA
 TAAGGAGCTAAGTACAGTAATGGCGCTGGTTCCAGAGGTCGGCAGTTACAACGATTGTGTAGTCCATCGCACCTAACTTCTTCAAC
 GTTTCACACTTGGGCCCGTACAGTTGAGTCCTTTTGACCGATTGCAACGTAGACAAAATCATGCTTGGTCTTTTGGTTCAAATG
 GCATCAATGGCAACGGACGCTTCCAGTCTTACGGTACCATAATCAATTCAGTTGGCCCGACCAATTTGAACTAAGGCATCA
 ATGGCCTTGATCCAGTTGAAGTGGTTCGCTAACTGGTTCGATAATACCAGGAGCTTTATGTTTCGATTGGCCCGCTATTC
 GTGGTCTTAATCTCACTAAACCGTCAACTGGTTGACCTAATGGGTTAACGACCCGCAATCATGGCGTCCAGCTGGAACCTCC
 ATGATGCGGCCAGTCCGCTTAAACAGTATCGCCTTACGAATACCATAAAAATCCCTAAAACACAGTACCAACATCGTTGCTTTCG
 AGGTTTTGTACCATCCCGTAACTCCGTTACTGAATTCAGTAATTCACCTTGTAAAGCGTTGTGCGAGTCCGTGAGCAGGGCGATC

CCATCACCAACGCTAGGTGACAGTACCGGTTTTAGCAACTGAGAGCTCAGTTTTGATAACTTTCTAATTGTTGTTTGGATTAGAGCACTG
 ATTTCTTTCAGATTTAATGCTCATAAAAGTTTTACCTCTTCGTAACCTAATTTGTTGATGAGTGCCTGCTTAAATTCGTTAGTTGTAA
 CGCAACGCTACCATCAAACGTTTGATTATTTGACTTCACAATTACACCGCCAATGATTGCTTCATCGACTTTACGTGACAAAACAAC
 CTGATTGGCACCACACGTTTTGGCGAATGCCTTTCGCAATTGCATCAGTTGCTCATCTGACAACTTGACCGCAGACGTTACTTCCGGC
 ATGCACTATTTTTGCGACTCTCATCGAAACGCTGCTTCAAACGCGTCAAACAATGCCAACTAAGTTTCGACATGCGGCGCGT

***O. oeni* - Amplifikationsprodukt mit dem SAPD-Primer G-Not, Größe: 1943 bp**

Der grau hinterlegte Bereich wurde anhand eines Eintrags in der NCBI-Datenbank ergänzt

(Accession number: CP000411)

AGCGGCCGACTACATCTGGAAAAAAGGAGTTTTATGATCAATCGAGTTGTATTAGTT GGTAGATTAACCGCGACGTTGAGTTG
 CGTTATACAGGAAATGGTGATGACGTTGGATCAATTTACAATCGCTGTGCAACGAAATTTACGAAATCGCGCTGGTGAGCGCGAGGCT
 GATTTTATCAGTTGCGTGATTGGCGTAAACCTGCCGAAAACCTTGCCTTTTACAGGTAAGGAGCAATGGTTGGCGTCGAAGGC
 CGAATTCAGACCAGAATTTACGATAATAATCAGGACAGAAGGTTTATGTGACCGAGGTTGTTGTTGATAATTTCCAATTATTGGAG
 ACACGTGCTCAATCTGAAGCGCGTCTGTTCCGAAAATGGCAGTCTGGTAACACGGGGAATACCCTCCGCAAAGTCAGAGTAATTTT
 AATATTCCTAATCAACAGTCAATCCATTTGATTTCGCAATTCACAATAATGCGAGTTCGGCTTCAACTAATAGTCAAACGAGTTCT
 TCCAGCAGTCTTTAATACAGACACCGGGAATGATTTCGCTTGATATCTCGGATGATGATCTCCGTTTTAAAAATTAAGAAAGGAT
 ATCAAATATGGCCGAAGAACATTCAAATCAAAGAAGTCAGACCTTAATGGCGAACGTACTAATCGTCCAAGCGCAAACCTCGTGG
 CGACGGTGAAGACGTGGACGCTCGTCAAGGTGGACGTCGTCGTTGATTACTTAGCTGTTAATCATATCGATTATGTGACTATAAA
 GGACACTGAATTGCTTCAACGTTTCATCGCCGACAATGGCAAAATTTACCCTGCGGATTACTGGCACAAGCTCTAAAAATCAACG
 TAAAATTGCTACGGCAATCAAGCGTGGCGTATTATGGCTTTGCTTCCATTCGTTGCAACAACCTGATTTTTACGCTACATCTTTTT
 TAGTACTTCTTAATTGAAGTACTTTTTGTTTTCTTAAAAAAGGTATAAGAAGAGCTGATCGTGATAAAATTAATCCTTAGATGAA
 GAAATATCATACTTTACCATCGTTTATTAATAATATCGCGTCATTTACTTGATCGCGGTTTTTAGCATACTAGCAATTTTCGGTTTT
 TGTTTTTTCTTTGCATTTGGTCCAATCGTTGCAGTTGCGTGGGTTATTGTTGTCGCTTAGCATCGATTTTTAAATTTACAGTTTGAT
 TAATTCCTTGGGTGTCGACTTTCAAACCTATATGACCAAGTTGAATGGTGGGTTTTCAATCTCTCAAGCCAGTGGCTTTGATCAGAT
 GCCGATTGGCGTGATGCTTTTGAGTTCTCATGGAGAGATCGAATGGGTTAACGAGAATTTGTTGAATATAATGGCGATCGAACAGT
 TCTTGCAAAAAATTAAGAATGTTGATGCTGATTTATACGAGCTGGTCAATCAAATAAAGACAGCGGAGAAAACGGAAATCGATTG
 GCGCGACGGTAAGTTTCTCTTCAAATTCACAAAATGGTCAAGTGAATTTATTTATGGATCTGACCGATGTTCCAGATACGAAT
 ACTTTATGAAAAAGGTGCTCTCTTTATGGCTTAATCAGCGTTGATAATTATGAAGAAATTTAT CAGGATGCTACCGATTCCGAATC
 GAGTCGTTTAAATGCATTCATTTCTGGACGCTTGGAACAATGGGCAAAAAAGTATCATTTATTTTTGCGGCGAATGTGGCTGATCG
 CTATCTTTCTTTGGCGCTGCCTGAATTAATAATCATTGGAAGATGATCGTTTTCAATTTTGATACTGTCCGTGAAGAATCTTT
 GAAACAAAATATGCCCTGTCCCTATCGGTTGGAATTCGCTTTGGTGTTTTCCGACTTAAATGATTTAGCCGAACCTTGCTCATCGAAA
 TCTTGATCTGGCTCTTGACGCGCGCT

***W. paramesenteroides* - Amplifikationsprodukt mit dem SAPD-Primer C-Not, Größe: 1488 bp**

AGGGCCGCATAATTAATTCATCTAATTTGGATGAGAAATGCCTAATGCAGAAAGATGCTTTTGAGCTTCAATTCATAAAATGGCCT
 ATTTTCGCTAAATATCTTACGAGTTGCTTCTCTTGTGCTTTGACGATTTCCCAATTTTATCAATATGTTGTTGCCCAACTTCA
 GGTTCATTTGTTAGATGTTACGGACAACCGAAATGGCTAACCCTGTTGGCTTGAATACCTGTGTCGGCCAAAATTAACGTGCCA
 TCTAAAGACATATCAATTTTTTTCAGGTTGTTGCCCTTTAATAAACCAACAGCTTCATCATGTGCTGCCGTTGCAGTGTCTAATCCA
 GAAGGAGATCCATGTGTAATAGCTTCTTCGATACTTGCCCAACGTTGCAGTTCTTGTTTAGATAATGACTCATCGAAAAATCAAAA
 AATGCTCGAACAAATAGCGATGGCAGTTGCT GCTGATGAACCCATACCTCGTTCTTGAGGAATATGGATGTAATCGTCATTTGTAAG
 GGCAATTCATCTGATTTGAAATGTTGCAATAAACGGTTGATAAGTGTGCAATTCCTCATAGACTTCCGCCATTTGCTACCAATGGG
 CCTTGATAGGATTGTGATAGCACAACTGACCTGCTTCCGCTGATTTCGATTTTTACAGTCAATTGCTAAATCCGTTAAAGGAAGTGCA
 ATAGCTGGCTGGCCGTAACGACCGCATGTTCCGCAAGTAAATAACTTTGGCATGGCTGACGCCAATTCCTGGTTTTTTCACTTTG
 AAATTACCAATCCATTCATTTTTTATTTTAGCTTCTTAATCATACCAATTCATGACTAATTACATCCTAGATATTAGGATTTT
 AAGCTTAAAAGTTTTTTAATCTTTAATTTTTAAAAATATTCTGAATAAGTAATTTTTAGATATATTTTCATATGTTTCAGGAAATAATTC
 GATGCAAGTATCGGTAATATTACACTGCAAAATATGCTAATAATCAACATAAGATTAATAAGAGAAAGTGGTGGTACGTTTCGATGCT
 AAAAAGGACATCTATGCGGTTGTCGATCTAGAAACAACCGTAA CAACGAGCGAATCAGGTCGTATTATTCAAATGCGATTGCGTT
 CGTACAAAACAAAAAATAATTAATCAATTTTTCAACACTCATCAATCCTCATGAATCAATTCACGTAATGTGCTACAACCTTACAGG
 CATTAATGCCGAAATGGTGGCAGGGCTCCTTCAATTTGAAGAGTTGCTGAATCAATTCATACCATGCTAACGGGACTATTTTTGT
 AGTCCACAATGTCAACTTTGATTACCATTTTTAAACGCAGAAATTCACCGATTGGCATGAACACTCTTAATTTAGTAGCAATTGA
 TACAGTAACATTTAGCCAAATTTTGGCCAACCGCACCGGTTTAGATTAGTTGATTTAATTCATATTTGGCATTGGTACATGG
 GCGGCCGCT

8.1.4 16S rDNA-Sequenzen der Isolate aus verschiedenen Jungweinen

Die Sequenzen wurden mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen. Die prozentuale Übereinstimmung zum jeweiligen Typstamm ist für die Isolate 1.2d, 5.1b2, 10.1h, 10.3f1 und 10.3f2 in Klammern angegeben. Die Isolate 5.1a und 5.1e3 konnten auf Grundlage der 16S rDNA-Sequenz nicht eindeutig identifiziert werden.

Isolat 1.2d (98,5 % Übereinstimmung zu *P. damnosus* DSM 20331^T, Accession number: NR_042087)

TTTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCTGTG
 ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTT
 CCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCT
 GTGTGAGAGTAAGTCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACTCCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTATCCGCATTTATTGGCGGTACAGCGAGCGCATGCGGTTTTTTAAGTCTAATGTGAAACCCCTTCGGCATAACCGAAGA
 AGTACATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA
 CACC

Isolat 5.1b2 (99,8 % Übereinstimmung zu *O. oeni* JCM 6125^T, Accession number: AB022924)

GCAGTCGTACGCTAGCCGCTGAATTGATCCTTCGGGTGAAGTAGGCAATGACTAGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTAAGAAA
 CCTGCCCTTTAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCGTAACAACAAATCACACATGTGATCTGTTTGAAGGTCC
 TTTTGGATCGCTAGAGGATGGTCTTTCGGCGTATTAGCTTGTGGTAGGGTAGAAGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTG
 AGAGACTGGCCGGCCACATTGGGACTGAGACACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATTTCCGCAATGCACGAAAG
 TGTGACGGAGCGACGCCGCTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTAAGGGAAGAATAACTGAATTGAGAGAAAG
 TTTTCAGCTTGACGGTACCTTACCAGAAAGGGATGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCG
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAATCCCAGGCCAACCTCGGAACTGCATTGGAACCT
 GATTTACTTGAGTGCATAGAGGCAAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAAGAACCAGTGGCGAAAG
 CGGCTTGCTAGATCGTAACCTGACGTTGAGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCATACCGTAAACG
 ATGGGTGCTAGTTGTTAAGAGGTTTCCGCCTCCTAGTGACGTAGCAAACGCATTAAGCACCCCGCTGAGGAGTACGGCCGCAAGGC
 TAAAACCTTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGATACGCGAAAACCTTACCAGGTCT
 TGACATACCAATGATCGCTTTTGTAAATGAAAGCTTTTCTTCGGAACATTGGATACAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTCCG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTATTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGT
 GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCAACACAGTGTACAATGGGAAGTACAAC
 GAGTCGCAAACCGCGACGGTAAAGCTAATCTCTTAAAACCTCTCTCAGTTCCGACTGGAGTCTGCAACTCGACTCCACGAAGCGGA
 ATCGCTAGTAATCGGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAAATCATGGGAGTCCGGAAG
 TACCCAAAGTCGCTTGCTAACTTTTAGAGCCGGTGCCTAAGGTAATAATCGATGACTGGGATAAGTCGTAACAAGAGCCTCCACTC
 CCC

Isolat 5.1a (*Acetobacter* sp.)

CGCACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGAATCTATCCATGGGTGGGGGATAACTCCGGGAAACTGGA
 GCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTGATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGG
 CCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
 GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCCGATTGTAAAGCACTTTC
 GCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT
 GCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGCGGTGAGGCGTTGTACAGTTAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAGCACTTATTA
 ATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCAAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGGTTGC
 GAAGGCGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGT
 AAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTTAGTTACTCAGTGTGCTAGCTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGA
 AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCCTTACCAG
 GGCTTGTATGGGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGGACCTACCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTGGTGGGCACTCTAGAGAGACT
 CCCGGTGACAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTATGCTGCTGGGCTACACACAGTCTACAATGGGAGAT
 GACAATGGGAAGCTAGATGGCGACATCGTGTGATCTCAAAAAGTCTGCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAG
 GTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTT
 GGTTTGACCTTAAAGCCGGTGAAGCAACCCGCAAGGGGCGCAGCCGACCACGGTCCGGTCCAGACTGGGGTGA

Isolat 5.1e3 (*Acetobacter* sp.)

GCAGTCGCACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTAGGAATCTATCCATGGGTGGGGGATAACTCCGGGAAA
 CTGGAGCTAATACCGCATGATACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCCCTGTGGAGGAGCCTGCGTTTGATTAGCTTGTGGTGGGGT
 AATGGCCTACCAAGGCGATGATCAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTTCCGTTACGGG
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCCGATTGTAAAGCA
 CTTTCGGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTA
 GCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTGTACAGTTAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACTGGGAGCTGC
 ATTTAATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACCAGG
 GTGGCGAAGGCGCAACCTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAC
 GCTGTAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTAACCTTAGTTACTCAGTGTGCTAGCTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGG
 CCGAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGCGCAACCCCT
 ACCAGGGCTTGTATGGGTAGGCTGTGTCCAGAGATGGGCATTTCCCGCAAGGGACCTACCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAG
 CTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTATCTTTAGTTGCCAGCATGTTGGGTGGGCACTCTAGAG
 AGACTGCCGGTGAACGCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGCTGCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
 CGGATGACAATGGGAAGCTAGATGGCGACATCGTGTGATCTCAAAAAGTCTGCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCA

TGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGG
GAGTTGGTTTGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCCGCAAGGGGCGCAGCCGACCACGGTTCGGGTTCAGCGACTGGGGTGAA

Isolat 10.1h (99,5 % Übereinstimmung zu *P. parvulus* NBRC 100673^T, Accession number: AB681216)

TCGAACGCACCTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAAAGTAAACCGCATGGTTAACTTTT
AAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA
ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAATACTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGTGTG
AGAGTAACTGCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCTTATCCGGATTATTGGGCTTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGC
ATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAAGAGACCAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
TGCCGTAACAGTGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTAC
GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
GCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACA

Isolat 10.3f1 (99,7 % Übereinstimmung zu *P. parvulus* NBRC 100673^T, Accession number: AB681216)

CGCACTTTCGTTGAATGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACTGCCCAGAAGTGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAAAGTAAACCGCATGGTTTACTTTTAAAG
ATGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCC
GACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGA
CGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAATACTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGTGTGAGAGT
AACTGCTCATGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATTGG
AACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAAGAGACCAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGC
GAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGT
AAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGACCGC
AAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCA
GGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGT

Isolat 10.3f2 (99,9 % Übereinstimmung zu *P. parvulus* NBRC 100673^T, Accession number: AB681216)

TGAATTAGAGGTGCTTGCACCGAAGATGATTTTAGCTATAAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAA
GTGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAAAGTAAACCGCATGGTTTACTTTTAAAGATGGCTTCGGCTATC
ACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGA
GCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTAGGGTCGTAATACTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGTGTGAGAGTAACTGCTCATGCAGT
GACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGG
GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATTGGAAGACTTG
AGTGCAGAAAGGACAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG
GTCTGTAAGTAACTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACAGATGAATGCTA
AGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
AAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTC
TGCCAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGT

8.1.5 Sequenzen des *rpoB*-Gens verschiedener Milchsäurebakterien

Arten

Die Sequenzen stammen aus der NCBI-Datenbank; zugehörige accession numbers sind angegeben. Die Binstellen der Primer *rpoB*-F und *rpoB*-R sind blau hinterlegt.

***Lb. brevis* ATCC 367**

Accession number: CP000416 (Region: 1656726 - 1660337)

TTGGCAGGACACTTAGTGAAATACGGGAAACCCGTACGCGCCGAGCTATTCCGGAATCAAGGAAGTCTTGTGATTTACCTAACTTG
ATTGAGATTCAAACCAATTCCTATAATTGGTTCCCTGACGAAGGTTTACGCGATATGTTTCGACGACATCATGCCAATCGAAGATTTT
CAAGGAAACCTTTCGTTAGAGTTTGTGATTATCAGTTACTAGAACCCAAATACAGCGTGGATGAAGCACGGGAACATGATGCCAAC
TACTCGGCACCGCTACACGTCACCTGCGGTTAACCAACCAGAAACGGGTGAAATCAAATCAAAGACGCTCTCTTTGGTGACTTT

CCATTAATGACGGCCCAAGGGACCTTCATTATTAACGGGGCGGAACGGGTTATGTTTCTCAATTAGTCCGTTACCAGGGGTTTAC
 TTCAATGAAGATACGGATAAGAACGGTTCGGACAGTTTACGGTGCCACTGTGATCCCTAACCGGGTGCATGGCTAGAAATTTGAAACT
 GATGCGAAGAACGTTTCTTACGTTTCGGATTGACCGGACCGGGAAGATCCCAATGACCGAATTAGTTCCGGCTTAGGGTTTGGTTCT
 GATGAAATCTTAGATATCTTAGGTGACAACGAAGCTTGAATGCAGACGTTGAAAGGATATCCATAAGAACACCGGATGACTCA
 CGTGTGCAAGAGTCTTGAAGGATATCTACGAACGCTTGCCTCAGGTGAACCTAAGACCGCGGACTCTTACGGAGTTTGCCTGACT
 GCTCGGTTCTTCGATCCTAAACGCTATGACATGGCACCAGTTGGTTCGTTACAAGACTAACAAGAAGCTGAGTTTAAAGACCCGTTTG
 CTGGGCTTGACCTTAGCTGAAACGTTGGCTGATCCTGATACCGGTGAAATTTATGCCGCTAAAGAACGGTCTGTGACAAGGACGTG
 ATGAAGAGCTTAGCACCATTCTTGATCAAGATGATTTCAAGATGGTGACTTTCCAACCTTCTGACGAAGCCGTTGTACGGAAACA
 CTAATAATACAAATATCAAAGTACAATCACCAGATGATCCAGAACAAGAAGTTCTGTGATTGGGAATGGGAACATCGATATCAAG
 CTGAAGCACATTCGTCAGCCGATATTATTGCATCCATGAACACTTCTTTGACTTACAACCTGGGGATTGGTAACTGATGATATT
 GACCACTTGGGGAACCGGATTCGTTCCGTTGGTGAATTACTCCAAAACCAATTCCGGATCGGGTTATCCCGGATGGAACGGGTT
 GTTCGTGAACGGATGTCCATTCAAGATGCTGCGACGGTAACGCCA **CAACAATTGATTAACATTCGTCCTGT** CGTGGCCTCAATTA
 GAATCTTTGGGCTTTCACAGTTGTCTCAATTCATGGATCAGACTAACCCGTTAGGTGAATTAACGCATAAACGGCGTCTGTCTGCT
 TTGGGACCTGGTGGGTTAACCGGTGACCGGGCCGTTATGAAGTCCGGGACGTGCACTATAACCATTATGGTGGATGTGCCAATT
 GAAACGCTGAAGGCCTAACATGGGTTGATCAACAGTTTGTCCAGCTATGCCGGGTTAACAGTATGGGTTTCATCGAGACGCCA
 TACCGTCTGTCTTCTGGGATACGCATAAGGTTACCGATAAGATCGATTACCTGACAGCTGATGAAGAAGATAACTATGTTGTTGCT
 CAGGCCAACGCCATTAATGATGATGGTTCTTCAATACGGATACGATCATGCCCGTCCCAATCGAAACACTGAAACACTGAAACCGAT
 GCTGACCGGATTGAC **TACATGGATGTTTCGCCTAA** GCAAGTTGTTGCGGTTGCCACGGCATGTATTCTTTCTTGGAAAACGATGAC
 TCCAACCGGGCCCTGATGGGTGCCAACATGCAACGGCAAGCTGTGCCATTGTTGAACCCACATGCGCCATTAATTGGTACTGGGATT
 GAATACAAAGCGGCCCATGACTCAGGGGTTGCTTTGATCAGTCAACATGATGGGACTGTTGAATACGTTGATGCACGTGAAATTCGT
 GTTCGGCGTGAAGATGGTGCCCTTAGACACTTACAAGCTCATGAAGTTCGCCCGGTCAAACGGTGGGAAGAATACAACCAACGCCA
 ATCGTTAAGGTCCGCGACCATGTCGATAACGATGAAGTCTTGGCTGATGGTCTTCCATGGAAAATGGGGAATTGGCTTTGGGTCAA
 AACCCATTGATTTGCCTTCATGACTTGGCAAGGTTACAACCTCGAAGATGCCATTGGGATCAACGAGCGGTTGGTTCGCGATGACGTT
 TACACGTTAGTTTATTTAAGAATAACGAATCAGAAGCGGTGATACGAAGTTCGACCTTGGACCTGAAGAAATGACCGGTGAAATTCCTAAC
 GTTGGGGAAGATGCTTGAAGAACTTGGACGAAGACGGGATTTCCGTTGTTGGTGCAGGAAATCAAGATGGGGATATCTTAGTTGGT
 AAGGTAACGCCCTAAGGTTGTTACTGAATTTCCGCTGAGGAACGACTCCTTCATGCCATCTTTGGTGAAGGCGCCGTTGAAGTTCGG
 GATACTTCTCTGAAGTACCAGTGGTGGTGGCGGATCATCAAGATGTGAAGATCTTTACCCGTGAAATGGGGACGAATGTCA
 CCAGGTGTCAACATGATGGTTCCGGTCTACATCGCGAAAAGCGGAAGATCCAGTTGGGGACAAGATGTCTGGACGTACCGTAAAC
 AAGGGGACCGTTTCACTGGTTATCCCTGAAGAAGATAGCCGTTACATGCCAGATGGTACCCCAATCGACATTTATGTTGAGTCCCATG
 GGTGTGCTTCCCGGATGAACATCGGGCAAGTGTCTCGAATTCGATTTGGGGATGGTGTCTGCAAGCTCGGTGTGCACATGGCAACC
 CCAGTCTTTGATGGTGCACCAAGATACAGATATTGCGGACGCTGTTAAGGAAGCCGGGATGGCTGACGCCAACACTGTCTTATAT
 GATGGTGAAGTGGTGAACCGTTTGGATAAGCGGGTTGCCGTTGGGGTTCATGCACTACCTGAAGTTGGCCACATGGTTGATGACAAG
 ATGACGCGCCGTTCTATCGGACCTTACTCACTGGTTACGCAACAACCCCTTGGTGGGAAGCGCAATTTGGTGGTACGCGTTTCGGT
 GAAATGGAAGTTTGGGCTTTGGAAGCTTATGGTCCGCTTATACGTTGCAAGAAATCTTGACGTACAAGTCTGATGACGTGGTTGGT
 CGGTTAAGACCTACGAAGCCATTTGTTAAGGGCGATCCAATTCAAAGCCAGGTGTTTCTGAACTCTTCCGCGTGTAGTGAAGGAA
 CTCCAATCTTAGGGCTGGACATGAAGGCTTAAATGGCGACAAGAAGAATCGAACTCCGTGATATGGACGACGAAGACGACGAT
 GTTGTAAATGTGGATGCGTTGAGCAAGTACCGCAACAACAGGAAGAACAACGGAAAGCCGCTGCTCAGACTGATGAATCCAAGACC
 CGCCAGCAACAAAAAATGAAAGTCAACCCGAATACACAAGACTAA

***Lb. buchneri* NRRL B-30929**

Accession number: CP002652 (Region: 1783389-1786997)

TTGGCAGGACATTTAGTTAAATATGGAAAACACCGTACCCGACGAAGTTATGCACGAATTAAGAAGTGCTTGATTTACCGAACCTG
 ATTGAAATCCAGACTAATTTCTTACAACCTGGTTTTTACATGAGGACTTAAGGAAACCTTCGACGGCATTATGCCAATCGATGACTTT
 CAGGGCAAGCTTTCTTTAGAGTTTGTGATTATCAATTTAACACCAAAGTACACCGTTGATGAGGCGCGTGAACACGAAGCAAAC
 TATCTGCTCCACTTCACATTACCTTAAAATTAACCAATCATGAGACTGGCGAAATTAAGACGCAAGATGTGTTTTTGGCGATTTT
 CCATTAATGACTGATCAAGGAACATTTATTTAATGGTGTGTAACGAGTAATGTTTTACAAATTTGGTTCGTTACCCGGCGTTTAT
 TACCATGCTGATAAAGATAAGAATGGCCGTGATTCATTTGGTACTACTGTTATCTTAACAGAGGTGCTTGGCTTGAATTTGAAACC
 GATGCAAAAATAATCGCGTACGTTTCGAATTTGATGCAACACGAAAATTCCTTTAACAGAATTAATTAGAGCCCTCGGCTTTGGCAGT
 GATTCAGAAATCATTTGACATCTTGGGCGACAACGACAGTTTAGGTTGACCTTGAAGAAAGATGTTCAAAAAGACACTGACGATTC
 CGTGTGAAAGAGTCACTGAAGGATATTTACGAACGCTCTACGTTCCAGGTGAGCCTAAGACTGCTGATTATCAAGAAGCTTGTGACT
 GCTCGTTTCTTTGATCCAAAACGTTATGACATGGCGCCGTTGGCCGTTACAAGACCAACAAGAACTGAGCTTAAAGAACCCTG
 TTAGGTTTGGACTGGCTGAAACCTTGGCGATCCTGATACCGGTGAAGTATTGCTCAAAAGGGCACCGTTGTACGAAAGATGTT
 ATGAAGGACTTGGCACCATTCTTGATAACGATGAATTTAAAGCTTACACCTTTACCCCTTCAGATGAAGCCGTTGTGACTGAACCA
 ATGACTGTTCAAATCATTAAGTTCAATCAGTTAACGATCTGACCGAGTGGTTCCTTTAATTTGGTAAATGCAACACTTCCATTGAGC
 TTCAAGCACATTACTCCAGTGCATCATTTTCAGCAATGCAACTACTCTTTTAACTTCAAGAAGGCATTTGGTCAATTTGATGATTA
 GATCACTTGGGTAACCGTTCGAATTCGCTCAGTCCGTTGAATTTGCTGCAAGAACGTTCCGAATTTGGCCTGTACGGATGGAACGAGTT
 GTTCGTGAAAGAATGTCAATTCAGGATACTTCAACTGTGACACCA **CAACAATTGATCAATATTCGTCCTG** TGTTCCTCAATCAA
 GAATCTTTGGTTCATCAGCTTCTCAATTCATGGACCAGCAACCCGTTGGTGAATTAACCTATAAGCGTCTGTTTGTCTGCC
 CTTGGACCTGGTGGTTGACTCGTGACCGTGCAGGATATGAAGTCCGGGATGTTCACTATAACCCTATGGCCGGATGTGTCCGATT
 GAAACCCCTGAAGGCCCTAACATTTGATTGATTAACAGTTTGTCCAGTTACGCTCGGGTTAACAAAATATGGTTTTCATTGAAACACCA
 TACCGCGTGTGATTGGACCCTCATAAGGTTACTGATCGAATGATTTGACTGCTGACGAAGAAGATAACTTTGTTATGGCC
 CAGGCCAACTACCATTGAATGATGATGGTTCTTTGTCATTAACATCGTTTATGGCCGTCACAAGTCAAACAACTGAAATTTGGT
 ATCGACAAGGTCGAT **TACATGGATGTTTCGCCTAA** GCAAGTAGTTGCCGTTGCCACTGCATGTATTCTTTCTTGGAAAACGATGAC
 TCCAACCGTCTTTGATGGGTGCCAACATGACGCGTTCAGGCCGTTCTTTGATCGATCCTCATGCACCCTTGTGGTACTGGTATC

GAATACAAGGCCGTCATGATTCGGTGTGCTACTGATCTGTAAGAATGAAGGAACTGTTGAATACGTTGATGCTCGTGAAATTCGA
 GTACGTGCTGACGACAAGTCCCTTGATAAATAATAAATTAATGAAATTCGGTCTGTTCAAATGGCGGTAAGAACTACAACCAGCGTCCA
 ATCGTGAAGGTTGGCGACCGAGTTGATGCTGACGAAATCTTAGCAGATGGCCCATCAATGGAAGGCGGAGAATTTGGCACTGGCCAA
 AACCTGTGCTGATTTTATGACTTGGCAAGGATACAACCTCGAAGATGCCATCGCATCAGCGAAGCTGTTGTTAAAGATGACGTT
 TACACTTCAATTCATATTGAAGAGTACGAATCAGAACTCGCGACACCAAATTAGGACCTGAGGAAATGACTCGAGAAATTCCTAAC
 GTTGGTGAAGATGCTTTGAAGAACCCTTGATGAAGATGGTACTGTTGCAATTTGGTGGCAAGTTCATGATGGTGACATCTTGGTTGGT
 AAAGTTACCCCTAAAGGTGTGACTGAATTATCAGCTGAGGAGCGTTTGTCTCACGCAATCTTTGGTGAGAAATCACGAGAAGTTCGT
 GATACCTCATTGAGAGTTCCTCATGGTGGCGGCGGAATCATCCAGGATGTTAAGATCTTCACTCGTGAAAACGGGGATGAGCTTCA
 CCTGGTGTAAATAAGATGGTTCGTGTCTACATCGCTCAAAAACGTAAGATTCAGTTGGTGATAAGATGTCCGGCCGTACCGGTAAC
 AAGGGTACTGTTTCTGTTGTTATCCAGAAGAAGATATGCCATCTTGCCTGATGGGACACCAGTTGACATCATGTTGAGTCCCATG
 GGTGTGCCATCACGGATGAACATTTGGACAAGTTTGGAACTCCATTTGGGAATGGCTGCCCGCAGACTCGGAATTCACGTTGCAACA
 CCTGTTTTTGTGATGGTGCTCGTGATAAAGATATCTGGGATGCAGTTAAAGAAGCCGGCATGCCTTCAGATGGTAAGTACATCTTGTAT
 GATGGCCGAACCTGGTGAACCATTGATAAAGAAGATTGCCGTTGGTGTGATGCATATCTTAAAGTTGGCCACATGGTTGACGATAAG
 ATCCATGCACGTTCAATTGGACCTTACTCATTGGTTACCCAACAACCCTTGGTGGTAAAGCACAATTTGGTGGCCAGCGTTTTGGT
 GAAATGGAAGTTTGGGCACTTGAAGCTTATGGTGCCGCATATACTCTCCAAGAAATCTTGACTTACAAATCAGATGACGTTGTTGGC
 CGTGTCAAGACCTACGAAGCCATTGTGAAGGGTGAAGCAATTCCAAAGCCGGGTGTACCGGAATCATTCCGGGTTCTTGTAAAGGAA
 TTGCAGTATTAGCCCTTGATATGAAGTTCGATGCGAGTATAAAGAGATTGAACCTCGTGATCTTGTGACGATGACGACGTT
 GTAAACGTTGACCGATTGACAAATTTGGCTGACAAGAAGAGAGCAGGAAGATCATGCAGCTAAAACAACCTGCTGATCAAGTTGAA
 ACACCAAGTAAATCAACCAACGTTAAACAACAGTAATGACTAG

***Lb. casei* ATCC 334**

Accession number: CP000423 (Region: 2492871-2496470)

TTGGCAGGACACTTAGTTAATTAATGGTAAGCACCGGACACCGGTCCTATGCCGGATCAAGGAAGTTTTGGATCTTCTTAATCTG
 ATCGAGATCCAACGAATTTTACCAATGGTTCCTCGATGAAGGTCTCAAAGAAATGTTGACGATATTATGCCGATCGATGACTTT
 CAAGGGAAACTGCTACTGGAATTTGTCGGCTATCAACTGCTGGAACCAAATAATACTGTTGAGGAAGCACGCCAACACGATGCAAC
 TACTCTGCACCGTTGCATGTGACCTTGCCTTTAACCAACCATGAAACAGGCGAGATTAAGAGCCAAGATGTGTTCTTTGGCGACTTC
 CCGCTGATGACCAAACAAGGGACGTTTATTATTAATGGTGCCGAACGGGTGATCGTTTCTCAGTTGGTCCGTTACCTGGCGTTTAT
 TTCCATAGCGAAACAGACAAGAACTCACGTGTCATTTATGGCACAACCGTGATTCCTAACCGGGGCGCATGGCTTGAATATGAAACT
 GACGCCAAAGATATCGCGTATGTCGGAATCGATCGGACCGGAAGATCCCGCTGACCGAATTTGGTTCGGGCTTGGGCTTCGGTTCC
 GATCAAGACATTAACAACATGTTGGTGACAATGATTCTTGTGCTTACGCTTGAAAAAGATGTGCATAAGAACACCGGATGATTC
 CGTACGGACGAAGCGTTGAAGGATATCTACGAACGTTACGTCCTGGTGAACCAAAAACAGCCGATTCATCGCGGTCTCTTTTGTAT
 GCCCGCTTCTTCGACCCGAAGCGTTATGATCTTGCTTCGGTGGTTCGTTACAAAGTGAATAAGAAGCTGAGCCTTAAGACCCGGCTT
 TTGAATCAGGTTTTTGGCAGAAACACTGGCCGATCCTGATACCTGGTGAAGTCAATGCGCAAAAAGGGCACCAAGGTTGATCGTCAAGTG
 ATGGACAAGTTGGCACCATATCTTGACCGCAGCATTCAAGACCATCACCTACCAACCTTCCGATCAAGGCGTTGTCATGATCCG
 ATCGAATACAGAGTATCAAAGTATACTACAAGTGAACCCCTGATAAAGAAATCAATTTGATTGGTAATGGTCAATTTGGTAAAAA
 GTGAAGCACATCGTCCCGCTGATGTTTTGGCATCAATGAACTACTTCTCAGGAAGGCTTGGGTTCAATTTGATGACATTT
 GATCACTTGGGTTAACCGCGGATTCGTTCCGTTGGTGAACCTGTTGCAAAAACCAATTCGGATCGGGCTTCTCGGATGGAACGTT
 GTCCGTGAGCGGATGTCCATTCAAGATACCGTACGGTAACGCGC**CAACAATTGATCAACATTCGGCCAGT**TGTAGCTTCTATCAAG
 GAATCTTCCGGCAGTTCCCAACTGTGCGAGTTTATGGATCAGACGAATCCGCTTGGTGAAGTTAACGCATAAGCGTCTGTCTGTCTGCT
 CTTGGACCTGGTGGGTTGACCGTGACCGTCCGGTTATGAAGTCCGGGACGTTCACTACACCATTATGGCCGATATGTGTCCGATT
 GAAACGCCTGAAGGCCGAACATCGGGTTGATTAACAGTCTTGCTTCTTATGCGGTTGTTAATCCTTATGGTTTTATTGAAACGCCA
 TATCGTCTGTTTTCTTGGGATACGCATAAAGTTACCAGAAAATCGACTATTTGACTGCCGATGAAGAAGATAACTACATCGTTGCG
 CAGCGCAACTCCCTTTGAACGACGATGGTTCCTTTGTTGACGAAACCGTTGCTCGTCAAGGATAACAACTTAAATGAAATCTCT
 CCAGACAAAAGTTGAC**TACATGGACGTTTACCTAA**ACAGGTTGTTGCGGTGCGCAACGGCTTGCAATTCCTTCTTGGAAAACGATGAC
 TCCAACCGTGTCTTGTGATGGGTGCAACATGCAACGTCAGGCTGTGCCGTTGGTTAATCCGCATGCCCCACTTGTGGGACAGGGATG
 GAATACAAGGCAGCCCATGACTCCGGGACAGCGTTTTTGGCTAATAACGCTGGTACCCTTGAATATGTTGATGCTAAGCAAATTCGG
 GTTCGTGCTGAAGATGGTGCCTTGGATGCCTACAACCTTGTGAAATTCAGCGTAGTAACGCCGTA AAAACTACAACCAGCGGCCA
 ATCGTGACCATCGGCGATCATGTTGATGTTGACGAAATCATCGCTGATGGACCAGCCATGCAAAAATGGTGAATTTGGCATTGGGACAA
 AACCCGATCATCGCTTCATGACTTGAACATGTACAACACGAAGATGCGATTGTGCTCTCCGAACGACTCGTTAAAGATGATGTT
 TACACCTCAATCCATATTGAAGAATATGAATCTGAAGACGTTGACACCAAGCTTGGACCTGAAGAAGTAACCGGTGAAATTTCAAAC
 GTCGGTGAAGAAGCCCTTAAGGATCTGGATGAATTTGGTGTGCTTGTGTCGGTGTGAAAGTGCCTGACGGTGTATTTTGGTTCGGC
 AAGGTTACACCTAAGGGCGTTACTGAATTTGTCAGCTGAAGAACGGTTGCTGCATGCGATCTTTGGTGAGAAAGCACGTGAAGTACGT
 GACACCTCGCTGCGGGTTCCTCATGGCGGCGGCGGGATCATTCAAGACGTTAAGATCTTTACTCGTGAAGCCGGCGATGAGCTGTCT
 CCTGGTGTGAATATGATGGTCCGCTTTATATTACGCAGAAGCGGAAGATTCAGGTCCGGTGAAGATGGCCGGTGTGTCACGGGAAC
 AAAGGGACGGTTTTCCGTCGTTGTGCCTGAAGAGGACATGCCACTTCTGGGACAGCGTACCCAGTTGACATTTGCTTGTCAACAAATG
 GGTGTGCAAGTGTGATGAACTCGGACAGGTGCTGGAATTCATCTGGGATGGCTGCACGTAACCTGGGCTTGGGCTTCAATGTTGCAACG
 CCTGTTTTTGTGATGGCGCAATGATAAAGATCTGTGGCAACCGTTAAGGAAGCCGGTATGGCATCTGATGGTAACTGTCTGTCTGTAT
 GACGGTGAACCTGGTGAACCATTGAAAACCGGTTTTCTGTGCGAATCATGTACTACATGAAACTGTCTCACATGGTTGACGATAAG
 ATTCATGCTCGTTCCATTGGACCTTACAGTTTAGTTACCCAACAGCCACTTGGTGGTAAAGCTCAGTTTGGTGGTACGCTTTTTGGT
 GAAATGGAAGTTTGGGCCCTTGAAGCTTATGGCGCGGCTTATACTTTGCAGGAAATCTTGACGTACAAGTCCGATGACGTTGGTGGC
 CGGGTTAAGACCTATGAAGCCATCGTTAAGGGCGAACCGATTCCCTAAGCCGGGTGTACCGAATCCTTCCGTGTGCTTGTCAAAGAA
 TTGCAAGCATTGGGCTTGATATGAAGTCTTGGCGCGGATAAAAAGAAATTTGAACCTGCGGACATGGACGACGACGAGGATGAC
 ATTGTTCTGTGATGCTTGGCGAAGTTTGGCTCAGCAGGAAGAAAAGAAAGGCTCACGAAGCCGACGACAAAGCAACTGACGGT
 AAGTCTGCCAACAGTACCAGCATAAAGAAATAG

***Lb. hilgardii* ATCC 8290**

Accession number: ACP01000098 (Region: 32421-36038)

GTGAAAACTTGGCAGGACACTTAGTTAAATATGAAAAACACCGTACCCGACGAAGTTACGCACGGATTAAAGAAGTGCTTGATCTC
 CCAAACCTTATTGAAATCCAGACTAATTCTTACAACCTGGTTTTAAAAGACGGCCTTCGTGAGACCTTCGACGGTATTATGCCAATC
 GATGATTTTTCAAGGAAAGCTTTCATTAGAGTTTGTGGATTATCAGCTATTAGAACCAAAGTACACTGTTGACGAAGCACGTGAACAT
 GAAGCAAATTATTCAGCACCCTTCATATCACATTGAAATTAACCAATCACGAGACTGATGAAATCAAGACACAAGATGTATTCTTT
 GGCGATTTCCCATTAATGACTGATCAAGGTACTTTATCATTAAACGGCGCTGAACGAGTTATTGTTTCACAATTGGTTTCGTTACCC
 AGTGTTTATTATCATGAAGACACTGATAAAAAATGGTCGTATTTTCATATGGAACCCAGGTTATCCCTAATAGAGGTGCCTGGCTTGAA
 TTTGAAACTGACTCAAAGAACATTTTCATATGTTGCAATTGACCGAACTAGAAAGATTCCGCTTACTGAATTGATAAGAGCTTTCCGGA
 TTTGGTAGTGATGGTGAATCAGTACATTTTGGGGACAACGATAGTCTTGAATTAACGCTTGAAAAAGATGTCCATAAGGATACT
 GACGATTCACGTGTGAAGAGTCACTGAAAGATATTTACGAACGTTTTCGCGCCAGGTGAGCCTAAAACCTGCTGAATCATCAAGAAGT
 TTAAGTACAGCAGCCTTCTTTGATCCAAAGCGTTATGATATGGCGCTGTTGGTTCGTTATAAAACCAACAAGAACTTAGTTTGAAG
 AATCGTCTTTTGGGATTGACATTTGGCTGAAACACTTGTGATCCGAAACTGGTGAAGTTATTGTCCAAAAGGACACTGTTGTTACC
 AAAGACGTTATGAAAAATTTGTCACCATATTTGGATCAAAAAGAAATTTAAAGCCTATACCTTAACTCTTGACGAAGCTGTTGTG
 ACTGAACCAATGACGGTTCAAATCATTAAAGGTGACTCAGCAAACGATCCTGAAAAGGTTGTGCCGTTAATTGGCAATGACAAATATT
 CCACTGGCATTCAAGCACATTACACCAGCCGACATTATCGCTTCGATGAACTACTTCTTTAATCTTCAAGAGGGCATTGGTTCAATT
 GATGATATTGATCACTTGGGTAATCGACGAATTCGTTTCAGTTGGTGAAGTTACTGCAAACCAATTCGCAATTGGCTTGTCCAGAAATG
 GAACGTGTTGTTTCGTGAAAGAATGTCGATTACAGGATACGTCAACTGTGACACCA**CAACAATTGATTAATATTCCTCCAGT**AGTTGCT
 TCAATCAAAGAATTCTTTGGATCATCACAATTGTCGCAATTTCATGGACCAAACCTAACCCGCTTGGTGAAGTTAACCCATAAGCGTCGT
 TTAATCTGCTCTTTGGACCTGGTGGCTTGACTCGTATCGTCCGGGATGAAGTTCGAGACGTCACACTATAACCATACGCGGTATG
 TGTCGATTTGAACTCCTGAAGGTCCTAACATTGGATTGATCAACAGCTTATCCAGTTATGCTCGGATTAATAAATATGGTTTATT
 GAAACACCGTATCGGCGTGTGGATTGGACAAGCCATAAAGTTACTGATCGAATTGATTATTTGACGGCTGACGAAGAAGATAAATTTT
 GTTATTGCACAGGCCAACTCACCGTTGAATGACGACGGTCTTTGTTAATAATGTGGTTATGGCTCGCCATAAGTCAAATAATATC
 GAAATCAGCATCGACAAAGTTGACT**TACATGGACGTTTCACCTAA**ACAAGTTGTTGCCGTTGCAACGGCATGTATCCCTTCTTGAA
 AACGATGATTTCAATCGTGCATTGATGGGCGCAAACATGCAGCGTCAGGCTGTCCATTAGTTGATCCACACGCCACACTTGTGGT
 ACCGGTATCGAATATAAGGCTGCCCATGACTCTGGCGTTGCACCTATTTGCAAGTTTGGCGGAACAGTTGAGTATGTAGATGCCGCT
 GAAGTTTCGATTCGTGCGATGATGGCAGCTTGATAAGTATAAATTAATGAAATTTTCGTCGTTCAAACGGTGGTAAAAATTAACA
 CAACGACCAATTGTCAGAGTTGGCGACCATGTGGATCCTGATGAAGTACTAGCTGATGGACCA**CAACAATTGATTAATATTCCTCCAGT**
 CTTGGTCAAACCAATCGTTGCCCTTTATGACTTGGCAAGGTTATAAATTTGAAGATGCAATCGCAATTAGTGAACGTTTGGTTAAA
 GACGATGTCTATACGTCTATTTCATATTGAAGAATATGAATCAGAAAACCCGTGATACCAATTAGGACCCGAGGAAATGACTCGCGAA
 ATTCTAATGTTGGTGAAGATGCTTTGAAGGACCTTGATGAAGGTGGCACAATTTCGAATCGGTGCCGAAGTTACGATGGCGATATC
 TTAGTTGGTAAAGTGACACCTAAGGGGGTTACTGAATTATCAGCCGAAGAACGTTTGTCTCATGCCATTTTTCGTTGAAAAATCGCGT
 GAAGTTTCGATCACTTTCATTGAGAGTACCTCATGGTGGCGCGGTTATTGTTCAAGATGTTAAGGTTCTTACTCGTGAACCCGGGAT
 GAATGTCACAGGTGTCATCGCATGGTTCGTGCTATATCGCCAGAAACGTAATAAATCAAGTGGGTGATAAGATGTCGCGCGCT
 CATGGTAAACAAAGTACCGTTTCTGTTGTTATCCCTGATAAGAAGATATGCCATTCTTACCAGATGGAACCCCGTTGATATTATTG
 AGTCCAATGGGTGTGCCATCAGTATGAACATTGGTCAAGTTTGGAACTTCATTTGGGCATGGCAGCTCGAAAGCTTGGTATTAC
 GTTGAACCTCCTGTTTTGATGGTGCTTCTGATAAAGATATCTGGAATGCTGTTAAAGAAGCCGGTATGCCAAGGATGGAAAATAC
 ATCTTTTATGATGGTTCGTACAGGTGAACCGTTTGATAAGCCAATTGCAGTTGGTGTATGCATACCTGAAGCTTGGCCACATGGTT
 GATGATAAGATCCATGCACGTTCAATTGGACCTTACTCACTCGTAACGCAACAACCACTTGGTGGTAAAGCACAATTTGGTGGTCAG
 CGTTTTGGTGAATGGAAGTTTGGGCACCTGAAGCCTATGGTCCGCGCATATACCTTGAAGAAATTTGACTTACAAGCTGATGAT
 GTTGGTGGTGTGTTAAACTTATGAAGCAATTGCAAAAGGTGACCAATTTCAAAGCCGGGTGTTCTGAGTCACTCCGATTTCTT
 GTTAAAGAAATTACAATCACTTGGCCTTGATATGAAGGTTCTTGCAGTAGCCAATAAGGAAATGAACTTCGAGATCTTGTATGATGAC
 GATGATGTTGTCATGTTGATGCTTTGAGCAAGATGTCGATAAAAAAGATCAACAAAAGCTGAATCCGCTTCTGAAAAAGGGAA
 GTTACTGATCAGCCAACCAACCAACCAATGTAATAATAGTAATGACTAA

***Lb. plantarum* JDM1**

Accession number: CP001617 (Region: 903976 - 907590)

GTGAACAACCTTGGCCGGACATTTAGTAAAATACGGTAAACACCGTACCCGTTAGAAGTTATGCACGTATCAAGGAAGTTCTTGATTTG
 CCTAACTTGATCGAAATCCAGACCGATTCTTACCAATGGTCTTGGATGAAGGTTCTCCGGGAAATGTTTGAAGATATTATGCCGATC
 GACGATTCGACGAGAAACTTCACTTGAATTTGTCGACTATCAATATTAGAACCAAAGTACACCGTCAAGAAGCTCGTGAACAT
 GATGCCAACTACTCGGCACCATTCGACGTTACCTACGTTTAACTAACCATGAAACTGGTGAATTAAGTTCGCAAGACGTATTCTTC
 GGTGATTTTCCATTAATGACTGAACAAGGGACGTTTATTATCAACGGTGGCGAACCGGTCATTGTTTCACAATTGGTTCGTTACCC
 GCGTTTACTTCAATGAGGAATTAGATAAAAAATGGGCGTCTAGCTACGGCACAACGGTTATTCTAACCAGGGTGTGTTGTTAGAA
 CTTGAAACTGACGCCAAGAATGTCTCATACGTACGGATCGATCGTACGGGAAGATTCCATTGACGGAATTAGTCCGGGCCCTTAGGC
 TATGGTTCTGACGATGACGTTATTGACATGTTGGGTGAAACTGACAGTTTGTGATGTTGACGTTGGAAAAGGACGTTTATAAGAACACC
 GACGACTCCCGGGTTGAAGAATCCTTAAAAGATATCTACGAACCGGTCAGTCTTGGTGAACCTAAGACCGCTGACAGTTCCGGGAGC
 CTATTGACTGCTCGGTTCTTCGATCCAAAACGGTATGACTTCGACAGGTTGGTTCGATAAGGTTAAACAAGAGTTAAGCATGAAG
 ACCGCTTAAATGGACCAACCGTTAGCTGAGACATTAGCTGATCCTGATACTGGTGAAGTTATTGCGCAAAAGGATACGGTCAATTGAC
 AAGAATGTCATGGCTAAACTATCCCATACTTGAACGTTGACGACTTAAAGACGGTTACTTACACACCATCTGACGAAGCCGTTGTT
 ACGAATCCAATGGTCTTACAAGTTGTTAAGGTTTATTACAAAACGACCCCTGAAAAGGTTGTGAACGTTGTTAATGGCAACATT
 GATTTGAAGTTCAAGCACATTGTCCCTGCTGATATCATTGCTTCCATTAATTACTTCTTCAACTTGAAGAAGGTTGTTGGCTCAACC
 GATGATATTGATCACTTGGGTAACCGGCGGATTTCGTTCCGTTGGTGAATTTGCAAAAACCAATTCGGGATTGGGTTATCCCGGATG
 GAACGGGTTGTGCGTGAACGGATGTCGATTCAAGATGCTGCGACGGTAACGCCA**CAACAATTGATTAACATTCGCCAGT**GGTTGCT
 TCAATTAAGGAATCTTTGGTTCATCACAATTGTCACAATTCATGGACCAAACCAACCCCTTAGGTGAATTAACGCATAAGCGCGCT

TTATCAGCCTTAGGACCTGGTGGTTGACTCGTGATCGGGCCGGATATGAAGTTCGTGACGTGCACTATAACCCACTACGGTCGGATG
 TGCCCAATCGAAACGCCTGAAGGCCCTAACATTGGTTTTGATCAACAGTTTGTCTTCTTATGCGAAGGTCAACCGTTACGGCTTCATC
 GAAACGCCATACCCGGCGTTCGATTTGGACAACGCATAAGGTTACCAGTAAGACTCGACTACTAGCAGCCGATGAAGAAGACCAATTT
 GTGATTTGCACAAGCCAACTCCATTGAATGATGATGGTTCTTCGTTGAAGACACTGTTTTAGCTCGTAACAAGGAAGAAAACCTTG
 GAAACGCCAATCGAAAATGTCGAT **TACATGGACGTTTCGCCTAA**ACAAGTGGTTGCCGTCGCAACGGCATGTATTCCTTTCTTGGAA
 AACGATGACTCTAACCGTGCTTTGATGGGTGCCAACATGCAACGACAAGCGGTGCCGTTACTTGATCCTCACGCGCCATTAATTGGG
 ACTGGGATTGAATATAAAGCTGCACATGACTCAGGATTGCCCTGATTTGTCGTGATGAAGGAACGGTTGAATACGTTGATGCTCGC
 GAAGTTCGCGTTTCGTCGCGATGATGGTTTCATTAGACACTTACAAGTTAATGAAATTCGGTCTCTAACGGTGGTAAGAACTATAAC
 CAACGGCCAATCGTTAAAGTTGGCGATCACGTTGATAACGATGAAGTCTTAGCCGATGGTCCAGCAATGGAAGTTGGGGAATTAGCC
 CTTGGGCAAAACCCATTAGTTGCTTTTCATGACTTGGAAATGGTTATAACTTCGAAGATGCCATCATTATTAATGAACGTTTAGTCCGT
 GAAGACGCTCACACGTCAATTCATATTGAAGAATATGAATCAGAAGCACGTGACACCAAGCTTGACCTGAAGAAATGACTCGTGAA
 ATTCTAACGTCGGGGAAGATGCATTGAAGAACCTTGACGAAGACGGGATTATCCGGATTGGGGCCGAAGTTAAAGACGGTGACATC
 TTGGTTGGTAAGGTAACGCCATAAGGGGTTACGGAATTGTCAGCTGAAGAACGGCTTCTCCATGCGATCTTTGGTGAAGGCGCGT
 GAAGTTCGGGATACGTCACCTCCGGGTTCTCATGGTGGCGGGTATCATCCAGGACGTTAAGATCTTTACTCGTGAAGACGGTGAT
 GAATTATCTCCTGGCGTTAACATGATGGTTCCGGTCTACATCCGACAAAAGCGGAAGATCCAAGTTGGTGACAGATGGCCGGTCGG
 CATGGTAACAAAGGACGGTTCAATCGTGGTTCTGAAGAAGACATGCCGTACATGCCTGATGGGACACCAATCGATATCATGTTA
 AGCCCAATGGGTGTCCTTCTCGTATGAATATCGGGCAAGTGTCTGAATTCGATTTGGGGATGGTGTCTCGGAAGTTAGGAATTCAC
 ATGGCAACGCTGCTTTGATGGTGTCTCAAGATCAGATATTTGGGAAGCCATTCGTGAAGCTGGGGTTGATTCAGATGCCAAGTCG
 ATCGTCTATGATGGTCCGACTGGTGAACCGTTTCGATAAGCGGGTCCGCTGTTGGGGTTCATGCCTACATGAAGCTTAGTCACATGGTT
 GACGATAAGATCCATGCTCGTTCAATCGGACCTTACTCTTTGGTTACGCAACAACCACTTGGTGGGAAAGCGCAATTTGGGGCCAA
 CGTTTCGGTGAAATGGAAGTTTGGGCCCTTGGAAAGCTTATGGTGCAGCTTATACCTTGCAGGAAATCTTGACTTACAAGTCCGATGAC
 GTTGTGGTTCGGGTTAAGACCTATGAAGCAATCGTTAAGGGCGAACCAATTCAAAAGCCTGGCGTACCGGAATCATTCCGCGTGTG
 GTTAAGGAATTGAAGCACTCGGCTTGACATGAAAGTCTTGGATTCTGAAGACAAAGAAATCGAATTGCGGGACATGGATGATGAT
 GACGATGAAGTTGTCAATGTCGATGCACTCAGCAAGTTTAAACAACAACAAGATGAGAAGGCTGCGGACAAGGCCGCAAAAGCTGAC
 CCCGCTAAGCTTCTGAAACAACCAACGCTCAGCAAGATAATCAATA

Lc. mesenteroides ATCC 8293

Accession number: CP000414 (Region: 1798123-1801731)

GTGGTAGGACATTTAGTAAAATACGGTAAGCACCGTACTCGTCTTATATGCTAGCATCAAAGAAGTACTTGATGTACCGAATTTG
 ATTGAAATTCAAACGGCATCATATCAATGGTTTTTGAACGATGGTATTAAGGAAATGTTTGGCGACATCATGCCAATCGATGATTTT
 CAAGGTACTTTATCTTTGGAATACGTTGATTATCAATTAATGGAACCAAAATATAATATTGACGAAGCACGTGAGCATGATGCAAC
 TATTCGCACCCTACACGTTACATTACGTTTAAACGAACCAGAACTGGTGAATTAAGTGCAGATGTATCTTTGGTGAATTT
 CCAATTAATGACAGACGAAGGAACGTTTCATTATTAATGGAGCAGAGCGTGTATTTGTTTACAGCTTGTTCGTTCCACCCGGTATTTAT
 TATAATCAGACAACGATAAAAACGGACGTCGCGATTTTGGAACGACTGTTATTCCTAACCGTGGCGCATGGTTGGAGTATGAAACT
 GATGCCAAGGGCATTGCTAACGTCGCGATTGATCGCACGCGTAAGTTGCTAATGACTGAATTAGTACGTGCCTTGGATTTGGTTCCG
 GATTCAGACATTAATGATATTTTTCAGATCAATATGATGATGCAATGGAACATGACCCCTTGAAAAAGATGTCATTAAGGATATGTCAGAT
 TCTCGTGTGGAAGAAGCATTGAAGGATGTATACGAACGTTTTCGCTCCAGGTGAACCAAGACTGCTGATTATCACGTCACATATTA
 GTTGCTCGTTTTCTTTGATCCAAAGCGTTATGATTTAGCTTCTGTGGGCCGTTATAAGATTAATAAAAAGCTGTCACCTAAGACACGT
 TTGTTAAACCAACATTAGCAGAAACATTGGCTGACCCTGATTTCTGGTGAATTAATGCTGAAAAGGTACGTTAGTTGATAAGGAA
 GTTATTTCTAAATTAACACCATAATTTGGATCGTGAAGATTTTAAAGACAACAACATATACTCCATCAGGTGATGCTGTTCTTGAAGAA
 CCTGTAACCCCTTCAAAAATCAAAAATCGAATCTCCCGAAAACCCAGAAAAGACATTTGTTGTTGATTGGCAATGGGCACATTTGATGAA
 GATGATCGTACAGTACGTCAGCTGATATCTTGGCAGGTGACTACTTCTGAACTTGCAAGAAGGTGTTGGTCAATGTTGATGAT
 ATTGACCACTTTGGTAAACCGTCTGATTCGTTCTGTTGGTGAATTTGTTGCAAAACCAATTCGTTATGGCTTATGGCTTAAAGCGTATGGAACG
 GTTGTTCGTGAACGATGTCAATTCAGATGCCAACACGTTTACACCA **CAACAGTTAATCAATATACGTCCTGT**TGTAGCCGCTGTC
 AAAGAATTTCTTTGGTTCTTCCAAATTTGTCACAGTTTATGGATCAAACCTAACCATTGGGTGAAATGAACCACAAACGTCGTTTGTCA
 GCTCTTGGACCGGGTGGTTTACTCGTGATCGTGCCGGCGTTGAAGTTCGAGATGTTCACTATACACATTACCGTCTGATTTGATCCG
 ATTGAAACACCAGAAGGTCCTAACATTGGGTTGATTAACCTGTTGGCCACTTATGGTGCATTAACAAATATGGTTTTGTTGAAACA
 CCATACCGTCTGTTGATTGGACAACCTATAAGGTTACAGATAAGATTGATTAATTTGACAGCCGATGAAGAAGATAACTATATTTGTT
 GCTCAAGCTAACCTACCATTAAATGAAGATGGTAGCTTTGTCACCAACACAGTTATGGCTCGTTTTGGTGAAGAAAATGAAACA
 CCAATTGATCGTATTGAC **TACATGGACGTTTCGCCAA**GCAGGTTGTTTTCTGTTGGAACAGCTGCTATTCCGTTCTTGGAAAACGAT
 GATTTCAACCGTGCTTTGATGGGTGCCAACATGCAACGTCAGGACGTACCTTTGCTTGATCCACATTCACCATTAGTAGGAACAGGA
 ATTGAGTATAAAGCAGCTCACGATCTGGTGTTCGATGATTGCACGCGCATCTGGTGAAGTTGAGTATGTGGACGGTCGCCAAATC
 CGAGTTTCGTCGTGAAGATGGTCACTTGGATACCTATGAATGATGAAATTCGTCGTTCAAACGGTGGTAAAAACTATAACCAAAAG
 CCAATTGTACATGTCGGTGAGCATATTGAAGCCGACGAGTTTGGCAGATGGTCTCAATGGAACAAGGTGAATGGCCTTGGGG
 CAAAATCCCTTAATGCTTTTCATGACTTGGCAAGGATAAATTCGAAGATGCCATTGCTTAAATGAACGTTTGGTCCGTGAAGAT
 GTTTATACTTCAATTCACATCGAAGAATACGATTCAGAAGCGCGAGACACAAAACCTTGACCCGGAAGAAATGACTCGTGAATTCCT
 AACACTGGTGAAGATCAGTTAAAGGATTTGGATGCGGACGGTATTATTCGTGTCGGTGCTGAAGTGCACGATGGGGATATCTTAGTT
 GGTAAAGTAACGCCTAAGGGTGTACTGAACTTCTGCTGAAGAACGTTTATTCGATGCCATTTTGGCGAAAAAGCGCGTGAAGTA
 CGTGATACATCATTACGTTCTCATGGCGGCGCGGTGTCGTTCAAAACGTTTCGATTTTATACACCTGAAAATGGTGAATTA
 GCACCAGGTGTCACATGATGGTTTCGTTTATATTGCACAAAAGCGTAAAATTCGAAGTCCGTTGATAAGATGGCTGGTTCGTCATGGA
 AACAAAGGAACTGTTTCTGTTGTTGTGCCAGAAGAAGATATGCCATATATGCCATGATGGAACACCTAATGACATCTATTGTCAACC
 ATGGGTGTCACATCAGTATGAATATTGGGCAAGTACTGAAATGCACTTAGGATTTGCTGCCAAGAAGCTTGGTATTTCATGTTGCT
 TCACCTGCTTTGATGGTGCAGTGATGATGAAATGAAATGGCCTTACGTGAGGCTGGGTTACCACAAGACGGTAAAGTCAGTTGTC
 TATGATGGTCCGACTGGTGAAGCTTTTGAACAAGCGTGTGGTGTGGTGTGATGCATTAATGAAACTAGCGCACATGGTTGACGAT

AAAATTCATGCACGTTCAATTGGTCCTTACTCACTTGTACACAACAGCCTTTGGGTGGTAAAGCCCAGTTTGGTGGACAGCGTTTC
GGTGAAATGGAAGTTTGGGCTTTGGAAGCTTATGGTGCAGCTTACACATTGCAAGAAATCTTGACGTATAAGTCAGATGATGTTGCA
GGCCGTGTTAAAGTGTATGAATCAATTATTAAGGGTGAACCAATTCCTCGTCTGGTGTACCAGAGTCTTCCGTGTTTGGTTAAA
GAATTCGAGGCACCTGGCTGGACATGCAAGTACTAGATGGTGCAGGTGATGAAGTTGAGTTGCGTCAAATGGATGAAGATGATCA
ATTTTGCCTGTTGATGCACCTTGAAAAGCTAGCCCGTACAAATCCTGATCTGTTAAACAAGATGATGAAGAAGTTGCTGCAGCCTTC
CTAAGGTTGAAGAACAAGTCAAAACATTTGAGGAAAAATAA

***O. oeni* PSU-1**

Accession number: CP000411 (Region: 1282812-1286405)

TTGGTTACACATAATGTGAAGATAAATAAGCATGTTACTCGACGCAGTTACTCTTCTGCTAAAGAAGTGCTTGAATCCCACCGTTG
ACCGAAGTCCAGACTGCCTCTTATAAGTGGTTTATGGATAAAGGCATTAAGAAATGTTCAATGATATCATGCCATCGAAGATTTT
GCCGGCAAGCTATCACTTGAATATGTAGATTACTCATTAGGAGAACCTAAATATTCGTTAAAGGAATCACGCGAACAAGCCGTTAAC
TATGCGGCTCCACTGCATGTTACTCTTCTGTTTGACGAATAAAGAACTGGCGAAATTAAGTCTCAGGATGTTATTTTGGCGAATTT
CCATTAATGACCGAATATGGTTCCTTTGTGATTAATGGAGCCGAGCGTGTGTTGTTGATATCGCAGCTTGTTCGTTCTCCGGAAATTTAT
TACAACGAAGATACCGATAAAAACCGGTAGAGTTGTTTATGGAACACTCGGTTATTCCAAACCGTGGTGCTTGGTTGGAATTGGATACC
GATGCCAAAGGCGTTGCTAATATTCGAATTGACCGAACCCTGAACTTCCGATTACGGAATTAATTCGTTCCCTTTGGTTTTGGCTCT
GATTCGGAGATCCAAGATATCTTTGGCGACGAGATAGATTCCTTGAATTTGGCAATTGAAAAAGATGTTCCATAAAGATCCTTCGATG
TCTAGAGTCCGTTGAAGCCTTGGAAAGATATTTACGAGCGTTTGGCTCCCGGTGAACCAAAACGATTGATTCTGCTCGTTCACTATTA
GCGGCTCGTTTCTTTGATCCGAAACGTTATGATCTTGGCAATGTTGGTCCGTACAAGGTCAATAAAAACTTCTCTGAAATCCCCT
TTGTTGGGTGACACTTTAGCTGAAGATATTTGAATTCGACGCGCAAGTTGTTGTTCTTAAGGACACGAAGATTGATAAGAAAAGT
ATGAAACTGATTTCTCCACTACTCGATGAAGAGGATTTTACGTTGAAAATCTGCAACCTGATGAAGAAGGAGTCCGTCGCGGATCCG
ATTAAGTTCCAGACGATTAATAATTCAGTCAGGTTGATCCGACTAAAGTTATTAATTAATCGGAAATGGTCACATTGACGAGTCCG
ATTCATCACATTTCTTCTGCGGATATTATTGCCGGCATGAACATTTCTTCAATCTCCAAGAGGGAGTCCGCGCGACTGACGATATC
GATCATTTAGGCAATCGTTCGAATTCGTTCCGTTGGCGAAGTCTGTTGAAAACCAATTCGATTTGGCCTCACGCGAATGGAACGTT
GTTCCGCGAACGGATGTCGATTCAAGATTCCGACACTGTTACACCGCAACAATTAATTAATATTCGTTCCGGTTGTTGCCGTAGTCAAAA
GAGTCTTTGGTTCTTCACACTTTCTCAATTCATGGATCAACCAATCCGCTTGGCGAATTTGAACATAAGCGTCTGTTGCTCGCC
TTGGGACCTGGTAGACTGACTCGTATCGTGTGTTGTTATGAAGTTTCGTTGATGTTTCAATTTCTCATTACGGCCGATTTGATCAAA
GAACTCCAGAAGGCCCAAACATTTGGTTTGTATTACCTCTTTGGCTGTCTATGGACGATCAACGAATATGGTTTTATTCGAGACGCC
TATCGCCGTGTTGATTGGGATACCCATAAAGTTACCACAAGATTGATTACTTGACTGCCGATGTCGAAGATAAATACACGATTGCT
CAAGTAACTCTCCGTTAAATGACGATGGATCTTTCACAAATCCAACCTGTTACCCTGCTCATGGCGATAACAATATTGAAACGCCA
ATTGAAGATGTCGACTTACATGGATGTTTCTCCAAAACAGGTTGTTGCTGTTTCGACAGCTGCGATTCTTTCTTGAAGATGATGAT
TCCAACCGTGTCTTAATGGGGGCCAACATGCAGCGTCAGGCTGTTCTTTGGTTGCTCCGATTTCTCCGATCGTTGGAACCGGAATT
GAATATCGTGCAGCGGTCGATTCGGATTAGCACAAATGCGCAAGAAAAGGGCACAGTCGAATATGTTGATGGCCGAACAATTA
GTCGCGAAGAAGATGGAACCTCCATGAATATCCATTAATGAAATTCAGCGCTCGAATGGCGGAAAGAATTATAACACGACTCCG
ATTGTTAAAGTTGGTGAAAAGATTGAAAAAGGTGAAGTGTTCGCCGATGGACCAGCAATGGAAAATGGTGAACCTTGCTCTTGACAA
AATCCGGTTATCGCTTTATGACTTGGCATGGATATAACTTCGAAGATGCAATTTGCTTAAACGAACGACTGGTCCGTGACGATGTG
TACACATCTATTATATCGAAGAACACGAGTCTGAAGCACGATGATACAAAACCTTGGACCTGAAGAAATTACTCGTGAATCCCTAAC
GTTGGTGAAGACCAATTAAGGATCTTGTATGATTCCGGGATTAATTCGAATTTGGTGCAGGATTTGAAGATGGAGATATTTTAGTTGGA
AAAATTAATCCAAAGGGTGTAAACGGAATATCAGCCGAAGAACGTTTACTCCATGCTATTTCCGTTGAAAAGGCCCGTGAAGTTCCG
GATACTTCTTTGCGTGTCTTCCACGGTGGTGGCGAAATTTACAGGATGTCGAAATTTTCACTCGAGAAAATGGCGATGAATTTGGCT
CCTGGAGTTAATATGATGGTCCGGTCTTCAATGCTCAAAAACGTAAGATCCAAGTCCGTTGATAAGATGGCTGGCCGCCATGGAAAC
AAAGGAACTGTTTCCGTTGTTGTTCCAGAGAAGATATGCCGTTTATGCCGGATGGCAGACCAATCGATATTTCTCTTTCTCCAATG
GGTGTTCATCCGATGAATATCGGACAGATTTTGGAACTTCATTTGGGCATGGCAGCTAAAAACTTGGTATTAATAATTTGACT
CCTGTTTTCGATGGAGCTTCTGATGATGAAATATCGATGCTTAAAAGAGGCTGGACTTGACGAAGATGGCAAGACAGTTCTTTAT
GATGGACAGACCGGTGAAGCCTTCGATAACCGAATCTCTGTTGGTGTATGCATTTATGAACTGGCTCACATGGTTGACGACAAG
ATTCACGCTCGTTCAATTTGACCATATTTCTTGTACGCAACAGCCTTTGGGTGGTAAAGCCCAATTCGGTGGACAGCGTTTGGT
GAAATGGAAGTTTGGCTCTTGAAGCCTATGGTGTCTTACACTTTGCAGGAAATCTTACCTATAAGTCTGATGATGTTTCCGCGT
CGTAATAAGGCTTTGAATCTATCGTTAAAGGCGAGCAATTCAAAAGCCCGCGTTCCGGAATCTTTCCGTTCTTGTAAAGAA
CTGCAGGCGCTTGGACTTGATATGAAGTCTCAATGGCAAAGGCCAAGAAGTAAAAATGGCTCAAAATGGATGAAGACGATAATGTT
GCGACGGTTGATGATGGAACAGATCGCTAAAGAAAAGCCTGATTTGTTTAAAGGAGACGATGACGATACGCCACGGATTCCAGCA
ACAAAACCTGATGAAGAAAATGTTTAA

***P. pentosaceus* ATCC 25745**

Accession number: CP000422 (Region: 1402290-1405898)

TTGGCAGGACATTTAGTTAAGTATGGTAAACATCGTACGCGCCGAGCTATGCAGGAATTAAGAAGTGCTTGATCTACCTAATTTG
ATCGAGATTTCAATCTGATTCGTACCAATGGTTCTTAGACGAAGGCTCCCGTGAATGTTCAATGACATTATGCCGATTGAAGATTTT
GCAGGTAATTTACTTGAATTCGTCGATTATCAACTACTAGAACCAAGTACACGGTTGACGAAGCTCGTGAACATGAAGCAAAAC
TATCTGCACCATGTCACGTAACCTTACGTTTAAACAAACCGAAGCTGGCGAAATTAATCACAAGACGATATCTTTGGTGATTT
CCATTAATGACAGAACAAGGTAATTTCAATTAATGGAGCAGACGTTGTTTGTTCACAAATTAAGTTCGTTCACTGGTGTCTAT
TACAACCTTAGATACAGATAAAAAATAATCGTAAAAATTTGGGGAACAACCGTTATTCCTAACCGTGGGGCTTGGTTAGAATATGAAACA
GATGCTAAAGAAATTTCTTATGTACGGATTGATCGTACTCGTAAGATTCCAATGACCGAATTAAGTTTCGTTGCCCTTGGATTTGGCTCT
GATGAAGAAATCATCGATATTTTGGTGGTTCTGATAGTTTAGATTTCACTCTTGATAAAGATGTTCCATAAAGATCCCGAAGATTTCA
CGGGTTGCTGAATCATTGAAGGATATTTACGAACGTTTGGCTCCTGGTGAACCTAAGACTGCAGATAGTTCAAGAAGTTTGTCTAACT

GCGCGCTTCTTTGATCCAAAACGTTACGACATGGCTCCAGTAGGTCGTTACAAAAGTAAATAAAAACTTAGCCTTAAGACTCGTCTT
 TTAGGTCAAACCTAGCTGAAACATTAGCTGATCCTGATACAGGGGAAGTTATTGCTCAAAGGGTGAAATGGTCAACAAAGACGTA
 ATGAAGAAATTAGCAGTTTTCCCTGATCGTCTGACTTCAAGATGGTTACATACCAACCATCTGAAGAAGCAGTCGTTACTGAACCA
 ATGACTATCCAAGTTATCAAAGTCAAGACCCTAACGCCAGAACGTACATTGAATATGATTGGTAATGGTAAATATCGATGCTAAA
 TTGAAGCACATCACACCTGCTGATATTATTGCTTCAATGAATTACTTCTTCCCTTCAAGATGGAATTGGTAGTACAGATGATATT
 GATCATTGGGTAACCGTTCGAATCCGTTTCAGTTGGTGAACACTTCAAACCAATTCCGCATTGGTTATCACGATGGAACGCTGTA
 GTACGTGAACGTATGTCAATCCAAGATGCTGAAACAGTTACACCA**CAACAATTGATTAACATTCTGTCAGT**AGTTGCTGCAACTAAA
 GAATTCCTTTGGTCTTCAACAATTGTCACAATTGATGATCAAACCTAACCCGCTTGGTGAATTAACACATAAGCGTCTATCAGCA
 CTTGGACCTGGTGGTTGACTCGTGATCGTGCCGGATATGAAGTTCGAGACGTTCACTATACGCATTATGGTCTGATGTGTCCGATT
 GAAACTCCCGAAGGTCCTAATATCGGTTTGTATTAATACTTGGCTTCATATGGTAAGATCAACCGTTATGGTTTTATCGAAACACCA
 TATCGTCGTGTTTCATGGGAAGATCATAAAGTTACCGATCGTATTGATTACTTAACGCTGACGAAGAAGATCAATTTGTTATTGCT
 CAGGCTAACTCTCCACTTAATGATGATGGTTCATTTGCTGACGACGTAGTTATGGCTCGTCAATGAAAGTGATAACATCGAAACTAGC
 ATTGAAAATGTCGAT**TACATGGACGTTTCTCCTAA**GCAAGTAGTTGCTGTTGCTACAGCATGTATTCTTTCTTGGAAAATGATGAT
 TCTAACCGTGCCTTGTATGGGTGCTAATATGCAACGTCAGGCTGTTCCATTGGTTGATCCACATTCTCCATTAATTGGTACTGGTATT
 GAATATAAAGCTGCGCATGATTCGGGGTTGCTTTTTATGTCAACACGCTGGTGTAGTTGAATATGTTGATGCACGTGAAGTACGT
 GTCCGTGCTGATGATGGCGCACTTGATACTTACAAGCTCATGAAGTTCGCCCGTTCAAATGGTGGTAAGAACTACAACCAACGCCCA
 ATTGTTTCGATTAATGATAAAGTTGACGCGGATGAAGTACTAGCTGATGGTCCATCAATGGAACAAGGTGAATAGCCCTTGGACAA
 AACCCATTGATCCGCTTCATGACATGGCAAGTTATAACTTCGAAGTATGCGATTAAATGAACGTTTACTTTCGTTGATGACGTA
 TATACATCAATTTCATATCGAAGAATATGAATCAGAAGCACGTGATACAAAACCTGGACCTGAAGAAAATGACTCGTGAAATTCCTAAT
 ATTGGTGAAGATGCCCTTCGCAATCTTGATCAAGATGGTATTGTTTCGAGTTGGTGTGAAGTTGAAGATGGTGACATCTTGGTTGGT
 AAGTTACTCCTAAGGGGGTACAGAATTATCTGCTGAAGAAGCTTGTCTCATGCTATTTTCGGTGAAAAGCTCGTGAAGTTTCGT
 GATACATCACTCCGTGTTCCACATGGTGGCGGCGGAATCGTTCAAGACGTTAAGATTTTCACTCGTGAAAATGGTGACGAATTATCA
 CCTGGTGAACAATGATGGTTCGTGTTTATATCGCTCAAAGCGTAAACTCCAAGTTGGTGATAAGATGGCCGGACGTCATGGTAAAC
 AAAGTACTGTTTTCAGTGGTTATCCCAAGAAGATATGCTTACATGCTGATGGAATCCCAATTGACATTAATGCTTAGCCCAATG
 GGTGTCCTTCTCGTATGAATATCGGACAAGTTCTGAACCTTATTTGGGAATGGCTGCACGTAACCTAGGTTCCACATGACAACCT
 CCTGTTTTGATGGAGCCCAAGATAAAGATATTTGGGAAGCAGTTGCTGAAGCTGGTATGGATTCTGATGCTAAGTCTGTGCTTTAT
 GATGGACGTACTGGTGAACCATTGAACAACGTTGGCTGTTGGTGTGATGCACATATGAAACTGCTCACATGGTTGATGATAAG
 ATTCATGCTCGTTCAATTGGACCTTACTACTTGTACACAACAACCACTTGGTGGTAAAGCACAATTTGGTGGACAGCGTTTTGGT
 GAAATGGAAGTTTGGGCTCTTGAAGCTTACGGTGTGCTGCATATACTCTTCAAAGAAATCCTTACTTACAAGTCTGATGACGTCGTTGGT
 CGAGTTAAGACATAACGAAGCGATCGTTAAGGGTGAACCAATTCACGCCAGGTTCCAGAAATCATTCCGAGTTCTTGTGTTAAAGAA
 TTAAGCTTTTAGACTTATGATGAAGGTTCTAGGTGGGATGACCAAGAAGTTGAACCTCGTATGATGACGGAAGAAGATGACGAT
 GTTGTGAATGTCGATGCTCTTAGCAAGTATGCTGAAAAGCAAATGAAAAACAATGCTAGCGCTGAAGAAGCAAAGGCTCCATCA
 ACGGAATCAGCTCCTGTTGAAACTAAAAACAATCAAACCTAA

W. paramesenteroides NCDO 803

Accession number: Y16471

CCATTAATGACACCAACAGGTACCTTTATTATTAATGGTGTGAGCGTGTTATTGTTTCACAATTAGTACGTTCTCCTGGTGTGTAC
 TACAATGAAGAATTAGACAAGAACGGACGCCCAAATTACGGTACAACATTCATTCOAAGTCGTTGGTGCTTGGTTGGAATTTGAGACA
 GATGCTAAGGGTCTNAGCTATGTTTCGTATTGACCGTACGCGTAAGTTGCCAATCACAGAGTTGGTACGTGCATTGGGTTATGGTTCA
 GACTCAGAAATCTACAAATGTTAGGTGATCAATATGATTTCTATCTCATTAACCTCTGGACAAAAGATGTGCACAAAAGACATCGAACAT
 TCACGAGTTGAAGAAGCTTGAAGACATCTACGAAGTTTACGTTCCGGGAGAGCCTAAGACAGCTGATTCAGACGCTGCCTTGTTA
 ACTGCACGTTTTCTTACCACAAAGCGTTATGATTAGCACCAGTTGGTTCGTTACAAGATCAATAAGAAGTTGCTATTGAAGTACACGC
 TTGATGGGCTTGACTTTGGGTGAAACTTTGGCTGACCCATATACTGGTGAATTTATGCGAAAAGGGTACATTGATTGACAAGAAG
 GTTATGTCAGCATTGTACCTTACTTGGATCGTGAAGATTTCAAGCGGACAACGTTACACCTTCTGACGATGCGGTTGTTACGGAA
 CCAATGGTTTTGCAACAATTTTGGTTGAGAATCCAGAGGATCCAGAAAAGACATTACCAATCATTGGTAACCGTCAATTTGATCCA
 GCTATTTCGTACAGTTAAGCCAGCCGATATCATCGCTGGTATGAACTACTTCTTGAATTTGCCATTAGGCGTTGGTACGACTGATGAT
 ATTGACCATTGGGTAATCGTCGTATTTCGTCGTGTTGGTGAATGTCTACAAAACACATTCGCTATTGGTTTGGCCGTATGGAACGTT
 GTGGTTCGTGAACGTATGTCAATTCAAGACCCAGACACTGTTACACCA**CAACAATTGATTAATATTCTGTCAGT**TGTTGCTGCTGTT
 AAAGAGTTCTTCCGTTTCATCACAATTGTCACAATTCATGATGATGATAAACAATCCATTGGGTGAATTAACGAATAAGCGTCTGTTGCA
 GCCTTGGGACCTGGTGGTTTACTCGTGACCGTGCCGGATATGAAGTTCGAGACGTTCACTATACACACTATGGTCTGATGGACCCA
 ATTGAAACACCCGAAGGTCCTAACATTGGATTGATCAACTCATAGCTACGTATGGACGTGTTAATAAGTACGTTTTCATTGAGACA
 CCAATATCGTCTGTTGATTGGACAACCTACAAGGTTACTGACCGAATTGACTACTTAACAGCCGATGAAGAAGATAATTTCTGTTGGT
 GCCCAAGGAAATTCGTCTAAATGAAGATGGTTTCATTTGCTACTGATACTGTTTTGGCTCGTAAAGATGATGAAAACGTTGAAGTG
 CCAATTGATCAAGTCGAT**TACATGGATGTTTCTCCTAA**GCAAACTGAGCGGTCGCTACTGCTGCCATTCCTTTCTTGGRAAATGAC
 GACTCAAACCCGCTGCTGATGGGTGCCAACATGGCAGCTCAAGCAGTTCTTCTTATTGATCCACATGACCCATTGCTGGTACTGGT
 ATTGAATATAAGGCTGCTCACGATGCTGGTGTGCGATTATTTCAACAATATCCTGGTGTGTTGAGTACGTTGACGTTGCGGAAATC
 CGCGTTCCCGTGAAGATGGTTCATTAGATAAGTATGCTTTGATGAAGTTCGCTCGTTCAAATGCTGGTAAGAACTATAACCAACGTT
 CCAATTGTTAAGGTTGGTGACAAGGTTGATGCTGATGAAGTATGGCCGATGGTCCATCAATGGAACAAGGTGAATGGCATTGGGT
 CAAAACCCATTGATTGCTTTCATGACTTGGCAAGGATATAACTTCGAGGACGCTATCATTATTAATGAGCGTTTGTATTGCTGATGAT
 GTTTATACATCAATCCCAATTGAGGAATACGAGTCAGAAGCGCGTGATACAAAGCTTGGCCCTGAAGAATTTACACGTGAAATTTCCA
 AACACTGGTGAAGTACAGTTGAAGAAGTGGATGAGCGCGGAATTTCCGATCGGTGCTGAAGTTGAAGACGTTGATATTTGGTT
 GGTAAGGTAACGCCCTAAGGGTGTGACTGAACATACAGTGAAGGCTTTGCTACATGCTATCTTTGGTGAAGGCTCGTGAAGTA
 CGTGATACTTCAATGAAGGTTCTCACGGTGGTGGTGGATTGTTCCAAGATGTTTCGATCTTCACTCGTGAAAATGGGGATGAATTTG
 TCACCAGGTGTTAACATGATGGTTCGTGCTACATTGCCAACGTCGTAAGATTCAAGTTGGTGATAAGATGKCCGGGCGTCAATGGT

AACAAGGGAACGGTATCAGTTATTGTACCTTCTGAAGATATGCCATTTATGCCAGATGGTACGCCAATTGATATTATGTTGTCACCA
 ATGGGTGTGCCCTTACGTATGAATATTGGTCAAGTACTTGAGTTGCACCTTAGGTATGGCTGCCCGTGAACCTAGGTATTCACGTTGCA
 TCACCTGTCTTTGATGGGGCTCGTGACACGGATATTTGGGATGCCATTCAAGAAGCTGGTTTCCAGCCGATGGAAAGTCAATTTCTT
 TATGATGGTCTGACTGGTGGGCATTTCGATAAGCGTGTATCTGTTGGTATCATGCATTATATGAAACTAGCTCACATGGTAGACGAT
 AAAAT

8.1.6 Nukleotid-Sequenzen reamplifizierter Banden der Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese

Die Banden wurden aus dem DGGE-Gel ausgeschnitten (Abb. B8), eluiert und reamplifiziert. Die Ansequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte mit dem Primer rpoB-F.

Bande 1a (Bemerkung: Chromatogramm wies starkes Hintergrundrauschen auf)

GATCGTGCTGGATATGAAGTTCGTGATGTGCATTACGCTCATTATGGCCGGATGTGTCCAATTGAAACTCCTGAAGGACCAAACATT
 GGATTGATCACGACTTTGGCTAGCTACGGAAGGATCAACAAGTATGGTTTTATGAAACCCCTTATCGTCTGTTTTATGGACGACC
 CATGCGGTTACGATTAATATTGATTCTTTGACTGCTGATGAAGAAGAGAATCTTTTATTGCTCAGGCTAACCTACCATTAATGAC
 GATGGTTCAATTGTGGATCAAATGGTTACGGCTCGTCATGAAATTAATAATATAGAATCATCATTGAAATGTGCGATTA

Sequenzvergleich der Banden 1b und 8

Bande 1b CAAACCAATCCGCTTGGCGAATTGAACCATAAGCGTCGTTTGTCTGCCTTGGGACCTGGTGGACTGACTCGTG
 Bande 8 -----

Bande 1b ATCGTGCTGGTTATGAAGTTCGTGATGTTTCATTATTCTCATTACGGCCGTATTGATCCAATTGAAACTCCAG
 Bande 8 -----ATGAAGTTCGTGATGTTTCATTATTCTCATAACGGCCGTATTGATCCAATTGAAACTCCAG
 *****.*****

Bande 1b AAGGCCCAAACATTGGTTTATTACCTCTTTGGCTGTCTATGGACGGATCAACGAATATGGTTTTATCGAGAC
 Bande 8 AAGGCCCGAACATTGGTTAGATTACCTCTTTGGCTGTCTATGGACGGATCAACCAATATGGTTTTATCGAGAC
 *****.*****.*****

Bande 1b GCCTTATCGCCGTGTTGATTGGGATACCCATAAAGTTACCGACAAGATTGATTACTTGACTGCCGATGTCGAA
 Bande 8 GCCTTATCGCCGTGTTGATTGGGATACCCATAAAGTTACCGACAAGATTGATTACTTGACTGCCGATGTCGAA

Bande 1b GATAATTACACGATTGCTCAAGCTAACTCTCCGTTAAATGACGATGGATCTTTACAAATCCAACCTGTTACCG
 Bande 8 GATAATTCCTCAATTGCTCAAGCTAACTCTCCGTTAAATGACCATGGATCTTTACAAATCCAACCTGTTACCG
 *****.*.*.*****

Bande 1b CTCGTCATGGCGATAACAATATTGAAACGCCAATTGAAGATGTGCGACTACATGG
 Bande 8 CTCGTCATGGCGATAACAATATTGAAACCCCATTTGAAGATGTGCGACTACATGG
 *****.*.*****

8.2 SAPD-PCR-Bandenmuster

Tab. 8.1: Sequenzlängen der SAPD-PCR Fragmente verschiedener *Saccharomyces*-Arten (Abb. 3.1)

Art	Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers A-Not in bp, gerundet auf 10 bp														
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	2760	1880	1570	1400	1290	1200	1000	670	590	470	410				
	93	3050	2760	1880	1400	1290	1200	1000	670	590	470	410				
	462	3050	2760	1880	1400	1290	1200	1000	670	590	470	410				
<i>S. bayanus</i>	CBS 7001	2630	2300	1960	1730	1570	1400	1100	1020	890	730	610	550	310		
	CBS 395	2630	2300	1960	1730	1570	1400	1100	890	730	610	550	310	210		
	DSM 70412 ^T	2630	2300	1960	1730	1570	1400	1100	1020	890	730	610	550	310		
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	2300	1880	1660	1400	1200	890	730	670	590	470	410				
	NCYC 529	2300	1880	1660	1400	1290	1200	890	730	670	590	470	410			
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	2950	2470	1960	1620	1400	1200	1070	890	800	690	610	570	520	410	340
	28	2950	2470	1960	1620	1400	1200	1070	890	800	690	610	570	520	410	340
	35	2950	2470	1960	1620	1400	1200	1070	890	800	690	610	570	520	410	340
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	1960	1130	1040	890	810	670	570	510	210						
	NCYC 2821	1960	1130	1040	890	810	670	570	510	210						
<i>S. mikatae</i>	NCYC 2970	2300	1960	1460	1290	1110	910	670	570	410	340	270				
	CBS 8839 ^T	2300	1960	1460	1290	1110	910	670	570	410	340	270				
<i>S. kudraivzevii</i>	CBS 8840 ^T	3200	2030	1810	1620	1450	1100	890	800	730	610	310	160			
	NCYC 2969	3500	3050	2030	1810	1620	1450	1330	970	890	730	620	510	480	310	270
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	2030	1570	1400	1170	1110	1040	890	800	770	730	550	420	370	340	300
		210														
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	3050	2760	2300	1400	1060	1000	890	590	430						
Hybride	CBS 8614	2630	2300	1960	1880	1730	1570	1450	1400	1290	1200	1100	800	670	610	590
		470	410	210												
	NCYC 3518	3050	2760	1880	1620	1570	1450	1290	1200	950	890	800	730	670	610	590
		470	410	210												
Art	Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers C-Not in bp, gerundet auf 10 bp														
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	2470	2130	2080	1860	1780	1440	1330	1220	1100	710	470				
	93	2470	2380	2130	2080	1860	1780	1440	1220	1100	710	470	190			
	462	2470	2380	2130	2080	1860	1780	1440	1220	1100	710	470				
<i>S. bayanus</i>	CBS 7001	3350	2470	2240	2130	1980	1780	1640	1400	1220	940	850	790	680	580	430
		290	190													
	CBS 395	3350	2470	2240	2130	1780	1640	1400	1220	940	850	790	680	580	430	290
	DSM 70412 ^T	3350	2470	2130	1980	1640	1440	1330	1220	940	850	790	680	580	430	
		190														

Fortsetzung Tab. 8.1: Sequenzlängen der SAPD-PCR Fragmente verschiedener *Saccharomyces*-Arten (Abb. 3.1)

Art	Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers C-Not in bp, gerundet auf 10 bp														
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	3780	3450	2470	2130	1860	1780	1640	1440	1150	940	870	710	560	450	270
	NCYC 529	190	3450	2470	2380	2130	2080	1860	1780	1440	1150	940	870	710	560	450
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	2380	2130	2080	1670	1330	1240	1130	1020	940	850	760	670	470	400	
	28	2380	2130	2080	1670	1330	1240	1130	1020	940	850	760	670	470	400	
	35	2380	2130	2080	1670	1330	1240	1130	1020	940	850	760	670	470	400	
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	2470	2130	2080	1860	1100	1020	850	790	670	470	400				
	NCYC 2821	2470	2130	2080	1860	1100	1020	850	790	670	470	400				
<i>S. mikatae</i>	NCYC 2970	5140	3780	2470	2130	1860	1640	1330	1070	1000	910	710	640	430	150	
	CBS 8839 ^T	5140	3780	2470	2130	2080	1860	1640	1330	1070	1000	910	710	640	430	330
<i>S. kudraivzevii</i>	CBS 8840 ^T	2740	2130	1750	1440	1220	1020	960	710	600	520	430				
	NCYC 2969	2740	2240	1860	1440	1220	1100	1050	960	910	790	710	580	520	450	220
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	3000	2610	2130	2080	1730	1550	1440	1220	1070	1000	850	680	520	450	430
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	3450	2530	1980	1620	1440	1130	1020	940	850	710	520	450	360	270	190
Hybride	CBS 8614	2130	1440	1220	1020	940	850	790	710	520	290					
	NCYC 3518	2470	2380	2130	2080	1860	1780	1440	1330	1220	1100	1020	960	910	710	520
		430														
Art	Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers T-Not in bp, gerundet auf 10 bp														
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	4370	3270	2740	2500	1370	1120	980	910	750	540	410				
	93	4370	3270	2740	2500	1370	1120	980	910	750						
	462	4370	3270	2740	2500	1370	1120	1080	980	910	750	610	540			
<i>S. bayanus</i>	CBS 7001	3610	3000	2370	2030	1860	1660	1320	1120	950	910	880	670	410		
	CBS 395	3610	3000	2370	2030	1860	1660	1320	1120	950	910	880	670	410		
	DSM 70412 ^T	3890	3610	3000	2370	2030	1860	1660	1320	1120	950	910	880	670	610	490
		410														
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	3890	2030	1770	1370	1160	1120	950	880	750	610	490	410			
	NCYC 529	3890	2030	1770	1370	1160	1120	980	950	880	750	610	490	410		
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	2740	2030	1610	1460	1120	840	760	670	600	540					
	28	2740	2030	1610	1460	1120	840	760	670	600	540					
	35	2740	2030	1610	1460	1120	840	800	670	600	540					
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	2500	2060	1930	1460	1080	980	840	810	760	700	670	600	410		
	NCYC 2821	2500	2060	1930	1460	1080	980	840	810	760	700	670	600	410		
<i>S. mikatae</i>	NCYC 2970	3890	2400	2150	1980	1520	1370	1010	900	840	610	420	340			
	CBS 8839 ^T	3890	2400	2150	1980	1520	1370	1010	900	840	610	420	340			

Fortsetzung Tab. 8.1: Sequenzlängen der SAPD-PCR Fragmente verschiedener *Saccharomyces*-Arten (Abb. 3.1)

Art	Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers T-Not in bp, gerundet auf 10 bp														
<i>S. kudraivzevii</i>	CBS 8840 ^T	3380	2700	2060	1930	1770	1570	1460	1120	1010	960	840	760	680	490	340
	NCYC 2969	3380	2060	1770	1660	1590	1460	930	880	760	680	490	340	270		
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	2500	2370	1980	1660	1460	1160	1090	1010	930	780	670	600	420	300	
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	3890	2030	1170	1370	1030	920	880	610	460	340					
Hybride	CBS 8614	3610	2060	2030	1860	1590	1370	1320	1120	980	950	910	880	490	410	
	NCYC 3518	4370	3380	3270	2700	2500	2370	2060	1770	1570	1460	1370	1120	980	910	840
		760	750	610	490	340										

Tab. 8.2: Sequenzlängen der nSAPD-PCR Fragmente verschiedener *O. oeni*-Stämme (Abb. 3.16)

Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers C-Not-C in bp, gerundet auf 10 bp												
B5	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380	240			
B64	1740	1420	1240	1040	920	840	700	570	440	380			
B70	1420	1240	1040	900	840	460	380						
B139 ^T	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380	240			
B232	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
B235	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
B241	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
B243	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
B244	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
B325	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
B367	1420	1240	1040	900	840	700	570	440	380				
Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers C-Not-T in bp, gerundet auf 10 bp												
B5	1540	1240	1040	980	910	680	580	490	420	350	290		
B64	1540	1370	1240	1040	980	910	850	680	620	520	420	380	350
B70	1320	1240	1040	980	850	680	520	420	350	290			
B139 ^T	1540	1240	1040	980	730	680	620	580	490	420	380	350	260
B232	1540	1370	1240	1040	980	680	580	490	420	350	290		
B235	1540	1370	1240	1040	980	680	580	490	420	350	290		
B241	1540	1370	1240	1040	980	680	580	490	420	350	290		
B243	1540	1370	1240	1040	980	680	580	490	420	350	290		
B244	1540	1370	1240	1040	980	680	580	490	420	350	290		
B325	1540	1370	1240	1040	980	850	730	680	580	490	420	380	350
B367	1540	1370	1240	1040	980	680	620	520	490	420	350	290	

Fortsetzung Tab. 8.2: Sequenzlängen der nested SAPD-PCR Fragmente verschiedener *O. oeni*-Stämme (Abb. 3.16)

Stamm	Amplifikationsprodukte unter Verwendung des Primers C-Not-A in bp, gerundet auf 10 bp																	
B5	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1220	1120	1010	940	890	860	750	680	610	530	480	440
	410																	
B64	3260	2360	1840	1580	1520	1400	1270	1160	1040	890	750	680	610	530	440	410	370	
B70	3410	3260	2560	2190	1840	1580	1520	1290	840	750	680	430	410					
B139 ^T	3260	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1010	940	890	750	680	610	530	440	410	
B232	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1010	940	890	750	680	610	530	480	440
	410																	
B235	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1010	940	890	860	750	680	610	530	480
	440	410																
B241	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1010	940	890	860	750	680	610	530	440
	410																	
B243	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1010	940	890	860	750	680	610	530	440
	410																	
B244	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1010	940	890	860	750	680	610	530	440	410
B325	3610	3260	2560	2360	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1040	940	890	750	680	610	530
	440	410																
B367	3260	2190	1840	1580	1520	1400	1270	1220	1120	1010	890	860	750	680	610	530	480	440
	410																	

8.3 Datenmatrizen zur Cluster-Analyse

Tab. 8.3: Datenmatrix zur Cluster-Analyse von Arten der Gattung *Saccharomyces* (Abb. 3.1)

Stamm	1/0-Matrizen abgeleitet anhand der Amplifikation mit dem Primer	
	A-Not	C-Not
DSM 70449 ^T	000010000010000100101100000000100000000010010000010010000000	000000001001101100000010101001
93	001010000010000000101100000000100000000010010000010010000000	000000001101101100000010001001
462	001010000010000000101100000000100000000010010000010010000000	000000001101101100000010001001
CBS 7001	000001010100100100100000010001000010001000100100000000010000	000100001011010100010001001000
CBS 395	000001010100100100100000010000000010001000100100000000010010	000100001011000100010001001000
DSM 70412 ^T	000001010100100100100000010001000010001000100100000000010000	000100001001010000010010101000
DSM 6580 ^T	000000010010010000101100000000000010001010010000010010000000	011000001001001100010010000100
NCYC 529	000000010010010000101100000000000010001010010000010010000000	001000001101101100000010000100
CBS 432 ^T	000100100100001000100100001000000010100100101010000010100000	000000000101100000100000110010
28	000100100100001000100100001000000010100100101010000010100000	000000000101100000100000110010
35	000100100100001000100100001000000010100100101010000010100000	000000000101100000100000110010
CBS 8841 ^T	000000000100000000000001000010000011000010001001000000000010	010000001001101000000000000001
NCYC 2821	00000000010000000000000001000010000011000010001001000000000010	000000001001101000000000000001
NCYC 2970	000000010100000010001000100000000100000010001000000010100100	110000001001001000010000100000
CBS 8839 ^T	000000010100000010001000100000000100000010001000000010100100	110000001001101000010000100000
CBS 8840 ^T	010000001001001001000000010000000010101000100000000000010001	100001000001000010000010001000
NCYC 2969	101000001001001001000000000010010001001000001100000010100	000001000010001000000010001001
CBS 10644 ^T	000000001000000100100010100010000010111000000100000101101010	0000101000011000010001100001000
CBS 12357 ^T	0010100100000000010000000010001000000001000000100000000000	0010000100000100000001010000010
CBS 8614	000001010110100101101100010000000000100010110000010010000010	00000000000100000000010001000
NCYC 3518	001010000010001101001100000000001010101010110000010010000010	000000001101101100000010101001

Stamm	1/0-Matrizen abgeleitet anhand der Amplifikation mit dem Primer	
	C-Not	T-Not
DSM 70449 ^T	0000000000100000001000000000	10001010100000000000000010010000100001000000010000010001000
93	0000000000100000001000000000	1000101010000000000000001001000010000100000001000000000000
462	0000000000100000001000000000	1000101010000000000000001001010010000100000001000101000000
CBS 7001	00000100110010001000010001001000	10001000001001001000000101000000100101000000010000001000
CBS 395	00000100110010001000010001000000	10001000001001001000000101000000100101000000010000001000
DSM 70412 ^T	00000100110010001000010001001000	10001000001001001000000101000000100101000000010000000011001001000
DSM 6580 ^T	00000101000100000100100000010100	10000000000010001000000101100000010000100000100010001001000
NCYC 529	00000101000100000100100000010100	10000000000010001000000101100000101000010000010001001001000
CBS 432 ^T	0010010010100100000100100000000000	1000001000001000001000100010000000000001000100010110000000
28	0010010010100100000100100000000000	1000001000001000001000100010000000000001000100010110000000
35	0010010010100100000100100000000000	1000001000001000001000100010000000000001010000010110000000
CBS 8841 ^T	00100000011000100000100100000000	100010010000000100000100100000001100101010100001000
NCYC 2821	00100000011000100000100100000000	100010010000000100000100100000001100101010100001000
NCYC 2970	100100100001001000000100000000	101000000010100100000001110000001000000101000000001000010100
CBS 8839 ^T	100100100001001000000100100000	101000000010100100000001110000001000000101000000001000010100
CBS 8840 ^T	001010000001000100100000000000	100010001000010010100010000010001010000001000100100001000100
NCYC 2969	01001010010100000101000000100000	10100000000000000000001000010100000000000000010001000010001000101
CBS 10644 ^T	10010000100010000001011001000000	1000000000101000100010000000101001000100000001000000010000010010010
CBS 12357 ^T	0010010010010000001010010010100	1000000000001000100000110000010000010010000000001000100100
CBS 8614	001001001101000000100000010000	1001000100111010000101001010000000000001001000
NCYC 3518	001010100001000000100100000000	10011001101010000100010010010000100001001000110001001000100

Tab. 8.4: Datenmatrix zur Cluster-Analyse verschiedener *O. oeni*-Stämme (Abb. 3.16)

Stamm	1/0-Matrizen abgeleitet anhand der Amplifikation mit dem Primer		
	C-Not-C	C-Not-T	C-Not-A
B5	0111011110111	1001111001010110110	00100111110010101111011111010
B64	1111101110110	1101111101101011100	001010111101010100100111101011
B70	0111011001010	0011110101001010110	011101111010000000001110000110
B139 ^T	0111011110111	1001110011110111101	001000111101101011100111101010
B232	0111011110110	1101110001010110110	001001111101101011100111111010
B235	0111011110110	1101110001010110110	001001111101101011110111111010
B241	0111011110110	1101110001010110110	001001111101101011110111101010
B243	0111011110110	1101110001010110110	001001111101101011110111101010
B244	0111011110110	1101110001010110110	001001111101100011110111101010
B325	0111011110110	1101110111010111100	101110111101101101100111101010
B367	0111011110110	1101110001101110110	001001111101101010110111111010

8.4 Restriktionsverdau verschiedener Genregionen von Arten der Gattung *Saccharomyces*

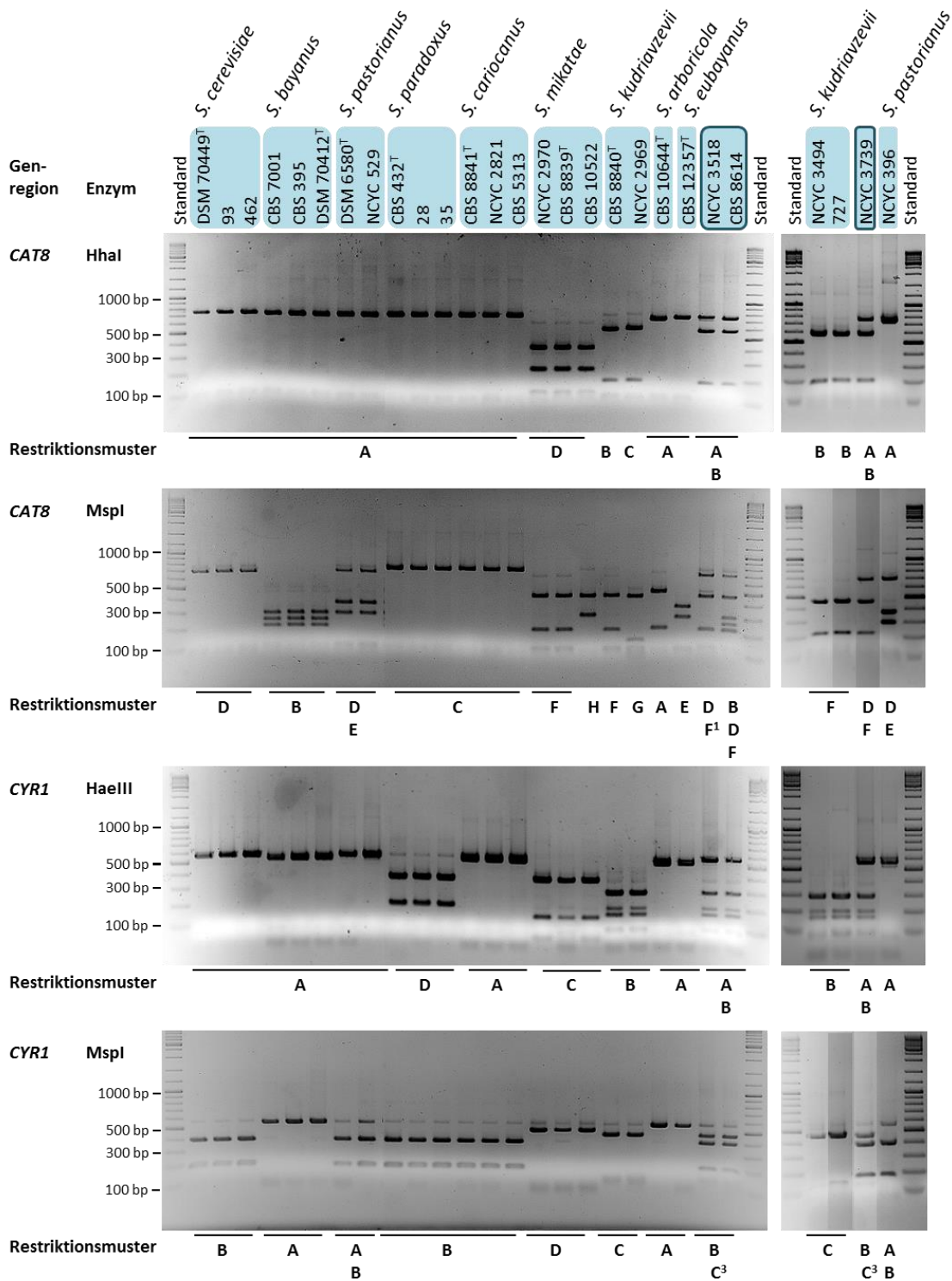


Abb. 8.1A: Restriktionsmuster von Teilbereichen der Gene *CAT8* und *CYR1* (vergl. Tab. 2.6), nach Verdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen, verschiedener *Saccharomyces*-Stämme. Hybride sind durch ein Kästchen gekennzeichnet. ^T: Typstamm; Standard: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo). ¹⁻⁷: vergl. Tab. 3.2.

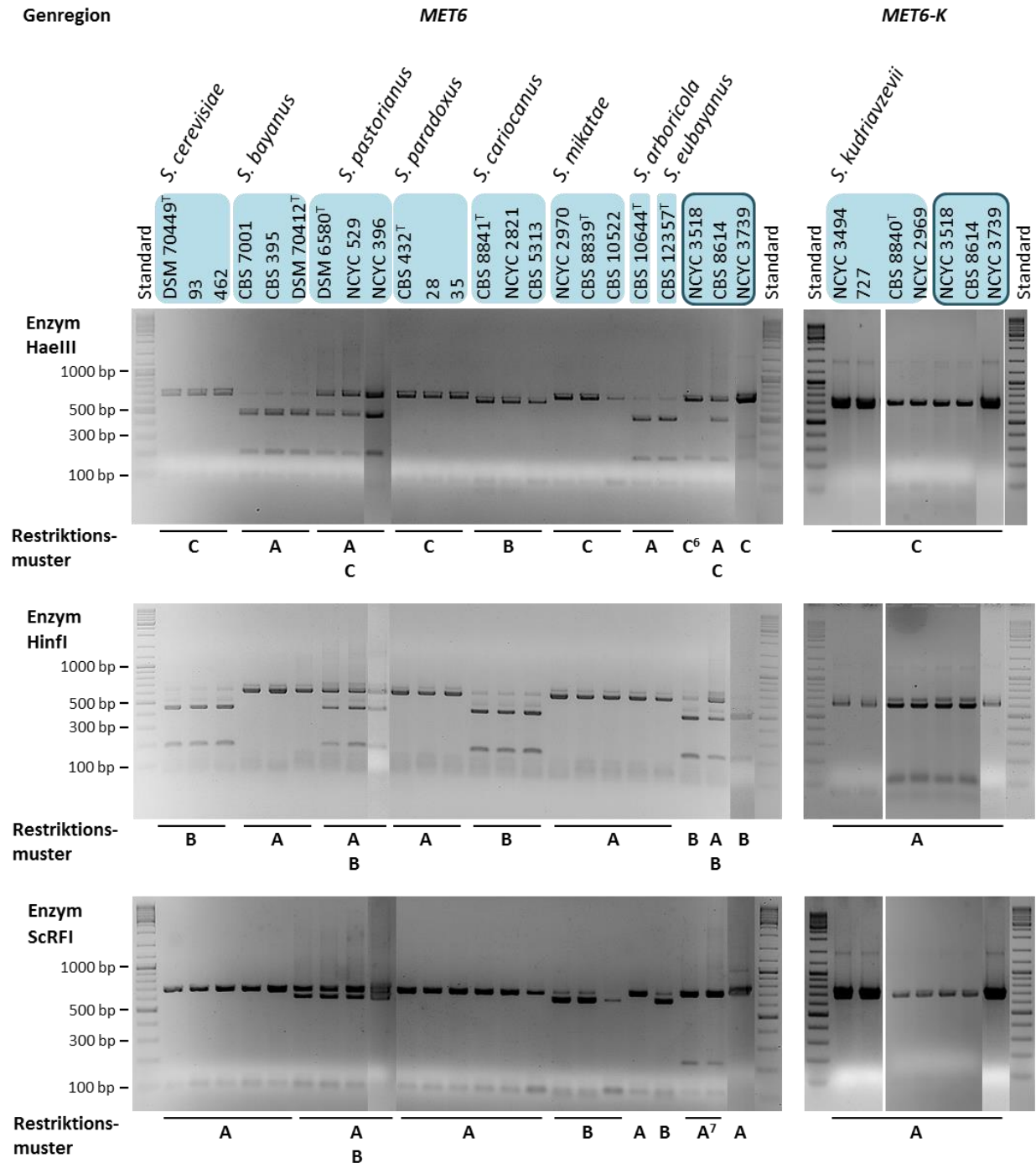


Abb. 8.1C: Restriktionsmuster eines Teilbereichs des Gens *MET6* (vergl. Tab. 2.6), nach Verdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen, verschiedener *Saccharomyces*-Stämme. Hybride sind durch ein Kästchen gekennzeichnet. *MET6-K*: *S. kudriavzevii*-spezifisches Allel; ^T: Typstamm; Standard: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo). ¹⁻⁷: vergl. Tab. 3.2.

Tab. 8.5: Restriktionsmuster verschiedener Genregionen von Stämmen der Gattung *Saccharomyces* (Abb. 8.1A-C)

		Restriktionsmuster nach Verdau der angegebenen Genregionen ^a mit den entsprechenden Enzymen, Fragmentgröße in bp ^b				
		CAT8		CYR1		GSY1
Art	Stamm	HhaI	MspI	HaeIII	MspI	MspI
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	750	240 530	570	570	350 400
<i>S. bayanus</i>	DSM 70412 ^T	750	240 280 320	570	570	350 400
	CBS 395	750	240 280 320	570	570	350 400
	CBS 7001	750	240 280 320	570	570	350 400
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	750	750	570	200 400	200 300 350 (450) (600)
	NCYC 2821	750	750	570	200 400	200 300 350 (450) (600)
	CBS 5313	750	750	570	200 400	200 300 350 (450) (600)
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	750	690	570	200 400	200 600
	93	750	690	570	200 400	200 600
	462	750	690	570	200 400	200 600
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	750	320 390	570	570	350 400
<i>S. kudriavzevii</i>	CBS 8840 ^T	200 590	240 490	100 170 200 290	(150) 460 (570)	200 300 350 (450) (500)
	NCYC 2969	200 610	180 490	100 170 200 290	(150) 460 (570)	200 300 350 (450) (500)
	NCYC 3494	200 590	240 490	100 170 200 290	(150) 460 (570)	200 300 350 (450) (500)
	727	200 590	240 490	100 170 200 290	(150) 460 (570)	200 300 350 (450) (500)
<i>S. mikatae</i>	CBS 8839 ^T	150 260 410	240 490	160 390	(100) 500	760
	NCYC 2970	150 260 410	240 490	160 390	(100) 500	760
	CBS 10522	150 260 410	320 490	160 390	(100) 500	200 600
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	750	750	220 390	200 400	350 450
	28	750	750	220 390	200 400	350 450
	35	750	750	220 390	200 400	350 450
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	750	320 390 690	570	200 400 570	350 400
	NCYC 396	750	320 390 690	570	200 400 570	350 400
	NCYC 529	750	320 390 690	570	200 400 570	200 350 400 600
<i>S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii</i>						
	CBS 8614	200 590 750	240 280 320 490 690	100 170 290 570	(150) 200 400 460 (570)	200 300 350 400 (450) (500) 600
<i>S. cerevisiae x kudriavzevii</i>	NCYC 3518	200 590 750	240 490 (530) 690	100 170 290 570	(150) 200 400 460 (570)	200 300 350 (400) (450) (500) 600
	NCYC 3739	200 590 750	240 490 690	100 170 290 570	(150) 200 400 460 (570)	200 300 350 (450) (500) 600

Fortsetzung Tab. 8.5: Restriktionsmuster verschiedener Genregionen von Stämmen der Gattung *Saccharomyces* (Abb. 8.1A-C)

		Restriktionsmuster nach Verdau der angegebenen Genregionen ^a mit den entsprechenden Enzymen, Fragmentgröße in bp ^b							
		MET6			MET6-K ^c			OPY1	
Art	Stamm	HaeIII	Hinfl	ScrFI	HaeIII	Hinfl	ScrFI	HaeIII	ScrFI
<i>S. arboricola</i>	CBS 10644 ^T	200 480	620	680	-	-	-	760	310 460
	DSM 70412 ^T	200 480	620	610 680	-	-	-	350 400 760	220 260 310 560
<i>S. bayanus</i>	CBS 395	200 480	620	680	-	-	-	350 400	220 560
	CBS 7001	200 480	620	680	-	-	-	350 400	220 560
<i>S. cariocanus</i>	CBS 8841 ^T	640	200 450	680	-	-	-	760	310 460
	NCYC 2821	640	200 450	680	-	-	-	760	310 460
	CBS 5313	640	200 450	680	-	-	-	760	310 400
<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T	680	200 450	680	-	-	-	760	310 460
	93	680	200 450	680	-	-	-	760	310 460
	462	680	200 450	680	-	-	-	760	310 460
<i>S. eubayanus</i>	CBS 12357 ^T	200 480	620	610	-	-	-	760	220 260 310
<i>S. kudriavzevii</i>	CBS 8840 ^T	-	-	-	680	620	680	250 510	750
	NCYC 2969	-	-	-	680	620	680	250 510	750
	NCYC 3494	-	-	-	680	620	680	250 510	750
	727	-	-	-	680	620	680	250 400	750
<i>S. mikatae</i>	CBS 8839 ^T	680	620	610	-	-	-	160 200 350	220 500
	NCYC 2970	680	620	610	-	-	-	160 200 350	220 500
	CBS 10522	680	620	610	-	-	-	160 200 350	220 500
<i>S. paradoxus</i>	CBS 432 ^T	680	620	680	-	-	-	250 510	310 460
	28	680	620	680	-	-	-	250 510	310 460
	35	680	620	680	-	-	-	250 510	310460
<i>S. pastorianus</i>	DSM 6580 ^T	200 480 680	200 450 620	610 680	-	-	-	760	220 260 310 460
	NCYC 396	200 480 680	200 450 620	610 680	-	-	-	760	220 260 310 460
	NCYC 529	200 480 680	200 450 620	610 680	-	-	-	760	220 260 310 460
<i>S. bayanus x cerevisiae x kudriavzevii</i>	CBS 8614	200 480 680	200 450 620	210 680	680	620	680	250 350 400 430 510 760	220 310 460 560 750
<i>S. cerevisiae x kudriavzevii</i>	NCYC 3518	200, 680	200 450	210 680	680	620	680	250 430 510 760	310 400 460 750
	NCYC 3739	680	200 450	680	680	620	680	250 510 760	310 460 750

-: kein PCR-Produkt, ^a: vergl. Tab. 2.6, ^b: Die Fragmentgrößen wurden durch Auswerten der Agarosegele (Abb. 8.1A-C) mit Hilfe der Software Bio-1D bestimmt und auf 10 bp gerundet. Hierbei wurden Fragmente, die kleiner als 100 bp waren nicht berücksichtigt. ^c: *S. kudriavzevii*-spezifisches Allel.

9 DRUCKGENEHMIGUNGEN

Die nachfolgenden Abbildungen wurden wissenschaftlichen Publikationen entnommen. Die hierzu erforderlichen Druckgenehmigungen konnten nach Erstellung eines RightsLink-Account (<http://myaccount.copyright.com>) über das Copyright Clearance Center (<http://www.copyright.com/>) eingeholt werden.

Abbildung 1.1A

“Reprinted from Journal of Bioscience and Bioengineering, 96/1, Rainieri S, Zambonelli C, Kaneko Y, *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution, Pages 1-9, Copyright (2003), with permission from Elsevier.”

Lizenznummer: 3282000907440

Abbildung 1.1B

Reprinted from Trends in Genetics, 29/5, Hittinger CT, *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus, 309-317, Copyright (2013), with permission from Elsevier.”

Lizenznummer: 3282010141027

Abbildung 1.2

“Reprinted from Letters in Applied Microbiology, 48/2, Bartowsky EJ, Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it, 149-156, Copyright (2009), with permission from Elsevier.”

Lizenznummer: 3281290782546

10 DANKSAGUNGEN

11 LEBENSLAUF
