

**Vergleichende Analyse der Blütentranskriptome von
Vitis vinifera ssp. *sylvestris* und *Vitis vinifera* ssp. *vinifera***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat)

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Birte Ding

Geboren am 04. Juni 1988

In Kirn

Mainz, 2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Weinrebe.....	1
1.1.1 Geschichte.....	1
1.1.2 Verbreitung und Anbau	2
1.1.3 Morphologie und Vermehrung	3
1.1.4 Genom.....	5
1.2 Wachstum und Entwicklung der Weinrebe	5
1.2.1 Modelle zur Einteilung der Entwicklungsstadien	5
1.2.2 Knospenentwicklung	6
1.2.3 Blütenentwicklung	7
1.3 Geschlechtsbestimmung im Genus <i>Vitis</i>	8
1.3.1 Forschungsgeschichte	8
1.3.2 Aktuelle Forschung	10
1.4 Transkriptomanalysen im Genus <i>Vitis</i>	12
1.4.1 ESTs und Microarray	12
1.4.2 Etablierung des Next-Generation Sequencing	13
1.5 Zielsetzung	15
2. Material und Methode.....	17
2.1 Pflanzenmaterial.....	17
2.2 Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1 DNA-Isolierung	18
2.2.2 RNA-Isolierung.....	19
2.2.3 DNase-Verdau	19
2.2.4 Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	20
2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung bei RNA	20
2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung bei DNA.....	20
2.2.5 Alkoholfällung	20
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	21
2.2.6.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	21

2.2.6.2	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.7	cDNA-Synthese.....	22
2.2.7.1	qRT-PCR	22
2.2.8	Polymerasekettenreaktion und Aufreinigung.....	22
2.2.8.1	Inverse PCR.....	23
2.2.9	Quantitative Real-Time PCR.....	24
2.2.9.1	Auswertung quantitative Real-Time PCR	26
2.2.10	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	28
2.2.11	Plasmid-Präparation	29
2.2.12	Sanger-Sequenzierung	29
2.3	Next-Generation Sequencing.....	29
2.3.1	Verarbeitung der Daten.....	30
2.4	Bioinformatische Methoden.....	30
2.4.1	„large gap read mapping“	30
2.4.2	RNA-Seq	31
2.4.3	Analyse der differentiellen Genexpression.....	31
2.4.4	Analyse der Sanger-Sequenzierungen.....	32
2.4.5	„open reading frame“- (ORF) Suche.....	32
2.4.6	Blast2GO	32
2.5	Lösungen und Puffer	32
3.	Ergebnisse.....	35
3.1	RNA-Isolierung aus Weinblüten.....	35
3.2	Genexpressionsanalyse mittels Illumina-Sequenzierung.....	36
3.3	Globale Transkriptomanalyse.....	37
3.3.1	Vergleich der Expressionsprofile aller Datensätze	38
3.3.2	Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern männlicher Blüten aus <i>Vitis sylvestris</i>	39
3.3.3	Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten weiblicher Blüten aus <i>Vitis sylvestris</i>	41
3.3.4	Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern aus <i>Vitis vinifera</i>	42
3.3.5	Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten aus <i>Vitis vinifera</i>	43

3.3.6	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus <i>Vitis sylvestris</i>	45
3.3.7	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus <i>Vitis vinifera</i>	50
3.4	Quantitative Real-Time PCR.....	55
3.4.1	Ausgewählte Gene	55
3.4.2	Analyse der Genexpression von ausgewählten Gene aus den Staubblättern männlicher Blüten aus <i>Vitis sylvestris</i>	60
3.4.3	Analyse der Genexpression von ausgewählten Gene aus den Fruchtknoten weiblicher Blüten aus <i>Vitis sylvestris</i>	61
3.4.4	Analyse der Genexpression der ausgewählten Gene aus den hermaphroditischen Staubblättern	62
3.4.5	Analyse der Genexpression der ausgewählten Gene aus den hermaphroditischen Fruchtknoten	64
3.5	Geschlechtsbestimmende Region von Fechter et al.....	65
3.5.1	Aufklärung der Sequenz der 34 kb-Lücken in der geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al.	65
3.5.1.1	Adeninphosphoribosyltransferase.....	70
3.5.1.2	Aufklärung der Struktur des Gens GSVIVG01001286001	76
4.	Diskussion	78
4.1	Einfluss der Entnahmezeitpunkte und Materialverarbeitung	78
4.2	Beurteilung der Daten aus der Illumina-Sequenzierung.....	79
4.3	Vergleich der Genexpressionsprofile aller Datensätze	81
4.3.1	Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern aus <i>Vitis sylvestris</i>	82
4.3.2	Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten aus <i>Vitis sylvestris</i>	83
4.3.3	Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern aus <i>Vitis vinifera</i>	85
4.3.4	Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten aus <i>Vitis vinifera</i>	86
4.4	Bewertung der differentiellen Genexpression in den verschiedenen Geweben.....	88
4.4.1	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus <i>Vitis sylvestris</i>	88
4.4.2	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus <i>Vitis vinifera</i>	91

4.5	Hypothetisches Modell über den Einfluss der potenziellen Kandidatengene auf die Geschlechtsrealisierung.....	94
4.6	Auswertung der quantitativen Real Time-PCR.....	98
4.6.1	Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der männlichen Staubblätter	98
4.6.2	Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der Fruchtknoten aus <i>V.s.</i>	99
4.6.3	Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der hermaphroditischen Staubblätter	100
4.6.4	Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der hermaphroditischen Fruchtknoten.....	100
4.7	Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al.....	101
4.7.1	Analyse des Bereichs mit fehlender Sequenzinformation in der geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al.	102
4.7.1.1	Adeninphosphoribosyltransferase.....	103
4.7.1.2	Struktur des Gens GSVIVG01001286001	104
5.	Zusammenfassung	105
Supporting Information (SI)	107
Tabellen.....	107
Sequenzen.....	108
Dateien	109
Abbildungsverzeichnis	110
Tabellenverzeichnis	112
Literaturverzeichnis	114
Curriculum Vitae.....	127
Danksagung.....	129
Eidesstattliche Erklärung.....	130

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
abs.	absolut
AS	Aminosäuren
BAC	Bacterial artificial chromosome
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundesamt, chemische Industrie
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CDS	kodierende Sequenz (engl. Coding DNA Sequenz)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	Cultivar (engl. für: Sorte)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
E-Puffer	Elektrophorese-Puffer
et al.	et altere (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
for	engl. forward
g	Gramm
Gb	Gigabasen
GO	Gene Ontology

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
Indel	Verschmelzung aus Insertion und Deletion
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
Jhd.	Jahrhundert
kb	Kilobasen
L	Liter
LB-Medium	Lysogeny broth Medium
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampère
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
PCR	polymerase chain reaction
pH	potential hydrogenii
pmol	Picomol
PN40024	Pinot Noir Klon 40024
rev	engl. reverse
PVPP	Polyvinyl(poly)pyrrolidon
RT	Raumtemperatur
SNP	engl. single nucleotide polymorphism
ssp.	Subspezies
SSR	engl. Simple sequence repeats
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
UTR	engl. Untranslated Region
UV	Ultraviolettes Licht
v.Chr	vor Christus
VE	voll entsalzt
Vol.	Volumen
Vol.-%	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- α -D-galactosid

1. Einleitung

1.1 Die Weinrebe

1.1.1 Geschichte

Die Gattung *Vitis vinifera* L. zählt zu den ältesten Kulturpflanzen weltweit und gehört zu einer der frühesten domestizierten Obstkulturen. Sie gehört zur Familie der Weinrebengewächse (*Vitaceae*), welche etwa 60 verschiedene Spezies umfasst und über die ganze nördliche Hemisphäre verbreitet ist (Terral et al., 2010). Morphologisch zeichnet sie sich durch das Auftreten von Ranken (siehe Abbildung 1.1) und Blütenständen gegenüber der Blätter aus. Daraus wurde die Theorie abgeleitet, dass ihre Vorfahren zunächst keine Kletterpflanzen waren und das Auftreten von Blättern und Ranken erst durch die Anpassung an tropische Umgebungen entstanden ist (Mullins et al., 1992).



Abbildung 1.1: Ranken am Ende eines Rebentriebes

Die ersten Funde von Samen domestizierter Weinreben stammen etwa aus dem Jahr 8000 v.Chr. aus Georgien und der Türkei sowie aus dem bronzezeitlichen Frankreich. Die frühesten Aufzeichnungen über den Weinanbau finden sich in Form von archäologischen Funden bereits 7400-7000 v.Chr. im Iran, im Gebiet des nördlichen Zagrosgebirges (McGovern

et al., 1996). Von den Fundorten der ersten beschriebenen Domestizierungsereignisse verbreiteten sich die Reben um 550 v.Chr. in angrenzende Regionen wie Ägypten und Mesopotamien, von dort aus, durch die zunehmende Zivilisierung, im gesamten Mittelmeerraum und später in weiteren Teile Europas, unter anderem auch in Deutschland. Die Römer waren die Ersten, die den kultivierten Pflanzen Namen gaben. Die weiterführende Benennung erfolgte dann durch katholische Mönche, einige der damals verwendeten Namen existieren noch heute. Während der Kolonialzeit ab dem 16. Jhd. erreichte *Vitis vinifera* auch Amerika, zunächst nur als Saatgut, später wurden auch Pflanzenschnitte aus Europa eingeführt. Im 19. Jahrhundert brachte man die Pflanzen darüber hinaus nach Neuseeland, Australien und Südafrika (This et al., 2006).

1.1.2 Verbreitung und Anbau

Laut Statistiken der Internationalen Organisation für Rebe und Wein betrug die weltweite Rebenanbaufläche im Jahr 2013 7519 Tausend Hektar (Tha). Die damit verbundene Traubenproduktion für die unterschiedlichen Verwendungszwecke (Wein, Rosinen, Tafeltrauben) lag bei 751 Millionen Doppelzentnern (Mdz) und zeigte, wie schon in den Jahren zuvor, eine weitere Zunahme. Die Weinerzeugung weltweit hingegen ließ 2014 mit 271 Millionen Hektolitern (Mhl) eine sinkende Tendenz im Vergleich zu den Vorjahren erkennen, wobei Europa weiterhin einer der größten Erzeuger ist. Innerhalb Europas wiederum haben vor allem Frankreich, Italien und Spanien daran den größten Anteil. Aber auch in den USA und auf der Südhalbkugel nimmt die Weinproduktion einen immer größeren Umfang ein, insbesondere in Argentinien, Neuseeland und Südafrika (Aurand, 2014).

In Eurasien und Nordafrika existieren zwei Arten von Reben: Die kultivierte Form *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*, die Echte Weinrebe, und *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*, die Wilde Weinrebe. Letztere gilt als Vorfahre der heutigen Kulturrebe. Beide werden als Subspezies der Gattung *Vitis* geführt, allerdings zeigt sich, dass die Unterschiede durch die Domestizierung erheblich sind (This et al., 2006). Die Wilde Weinrebe ist eine ausdauernde Liane, welche in ihrem natürlichen Habitat vor allem an Bäumen emporwächst. Heutzutage findet man sie nur noch selten in einigen Mikropopulationen mit wenigen Individuen in den westlichen Teilen des Mittelmeerraums sowie auf der Halbinsel Ketsch im Rhein (Terral et al., 2010). Von der Kulturrebe hingegen existieren weltweit mehrere tausend Variationen, von denen allerdings nur ein Teil zur Produktion verwendet wird. *Vitis vinifera* ist die einzige Spezies, die in der

globalen Weinproduktion eingesetzt wird. Mit einer Anbaufläche von etwa 8 Millionen Hektar (Mha) ist sie die mit am häufigsten angebaute Obstsorte (Vivier and Pretorius, 2002). Andere *Vitis*-Arten, wie *Vitis rotifolia*, welche in Amerika heimisch ist, werden im europäischen Weinanbau nur als Unterlagen zum Pfropfen verwendet, da sie resistenter gegenüber einigen Schädlingen sind (Terral et al., 2010). Diese Vorteile halfen Ende des 19. Jahrhunderts auch bei der Rettung der Europäischen Arten, nachdem durch Schädlingsbefall, vor allem durch die Reblaus, deren Ausrottung drohte. Die verschiedenen Arten werden bezüglich ihrer Verarbeitung in Weintrauben, Tafeltrauben und Rosinen klassifiziert (This et al., 2006). Mehrere aus dem Wein stammende Antioxidantien, wie Polyphenole oder Resveratrol, finden außerdem inzwischen immer mehr Verwendung als Lebensmittelzusatzstoffe, in der Kosmetik oder auch in der pharmazeutischen Industrie (Carmona et al., 2008).

1.1.3 Morphologie und Vermehrung

Während der Domestizierung unterlagen die Reben vielen Veränderungen bezüglich der Morphologie von Blättern, Blüten und Trauben. Die Wilde Weinrebe, im weiteren Verlauf der Arbeit *Vitis sylvestris* (*V.s.*), zeichnet sich durch meist dreiteilige, tiefgelappte Blätter aus, die kleiner sind als bei der Kulturrebe mit großen, eher wenig gelappten Blättern (siehe Abbildung 1.2). Die Beeren sind klein und rund und haben oft einen säuerlichen Geschmack. Sie sind meist bläulich gefärbt.



Abbildung 1.2: Morphologie der Blätter

Links die Blätter aus *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* mit tiefer, dreiteiliger Lappung und rechts aus *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* mit einer geringeren Lappung

Die Kulturrebe hingegen, im weiteren Verlauf als *Vitis vinifera* (*V.v.*) benannt, zeichnet sich durch große, eng stehende Beeren mit viel Fruchtfleisch und einem hohen Anteil an Fruchtzucker aus. Diese Eigenschaft führte dazu, dass diese Subspezies hauptsächlich zur

Herstellung von Wein verwendet wird. Die Beeren zeigen je nach Sorte Farbvarianten von Weiß über verschiedene Rosé-Töne bis hin zu Dunkelblau. Des Weiteren haben die Sorten von *V.v.* den Vorteil, dass sie auch auf trockenen Untergründen wachsen können, wohingegen *V.s.* empfindlicher gegenüber Trockenstress ist (Zecca et al., 2010). Einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Subspezies zeigt die Morphologie der Blüten (vgl. Abbildung 1.3): Die Wilde Rebe besteht aus zweihäusigen (diözischen) Individuen. Die weiblichen Individuen weisen einen ausgeprägten Fruchtknoten sowie rückgebildete Staubblätter auf. Bei den männlichen Individuen sind ausgebildete Staubblätter und rudimentäre Fruchtknoten ohne befruchtungsfähige Narbe zu finden. Die Kulturrebe hingegen zeichnet sich durch zwittrige Blüten aus, welche sowohl fertile Staubblätter als auch Fruchtknoten besitzen. Dadurch ist die Rebe zur Selbstbefruchtung befähigt (Olmo & Negi, 1970).

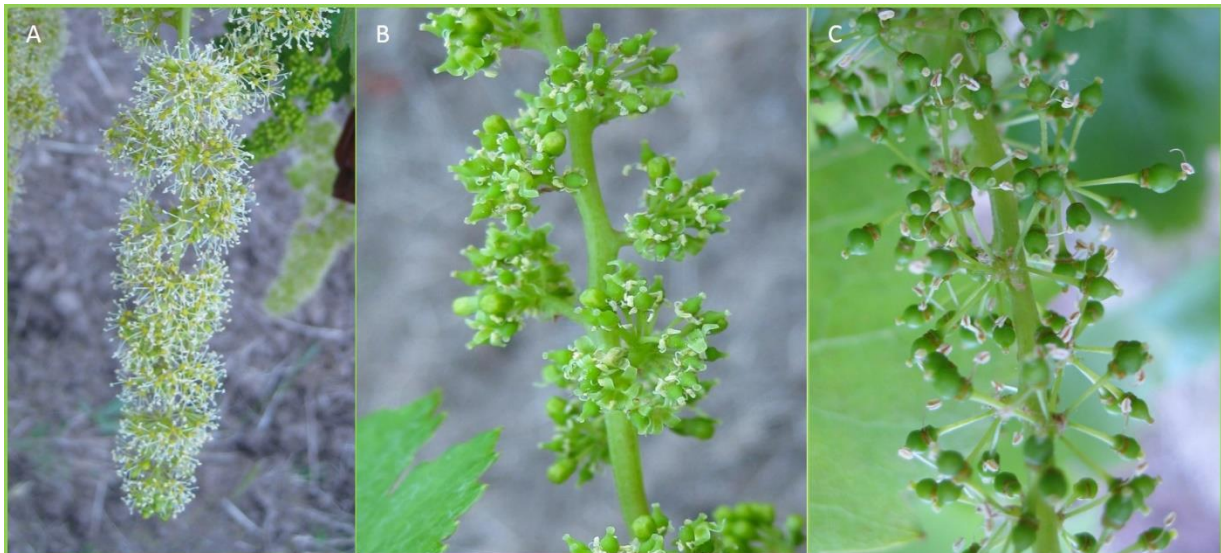


Abbildung 1.3: Ausschnitte von Blütenständen

Zu erkennen ist der Blütenstand eines männlichen Individuums (A), eines weiblichen Individuums (B) von *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* und eines Hermaphroditen (C) von *Vitis vinifera* ssp. *vinifera*

Diese Eigenschaft ist für den ertragsorientierten Anbau von großem Interesse, da durch Selbstbestäubung auf der vorhandenen Fläche mehr Rebstöcke angepflanzt werden können, die einen Fruchtertrag bringen.

Die Weinreben sind meist diploid, in wenigen Fällen können sie auch tetraploid sein (Leal et al., 2006). Als Züchtungsmethode dient oft die vegetative klonale Selektion, um zu gewährleisten, dass die Eigenschaften der Mutterpflanzen in den genetisch identischen Nachkommen (Klone) erhalten bleiben. Um weitere Resistenzen in den europäischen *Vitis vinifera*-Sorten zu etablieren, wurden früher die heimischen Sorten mit solchen aus Amerika

gekreuzt. Diese erwiesen sich als besonders resistent gegenüber der Reblaus *Phylloxera vastatrix*. Ende des 19. Jahrhunderts kam es in Europa zu einer Reblaus-Epidemie, im Zuge derer fast die gesamten Rebenpopulationen ausgelöscht wurden. Heutzutage werden diese amerikanischen Spezies nicht mehr eingekreuzt, sondern die einheimischen Sorten auf Rebstöcke der amerikanischen Arten gepfropft (Alleweldt & Possingham, 1988).

1.1.4 Genom

Das Genom von *Vitis vinifera* L. war 2007 das vierte sequenzierte Genom von Blütenpflanzen. Es besteht im haploiden Satz aus 19 Chromosomen mit über 30.000 proteinkodierenden Genen (Jaillon et al., 2007). Schwierigkeiten bei der Genom-Assemblierung gab es aufgrund der hohen Heterozygotie mit fast 13% unterschiedlichen Allelen. Des Weiteren erschwert das Vorkommen vieler Transposons eine Charakterisierung des Genoms (Benjak et al., 2008). Um diesen Problemen teilweise entgegen zu wirken, wurde die pflanzliche Grundlage, ein Pinot Noir-Klon (40024), mit einem möglichst hohen Grad an Homozygotie gezüchtet. Dabei wurde eine Übereinstimmung zwischen den Allelen von ca. 93 % erreicht und somit die Assemblierung der jeweiligen Contigs erleichtert. Mit 6.2 Millionen Sequenzen wurde eine etwa 8 fache Abdeckung des Genoms mit einer Größe von 487 Mb erzielt (Jaillon et al., 2007). Seit 2010 existiert eine Referenzsequenz des Genoms von Pinot Noir 40024, welche auf einer Sequenzierung mit 12 facher Abdeckung des Genoms basiert (D. M. Martin et al., 2010). Es handelt sich dabei trotzdem um ein sogenanntes „Entwurf-Genom“, was bedeutet, dass es bis heute nicht vollständig entschlüsselt ist.

1.2 Wachstum und Entwicklung der Weinrebe

1.2.1 Modelle zur Einteilung der Entwicklungsstadien

Für die Einteilung und Beschreibung der unterschiedlichen Wachstumsstadien der Weinrebe existieren verschiedene Ansätze. Das erste Modell wurde von Baggiolini bereits 1952 aufgestellt. Es bestand zunächst aus zehn einfach gehaltenen Stadien (Stadium A bis J), welche später aufgrund nicht ausreichender Informationen bis Stadium P erweitert wurden (zitiert in Baggiolini et al., 2008). Bei diesem Aufbau werden allerdings keine Zwischenstufen in der Entwicklung berücksichtigt, so dass trotz der Erweiterung keine präzisen Aussagen getroffen werden konnten. Dieses Modell gilt daher als veraltet. Das zweite Modell, welches von Eichhorn und Lorenz 1977 aufgestellt wurde, umfasst 22 Entwicklungsstadien, die eine

genauere Beschreibung ermöglichen. Die verwendete Nummerierung von 1-47 geben die Möglichkeit weitere Zwischenstufen durch neuere Erkenntnisse einzufügen (Eichhorn & Lorenz, 1977). Das Modell wurde als Grundlage für eine weitere Einteilung, die sogenannte BBCH-Skala, verwendet. Diese beschreibt die Entwicklungsstadien von mono- und dikotylen Pflanzen. Sie besteht aus zehn Makrostadien, welche jeweils aus bis zu zehn Mikro-stadien aufgebaut sein können (Hack et al., 1992). Diese Skala wurde von H. Lorenz 1994 (zitiert in Coombe, 1995) für die Weinrebe angewendet und dabei leicht abgewandelt, so dass sie nur noch aus sieben Makrostadien besteht. Das jüngste Modell zur Beschreibung der Wachstumsstadien der Reben, das modifizierte E-L System, wurde von Coombe entworfen und stützt sich auf das von Lorenz und Eichhorn in den 70er Jahren entwickelten System (Coombe, 1995). Es umfasst sieben Makrostadien, welche, basierend auf den äußerlichen Infloreszenz-Merkmalen, in 47 Entwicklungsstadien unterteilt sind. Der Aufbau dieser Entwicklungsskala ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1.1: Stadien des modifizierten E-L Systems, zusammengefasst in größere Makrostadien (Coombe, 1995)

Makrostadium	Bezeichnung	E-L-Stadium
0	Knospenentwicklung	1-4
1	Sprossentwicklung	7-14
5	Blütenstandentwicklung	15-18
6	Blüte	19-26
7	Fruchtentwicklung	27-33
8	Fruchtreifung	34-39
9	Seneszenz	41-47

1.2.2 Knospenentwicklung

Die Rebe zählt zu den mehrjährigen Pflanzen, bei denen sich der Entwicklungszyklus der reproduktiven Organe bis hin zur Beerenreifung über etwa zwei Jahre erstreckt. Dieser Zyklus ist durch eine Ruhephase vom Herbst bis zum Frühjahr des darauffolgenden Jahres unterbrochen (Carmona et al., 2008). Im ersten Jahr kann man latente Knospen in den Blattachsen der diesjährigen jungen Blätter erkennen, welche durch verschiedene Sprossapikalmeristeme (SAM) gebildet werden (Carmona et al., 2002). Von dort kommt es zur Ausbildung der verschiedenen Anlagen. Zunächst wird an der Spitze einer Knospe eine Folge

von Blattprimordien gebildet. Diese zeigen schnell eine gelappte Form und haben ein blattähnliches Erscheinungsbild. Nach der Ausbildung von vier bis fünf Blattprimordien, welche distich angeordnet sind, teilt sich die Spitze in zwei fast gleiche Teile (Carmona et al., 2002). Im weiteren Verlauf des Jahres bilden sich gegenüber der Blattprimordien weitere Anlagen aus dem lateralen Meristem. Aus den Anlagen entwickeln sich später entweder Blütenstände oder Ranken. Bis zum Ende des ersten Jahres kommt zu keiner genaueren Differenzierung der Anlagen, sie bleiben als Knospen erhalten und befinden sich während des Winters in einer Ruheperiode (Srinivasan & Mullins, 1976). Erst im darauffolgenden Frühjahr kommt es zur Knospung. Aus jeder Knospe entsteht ein Spross, an dem im unteren Teil die Blätter den Blütenständen gegenüberliegen. In der mittleren bis oberen Region der Pflanze treten anstatt der Blütenstände Ranken auf. Die Blütenstände besitzen einen razemösen Verzweigungstyp, der aus vielen Ästen gebildet wird. Jedes Blütenstandmeristem teilt sich anschließend in ein Bündel aus drei bis vier Blütenmeristeme (Carmona et al., 2008).

1.2.3 Blütenentwicklung

Die Blütenentwicklung ist ein entscheidender Entwicklungsschritt im Wachstumszyklus höherer Pflanzen. Durch Entwicklung männlicher und weiblicher Gameten kommt es zur meiotischen Rekombination und somit zu einer signifikanten Steigerung der genetischen Diversität. Allerdings rückt dieser Aspekt bei den im Weinanbau verwendeten Kulturreben aufgrund ihrer hermaphroditischen Blüten in den Hintergrund, da dort der höchstmögliche Ertrag an Früchten das primäre Ziel ist (Carmona et al., 2008).

Die Blütenentwicklung beginnt im zweiten Jahr des Entwicklungszyklus mit der Knospung und Verlängerung der Sprossinternodien. Im Falle der hermaphroditischen Blüte der Kulturrebe *Vitis vinifera* bilden sich aus dem Blütenmeristem zuerst fünf Kelchblätter, welche zusammen den Blütenkelch bilden. Anschließend formen fünf Kronblätter eine Korolla, gefolgt von fünf Staubblättern und zwei Fruchtblättern, welche den Stempel bilden (Gerrath, 1993). Während der Blütenentwicklung verwachsen die Kronblätter an der Spitze und bilden die Kalyptra. Diese schützt die fertilen Organe. Durch das Wachstum der reproduktiven Organe wird die Kalyptra mit Beginn der Blüte abgeworfen (Srinivasan & Mullins, 1976).

Die Entwicklung der männlichen und weiblichen Blüten aus *Vitis sylvestris* verläuft zunächst in gleicher Weise wie bei den hermaphroditischen Blüten der Kulturrebe, der Blütenaufbau ist

identisch. Allerdings entwickeln sich die männlichen Blüten zeitlich etwas früher als die weiblichen (Ramos et al., 2014). Erste Unterschiede zeigen sich in der Phase, in der die weibliche Blüte Griffel und Narbe ausbildet. In der männlichen Blüte verlangsamt der Stempel sein Wachstum und es erscheinen Papillen an der Spitze des Ovars. Es kommt jedoch zu keiner Differenzierung von Griffel und Narbe. Obwohl sich die Samenanlage äußerlich, im Vergleich zur weiblichen Blüte, anders entwickelt, sind Samenanlagenentwicklung und Megasporogenese, also die Entwicklung des weiblichen Gametophyten, nicht inhibiert. Der Unterschied zeigt sich erst in der Beschaffenheit der Samenanlage: In der männlichen Blüte löst sich das äußere Integument vom Nucellus ab. Dies ist wahrscheinlich das Resultat von Apoptoseereignissen spezifischer Zellschichten, wodurch die Ausbildung funktionsfähiger Samen in männlichen Individuen unterbunden wird (Caporali et al., 2003).

In der weiblichen Blüte entwickeln sich die Staubblätter anatomisch gleich zur männlichen Blüte, so dass sie mit ausgeprägtem Fruchtknoten kaum von den hermaphroditischen Blüten zu unterscheiden sind. Im offenen Zustand sind die Staubblätter allerdings zurückgebogen (Olmo & Negi, 1970). Die Gametogenese verläuft bis zum Tetradenstadium nach der Meiose wie in der männlichen Blüte ab. Es sind sowohl die vegetativen als auch generativen Kerne zu erkennen. Auffällig ist jedoch die Beschaffenheit und äußere Form der Mikrosporen der weiblichen Blüte, welche nach der Keimung den männlichen Gametophyten bilden. Sie zeigen eine abnormal runde Form ohne deutliche Keimspalte. Auch die typischen Verdickungen der Zellwand, welche die männlichen Mikrosporen aufweisen, sind nicht zu finden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Mutterzelle der Mikrosporen nicht die korrekte genetische Information für die Konstruktion einer funktionsfähigen Zellwand besitzt. Die abnormale Zellwandarchitektur führt folglich zur Sterilität der Mikrosporen in den weiblichen Blüten. (Caporali et al., 2003).

1.3 Geschlechtsbestimmung im Genus *Vitis*

1.3.1 Forschungsgeschichte

Die Geschlechtsbestimmung bei *Vitis* ist ein bis heute in der Forschung oft untersuchtes Phänomen. Die Umwandlung von diözischen, zweigeschlechtlichen Vorfahren der Wilden Weinrebe zu den monözischen Individuen der heutigen Kulturrebe mit hermaphroditisch ausgeprägten Blüten ist jedoch bisher ungeklärt. Frühe Beschreibungen unterschiedlicher

Arten der Blüten stammen bereits aus dem späten 18. Jahrhundert. Es handelte sich um rein männliche und weibliche Blüten, aber auch unvollständige Hermaphroditen wurden beschrieben. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts erfolgten erste Überlegungen über mögliche Bestäubungs- und Befruchtungsmöglichkeiten der Arten untereinander. Anfang des 20. Jahrhunderts stellte Thomas Munson die Hypothese auf, dass es drei Arten von Blüten gibt und sich die eingeschlechtlichen Blüten aus dem hermaphroditischen Zustand entwickelt haben (zitiert in Oberle, 1938). Wissenschaftliche Beweise für die verschiedenen Funktionen der drei Blütentypen wurden erstmals 1888 von Emrich Rathay durch mikroskopische Analysen von Pollenkörnern erbracht. Er entdeckte ebenfalls, dass die Diözie aus dem Absterben entweder des männlichen oder des weiblichen Elements einer eigentlich hermaphroditischen Blüte als Ausgangsform resultiert. Allerdings traten die Hermaphroditen nicht in wilden Arten auf, sondern nur bei Arten, die von Kultivierung beeinflusst waren. Auch Rathay kam zu dem Schluss, dass die hermaphroditische Form der Blüte als immer vorhandene Ursprungsform wahrscheinlich ist. Andere Forscher unterstützten diese These mit ihren Ergebnissen (zitiert in Oberle, 1938). Hirayanagi führte 1929 zum ersten Mal Untersuchungen an Chromosomen durch und konnte keinen Unterschied in der Form und der Größe zwischen weiblichen und männlichen Individuen oder den Hermaphroditen finden. Er schloss er daraus, dass im Genus *Vitis* keine morphologisch unterscheidbaren Geschlechtschromosomen vorkommen. Dieses Ergebnis wurde mehrfach bestätigt (zitiert in Oberle, 1938). Über den genauen Mechanismus der Vererbung des Geschlechts wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt.

Oberle beschrieb in seiner Arbeit für die europäischen und asiatischen Arten, dass die Blüten im Grundzustand zunächst zwittrig sind. Ein rezessiver Faktor bewirkt das Absterben der männlichen Staubblätter, ein dominanter wiederum das Absterben der weiblichen Elemente. Er nahm an, dass beide Faktoren auf einem Einzellocus lagen. Im Gegensatz dazu beschreibt er die amerikanischen Arten von *Vitis* als vollständig diözisch (Oberle, 1938). Andere Schlüsse über die Geschlechtsbestimmung wurden von Negi und Olmo formuliert. Wie schon Oberle beschrieben sie einen Einzellocus mit einem männlichen und einem weiblichen Allel. Die Entstehung des Hermaphroditen erfolgt dabei aufgrund der Einflüsse modifizierender Gene (Negi & Olmo, 1971). Ein weiteres Modell von Carbonneau (1983) sieht einen Einfluss

epistatischer Effekte auf die Geschlechtsbestimmung (zitiert in Fechter et al., 2012). Beide Thesen konnten nicht bestätigt werden (Fechter et al., 2012).

Die Hypothese des Franzosen Louis Levadoux von 1946 beschreibt den Geschlechtslocus ebenfalls als Einzellocus, allerdings bestehend aus drei Allelen. Dabei soll das männliche Allel (M) dominant über das hermaphroditische Allel (H) sein, welches wiederum dominant über das weibliche Allel (F) ist (zitiert in Antcliff, 1980). Diese Hypothese wurde von mehreren Forschern bestätigt (Antcliff, 1980; Marguerit et al., 2009), so dass bis heute von einem Einzellocus mit drei Allelen ausgegangen wird.

Neue Erkenntnisse über die genaue Lage dieses Geschlechtslocus im Genom wurden zum ersten Mal 2000 veröffentlicht. Aufgrund von Kopplungsanalysen, die in interspezifischen Hybridpopulationen durchgeführt wurden, und mithilfe von SSR- („*simple sequence repeats*“) Markern konnte der geschlechtsbestimmende Locus nahe der Kopplungsgruppe 14 lokalisiert werden, welche auf Chromosom 2 liegt (Dalbó et al., 2000). Dieser Bereich wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt (Marguerit et al., 2009; Riaz, Krivanek, Xu, & Walker, 2006). Eine bessere Eingrenzung des Locus und erste Aufklärungsversuche über die Genstruktur wurden durch das Julius Kühn-Institut in Deutschland publiziert. Die Gruppe um Iris Fechter konnte durch eine Analyse von BAC-Klonen und aufgrund eines Vergleichs mit dem veröffentlichten Referenzgenom des Pinot Noir PN40024 (Jaillon et al., 2007) die Region auf Chromosom 2 eingrenzen. Daraus resultierte eine Aufstellung von potenziellen Kandidatengen der Geschlechtsbestimmung. Etabliert wurde daraufhin eine Region mit einer Größe von 143 kB, in der zwölf mögliche Kandidatengene bzw. ein Retrotransposon liegen. Dabei konnte ein Gen identifiziert werden, welches für eine Adenosinphosphoribosyltransferase (APT) kodiert (Fechter et al., 2012). Die Funktion der Transferase wurde in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die Hauptaufgabe dieser Transferase ist die Verstoffwechslung des Pflanzenhormons Cytokinin, weshalb ihr eine mögliche Beteiligung an der Blütenentwicklung zugesprochen wird (Allen et al., 2002).

1.3.2 Aktuelle Forschung

Eine italienische Forschungsgruppe lieferte 2013 neue Ergebnisse zur Struktur des Geschlechtslocus, welche sich grundlegend von denen der Gruppe um Fechter unterscheiden. Ebenfalls durch Kopplungsanalysen mit SSR- („*simple sequence repeat*“) und SNP- („*single*

nucleotide polymorphism“) Markern wurde ein 199 kB großer Bereich eingegrenzt, der ebenfalls auf Chromosom 2 liegt. Somit umfasst dieser Geschlechtslocus 17 weitere Kandidatengene, welche möglicherweise an der Geschlechtsdetermination beteiligt sein können. Bei der Analyse dieser Region wurden Größenvarianten in einem Mikrosatelliten im 3'UTR (*untranslated region*) des YABBY1-Gens, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, gefunden. Diese Varianten sind mit den drei Geschlechtsallelen assoziiert (Battilana et al., 2013). YABBY-like Transkriptionsfaktoren sind in allen Lateralorganen exprimiert, welche durch das Apikal- und Blütenmeristem gebildet werden. Dort beeinflussen sie das spezifische abaxiale Zellschicksal (Bowman, 2000). Des Weiteren spielt diese Genfamilie eine Rolle bei der Zellteilung während der Blüten- und Fruchtentwicklung in *Arabidopsis* (Prunet et al., 2009).

Ein weiteres Kandidatengen ist durch die Forschung von A. Boualem in zwei *Cucumis*-Spezies bekannt geworden. Diese Pflanzenart zeichnet sich durch andromonözische Individuen aus, besitzt also männliche und zwittrige Blüten auf einem Individuum. Bei dem Gen handelt es sich um die 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Synthase (ACS), welches an der Ethylenbiosynthese beteiligt ist. Eine Mutation in Form eines SNPs führt zur Umwandlung von einer ursprünglichen Monözie zur Andromonözie (Boualem et al., 2009). Dieses Gen (GSVIVG01019920001) befindet sich in *Vitis* ebenfalls auf Chromosom 2, aber weder in der von Fechter (Fechter et al., 2012) noch in der von Battilana benannten geschlechtsbestimmenden Region (Battilana et al., 2013), sondern circa 400 kB upstream der „Battilana-Region“.

In der 2014 veröffentlichten Arbeit von Picq et al. wurden Gene in der „Battilana-Region“ und in der „Fechter-Region“, aber auch in dem dazwischen liegenden Bereich auf geschlechtsspezifische SNPs untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei das Cluster Flavin-abhängiger Monooxygenasen, ein Gen für eine Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase, ein Gen kodierend für ein Protein der Exostosinfamilie sowie ein Gen für einen WRKY-Transkriptionsfaktor. Diese zeigten mögliche geschlechtsgekoppelte SNP, wohingegen das Kandidatengen von Battilana et al., kodierend für den Transkriptionsfaktor YABBY, ausgeschlossen werden konnte. Auch das von Fechter et al. genannte Kandidatengen, kodierend für die Adeninphosphoribosyltransferase, zeigte keine geschlechtsspezifischen Polymorphismen (Picq et al., 2014).

Neuste Forschungsergebnisse, die Ende 2014 publiziert wurden, sind Transkriptomanalysen mittels NGS-Sequenzierung (Ramos et al., 2014). Dabei wurden ganze Blüten aller drei Geschlechter in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht, vom frühen Blütenstand bis kurz vor der Blüte. Mittels Analyse der differentiellen Genexpression wurden Gene identifiziert, die möglicherweise an Blütenentwicklung und Geschlechtsspezifikation beteiligt sind. Bei der Auswertung wurde der Fokus auf Gene gelegt, die nur in einem der drei Geschlechter besonders hoch oder besonders niedrig exprimiert waren. Dabei sind solche Gene, die ausschließlich in weiblichen Blüten hoch exprimiert waren, mögliche Kandidaten mit Einfluss auf die Pollensterilität. Auf der anderen Seite könnten Gene, welche nur in männlichen Blüten exprimiert sind, zum Absterben des Stempels und zur Unterdrückung des Wachstums der Narbe führen. Auf diese Weise wurden einige Kandidatengene identifiziert, von denen sich aber keines in den von Fechter und Picq beschriebenen Geschlechtsregionen befindet (Ramos et al., 2014).

1.4 Transkriptomanalysen im Genus *Vitis*

1.4.1 ESTs und Microarray

Bereits bevor 2007 das gesamte Genom eines Pinot Noir Klons sequenziert wurde (Jaillon et al., 2007), bestand ein hohes Interesse am molekularen Verständnis der verschiedenen Entwicklungsstadien der Weinreben. Besonders die Beerenentwicklung stand dabei oft im Fokus der Untersuchungen, da neue Forschungsergebnisse in diesem Bereich vor allem für Winzer und für die Verbesserung des gesamten Weinanbaus vorteilhaft sein können (Sweetman et al., 2012). Bis zum damaligen Zeitpunkt gab es schon einige Studien unter Verwendung der damals bevorzugten Methoden wie der Sequenzierung von ESTs („*expressed sequence tags*“) oder später auch der Microarray-Analyse. Der Schwerpunkt lag besonders auf den Gebieten Dormanz und Knospung, Beerenentwicklung und Weinphysiologie. Zum damaligen Zeitpunkt gab es gerade einmal 110 bekannte *Vitis*-Proteine in den nicht-redundanten Datenbanken wie GenBank, EMBL, PIR und Swiss-Prot (Ablett et al., 2000). In den folgenden Jahren etablierte man die bekannten Methoden und dadurch die Möglichkeit, größere Mengen an EST-Sequenzen zu generieren und zu charakterisieren. Eine umfassende Analyse aller bis zum damaligen Zeitpunkt in GenBank (NCBI) veröffentlichten, aber teilweise nicht charakterisierten, ESTs wurde 2005 von einem Konsortium, bestehend aus

Forschungsgruppen in Kalifornien und der Türkei, veröffentlicht. Dabei wurden über 146.000 ESTs aus verschiedenen Kulturreben untersucht, welche aus unterschiedlichen Geweben, aus diversen Entwicklungsstadien und aus verschiedenen Stresssituationen stammten. Dabei konnten für fast 18.000 Transkripte signifikante Homologien zu bekannten Proteinen identifiziert werden (Goes da Silva et al., 2005).

Die Technologie der Microarrays ermöglicht die Abschätzung der Expressionshöhe aller bekannten RNA-Transkripte eines Genoms. Es handelt sich um eine vergleichsweise kostengünstige Methode zur Analyse mehr oder weniger vollständigen Transkriptome, bei der nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial notwendig sind (Plomin & Schalkwyk, 2007). Dies erlaubt wiederum mehr Analysen zu differenziell exprimierten Genen in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie eine intensive Betrachtung einzelner Gengruppen und Stoffwechselwege (Deluc et al., 2007). Eine der umfangreichsten Untersuchungen war die Erstellung eines Expressionsatlas für die Weinrebe durch verschiedene Arbeitsgruppen in Italien. Dabei wurde die Expression von über 27.000 Genen untersucht und damit zum einen Co-Expressionsanalysen zwischen den verschiedenen Geweben, zum anderen gewebsspezifische Transkriptomanalysen durchgeführt. Diese Arbeit diente auch als Grundlage zur Entwicklung molekularer Marker aus verschiedenen repräsentativen Pflanzengewebe (Fasoli et al., 2012). Der größte Schwachpunkt sowohl der EST-Sequenzierung als auch der Microarray-Analysen liegt allerdings darin, dass „*single-copy*“-Gene unterrepräsentiert sind und daher nur schwer detektiert werden können (Sweetman et al., 2012). Die Microarray-Studien haben vor allem von dem enormen Fortschritt in der Genomsequenzierung von *Vitis* profitiert, nachdem 2007 zwei Versionen des Referenzgenoms von unterschiedlichen Konsortien veröffentlicht wurden (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007). In Kombination mit der großen Menge an sequenzierten ESTs ermöglichen die veröffentlichten Referenzgenome eine tiefere Analyse der Transkriptome verschiedener Gewebe in *Vitis* (Bellin et al., 2009).

1.4.2 Etablierung des Next-Generation Sequencing

Durch die neu etablierten Hochdurchsatzsequenzierungen der nächsten Generation („Next-Generation Sequencing“, NGS) können Sequenzen in einer Zahl generiert werden, welche eine vielfache Abdeckung eines Transkriptoms ermöglichen. Dies schafft die Voraussetzung für die detaillierte Analyse komplexer Entwicklungsvorgänge, wie z.B. der kompletten

Beerenentwicklung von der Blüte bis hin zur vollen Reife. Durch die Fülle an Daten ist es möglich, Genexpressionsprofile zu erstellen und dadurch ein immer besseres Verständnis der globalen molekularen Vorgänge zu erlangen (Zenoni et al., 2010).

Beim Abgleich der Daten aus den verschiedensten Transkriptomanalysen mittels NGS mit dem veröffentlichten Referenzgenom PN40024 zeigten sich allerdings schnell Grenzen: Aufgrund der hohen Heterozygotie und dem Auftreten vieler Polymorphismen in den Weinreben konnte festgestellt werden, dass in der Gegenüberstellung mit dem fast homozygoten Pinot Noir-Klon nicht die vollständige Diversität der Transkriptome dargestellt wird. Somit wurden neben dem Abgleich mit den vorhandenen Referenzen auch DeNovo-Assemblierungen durchgeführt. Dadurch konnten Populationsspezifische Transkripte gefunden und annotieren werden, sowie neue Spleißvarianten und Polymorphismen (Venturini et al., 2013).

Durch die Möglichkeiten der verschiedenen Analysestrategien wurden viele der grundlegenden Entwicklungsabläufe in den unterschiedlichen Geweben von Weinreben verschiedener Spezies analysiert. Sowohl der Einfluss von Umweltfaktoren und Temperatur (Díaz-Riquelme et al., 2012) als auch der Einfluss von Standorten auf die Plastizität wurden beleuchtet (Dal Santo et al., 2013). Aber auch Themen, die vor allem für die Winzer wichtig sind, können mit den neuen Möglichkeiten genauer charakterisiert werden, z.B. die Aromenbildung am Ende der Beerenreife (Cramer et al., 2014) oder die Samenentwicklung (Nwafor et al., 2014). Selbstverständlich sind mittels NGS-Transkriptomanalysen auch neue Erkenntnisse im Bereich der Geschlechtsbestimmung und der dabei beteiligten Gene zu erzielen (Ramos et al., 2014).

Neben der Aufklärung und Analyse von allgemeinen Entwicklungsabläufen in den Reben sind auch die Einflüsse verschiedener Pathogene auf die Pflanzen und die dadurch verursachten Veränderungen im Transkriptom von Interesse, so z.B. der Effekt durch den Echten Mehltau (Fung et al., 2008), für die manche Sorten auch heute noch anfällig sind, oder von verschiedenen Virus-Erregern (Singh et al., 2012). Im Zuge dessen werden immer häufiger auch Genome nicht-europäische Rebsorten sequenziert, da sich diese Spezies oft durch interessante genetische Eigenschaften und Resistenzen auszeichnen (Jiao et al., 2015). Neue

Erkenntnisse aus diesen Analysen dienen den Forschern zur Entwicklung widerstandsfähiger Pflanzen und den Winzern zur jährlichen Sicherung und möglichen Steigerung ihrer Erträge.

1.5 Zielsetzung

Die durch die Domestizierung hervorgerufene Ausprägung der hermaphroditischen Individuen in den Kulturreben (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) im Gegensatz zu ihren getrenntgeschlechtlichen Vorfahren, den Wilden Reben (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*), ist seit Jahren Gegenstand der aktuellen Forschung. Bis heute ist die Aufklärung des Mechanismus der Geschlechtsbestimmung nicht abgeschlossen und somit noch immer ein wesentliches Ziel verschiedener Forschergruppen. Dafür ist ein umfangreiches Wissen über die unterschiedliche Entwicklung der Blüten, welche die genetische Ausstattung haben, männliche und weibliche Sexualorgane auszuprägen (Caporali et al., 2003), von essenzieller Bedeutung. Ausgehend von der Tatsache, dass alle Blüten der Weinrebe zu Beginn ihrer Entwicklung die Fähigkeit zur Ausprägung beider geschlechtsspezifischen Organe besitzen, ist nicht nur der Aspekt der Geschlechtsbestimmung zum Reifungsbeginn ein interessanter Ansatzpunkt. Vielmehr ist es eine naheliegende Hypothese, dass die Ausprägung des jeweils anderen Sexualorgans in den getrenntgeschlechtlichen Blüten dauerhaft unterdrückt werden muss, bis über die fertige Blüte hinaus.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine umfangreiche Transkriptomanalyse der hermaphroditischen, männlichen und weiblichen Blüten am Ende der Blütenentwicklung, zu Beginn der Anthese, durchzuführen. Am Anfang steht eine umfassende Untersuchung der molekularen Abläufe in den geschlechtsspezifisch ausgeprägten Geweben. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Erstellung nahezu vollständiger Genexpressionsprofile mit Hilfe von Hochdurchsatzsequenzierungen der nächsten Generation (NGS). Durch die Analyse der Genexpression in allen geschlechtsspezifischen Geweben sollen potenzielle Gene identifiziert werden, die an der unterschiedlichen Ausprägung der Sexualorgane in den getrenntgeschlechtlichen Blüten von *V.s.* bzw. den hermaphroditischen Blüten von *V.v.* beteiligt sein könnten. Daraufhin sollen stichprobenartig die Ergebnisse, die mittels RNA-Seq-Analysen errechnet wurden, durch eine alternative Expressionsstudie (quantitativen Real-Time PCR) überprüft werden.

Ein zusätzlicher Aspekt dieser Arbeit ist die kritische Diskussion im Hinblick auf die Struktur der potenziell geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al., 2012 sowie die potenziellen Kandidatengene, die möglicherweise die Geschlechtsbestimmung beeinflussen.

2. Material und Methode

2.1 Pflanzenmaterial

Für die NGS-Sequenzierung wurde das Blütenmaterial durch die Mitarbeiter des Instituts für Rebenzüchtung der Hochschule Geisenheim unter Leitung von Prof. Dr. Rühl zur Verfügung gestellt. Es wurden sowohl hermaphroditische Blüten der Subspezies *Vitis vinifera* als auch männlichen und weiblichen Individuen der Subspezies *Vitis sylvestris* gesammelt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der später generierten Transkriptomdaten fand die Sammlung der Blüten am Vormittag nach Abfallen der Kalyptra und Entfaltung der gesamten Blütenorgane statt. Von jeder Subspezies wurden Blüten von jeweils drei Individuen einer Variante entnommen. Die Blüten wurden direkt nach der Entnahme auf dem Feld in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf Trockeneis lichtdicht nach Mainz transportiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Sowohl bei den ganzen Blüten als auch bei den Blüten für die Untersuchung der einzelnen Blütenorgane lag der Entnahmezeitpunkt zwischen 10 Uhr und 11 Uhr morgens. Alle biologischen Replikate wurden am selben Tag entnommen; es wurden möglichst nur Blüten im gleichen Entwicklungsstadium gesammelt.

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Individuen für die Blütenentnahme und den jeweiligen Entnahmezeitpunkt

Entnahmezeitpunkt	Subspezies	Sorte
Juni 2013	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i> ♂	Alba Z 5943
Juni 2013	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i> ♀	FR 5481
Juni 2013	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Weißer Heunisch
11. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i> ♂	Alba Z 5943
11. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i> ♀	FR 5420 J 24
04. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Weißer Heunisch

Des Weiteren wurden für die Isolierung von DNA und RNA andere Gewebearten herangezogen. Dabei handelte es sich vor allem um sehr junge Blätter verschiedener Subspezies, aber auch um Blütengescheine früherer Entwicklungsstadien. Diese wurden

ebenfalls mit Flüssigstickstoff behandelt und bei -80 °C gelagert. Alle gesammelten Proben sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Individuen für verschiedene Gewebe und den jeweiligen Entnahmezeitpunkt

Entnahmezeitpunkt	Subspezies	Sorte	Gewebe
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♂	La 2/3	Blatt
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♂	Alba Z 5943	Blatt
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♀	FR 5420 J 24	Blatt
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♀	FR 5481	Blatt
04. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♀	Ketsch Nr. 6	Blatt
04. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♀	Ketsch Nr. 34	Blatt
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Weißer Heunisch	Blatt
04. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Grüner Silvaner	Blatt
04. Juni 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Ruländer	Blatt
04. Juni 2014	<i>Vitis berlandieri</i> ♂		Blatt
04. Juni 2014	<i>Vitis berlandieri</i> ♀		Blatt
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♂	Alba Z 5943	Geschein
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>silvestris</i> ♀	FR 5481	Geschein
20. Mai 2014	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Weißer Heunisch	Geschein

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus den verschiedenen Geweben wurde mit dem innuPREP Plant DNA Kit der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) ausgeführt. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers. Jede DNA-Probe wurde am Ende in 50 µl HPLC-H₂O eluiert und bei 4 °C gelagert.

2.2.2 RNA-Isolierung

Die bei -80 °C gelagerten Weinblüten wurden für die Präparation der einzelnen Blütenorgane zunächst in einer Petrischale auf Trockeneis ausgebreitet und mit Hilfe eines sterilen Skalpells und einer sterilen Pinzette die jeweils gewünschten Blütenorgane isoliert. Bei den Blüten der männlichen Individuen wurden die Staubblätter, bei den weiblichen Blüten die Fruchtknoten zur weiteren Verwendung abgetrennt. Bei den Hermaphroditen wurden die Staubblätter von den Fruchtknoten getrennt und beide Organe weiterverwendet. Zum Schutz der RNA vor Degradation wurden die Proben während der Präparation wiederholt in einem Eppendorfgefäß in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die ganzen Blüten wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt. Für je 50 mg Blütenmaterial wurden 1 ml RNA-Extraktionspuffer sowie 2 Vol.-% β -Mercaptoethanol eingesetzt. Die Blüten wurden in dem Puffergemisch mittels eines Standbohrers auf Eis homogenisiert. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 65 °C für 10 min und ein Zentrifugationsschritt bei 3000 g und 4 °C für 3 min. Daraufhin wurden mehrere CI-Extraktionen mit darauffolgenden Zentrifugationsschritten für 15 min bei 3500 g durchgeführt, ebenfalls bei 4 °C. Die abschließende Fällung ist in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Nach der ersten Fällung und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgezogen, das Pellet in $\frac{3}{10}$ Vol. des Ausgangsvolumen TE-Puffer gelöst und 1 Vol. Isopropanol (2-Propanol, > 99,5%) hinzugegeben und invertiert. Danach folgte ein weiterer Inkubationsschritt für mindestens 1 h bei -20 °C. Im Anschluss wurde die Probe für 30 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der darauffolgende Waschschrift wurde wieder wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben vollzogen, die gewonnene Total-RNA in 50 μ l nukleasefreiem Wasser gelöst und auf -80 °C gelagert.

2.2.3 DNase-Verdau

Die in der gewonnenen RNA (siehe 2.2.2) befindlichen Reste genomischer DNA wurden mithilfe eines DNase I-Verdau entfernt. Hierzu wurde die RNA-haltige Lösung mit $\frac{1}{10}$ Vol. 10x Puffer und 1 μ l DNase I (2 U/ μ l, beides NEB, Ipswich, MA, USA) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden $\frac{1}{10}$ Vol. 50 mM EDTA (pH=8) hinzugegeben und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Daraufhin fand eine Fällung statt (siehe 2.2.5).

2.2.4 Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung bei RNA

Die Bestimmung der Qualität und Quantität der extrahierten Total-RNA wurde mithilfe des 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Für die Messung der RNA-Proben wurde das RNA 6000 Nano Kit, ebenfalls von Agilent Technologies, genutzt. Ein Maß für die Qualität ist der sogenannte RIN-Wert, ein Algorithmus, der das Verhältnis von 25 S rRNA zu 18 S rRNA angibt, was wiederum den Grad an Degradation zeigt. Er wird in einer Skala von 0 bis 10 ausgegeben. Alle Schritte bei der Durchführung der Messungen wurden nach Angaben des Herstellers getätigt. Die Auswertung und Visualisierung der Messwerte erfolgte mit der 2100 Expert Software der Firma Agilent Technologies.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung bei DNA

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels NanoDrop Spektralphotometer der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) bestimmt. Dabei wurden sowohl die Konzentration der DNA in Lösung in ng/µl gemessen als auch die Absorption bei Wellenlängen von 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) bzw. 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Durch den Quotienten von 260/ 280 nm wird der Reinheitsgrad der Lösung angegeben.

2.2.5 Alkoholfällung

Eine Fällung dient im Allgemeinen zur Aufkonzentration der isolierten Nukleinsäuren und zur Entfernung unerwünschter Substanzen wie Proteine oder überschüssige Salze. Bei Verwendung von DNA-Lösungen wurden in einem Volumen von mindestens 100 µl $\frac{1}{10}$ Vol. 10x Dialysepuffer sowie ein 2,5 faches Volumen eiskalten Ethanol (EtOH abs.) versetzt und die Proben für mindestens 45 min bei -20 °C inkubiert. Bei RNA-haltigen Lösungen wurden $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Natriumacetat (pH=5,2) sowie $\frac{6}{10}$ Vol. eiskalter Isopropanol (2-Propanol, > 99,5%) eingesetzt und für mindestens 45 min bei -20 °C inkubiert. Zum Pelletieren der Nukleinsäuren wurden die Proben dann für 45 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 g im Falle der DNA-Lösung bei Raumtemperatur, für die RNA-Lösungen wiederum bei 4 °C. Daraufhin wurde das getrocknete Pellet in einem geeigneten Volumen in HPLC-H₂O (DNA) bzw. in nukleasefreiem Wasser (RNA) gelöst.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.6.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Für die Größenauftrennung und Qualitätskontrolle der extrahierten Total-RNA wurde ein denaturierendes Agarosegel mit einer Prozentigkeit von 1,2 % Agarose in 1x MOPS-Puffer verwendet, welches mit 15 Vol.-% Formaldehyd versetzt wurde. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x MOPS-Puffer. Die Probenvorbereitung verlief wie folgt: 1 Vol. RNA-Lösung wurde mit 1 Vol. 2x RNA-Loading-Dye (Fermentas/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) versetzt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Die anschließende Gelelektrophorese (7 cm x 6,5 cm x 0,1 cm) wurde mithilfe der GENterphorese™-Gelkammern (GENterprise, Mainz, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden bei 20-30 mA für circa 30 min im elektrischen Feld laufen gelassen. Im Anschluss wurden die Gele bei einer Wellenlänge von 312 nm auf dem UV-Transilluminator betrachtet und mithilfe des Systems Carestream GelLogic 112 (Carestream, Health, Rochester, USA) dokumentiert.

2.2.6.2 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Größen von cDNA- oder DNA-Fragmenten wurde auf nicht-denaturierenden Agarosegelen mit einer Konzentration zwischen 0,8 und 2 % Agarose bestimmt. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer gelöst, der gleichzeitig auch als Laufpuffer eingesetzt wurde. Vor dem Auftragen wurden 5 µl der Probe mit 1 µl 6x Loading-Dye versetzt. Des Weiteren wurde zur Größenbestimmung 1 µl unterschiedlicher Molekulargewichtsmarker (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) aufgetragen. Die verschiedenen Marker sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

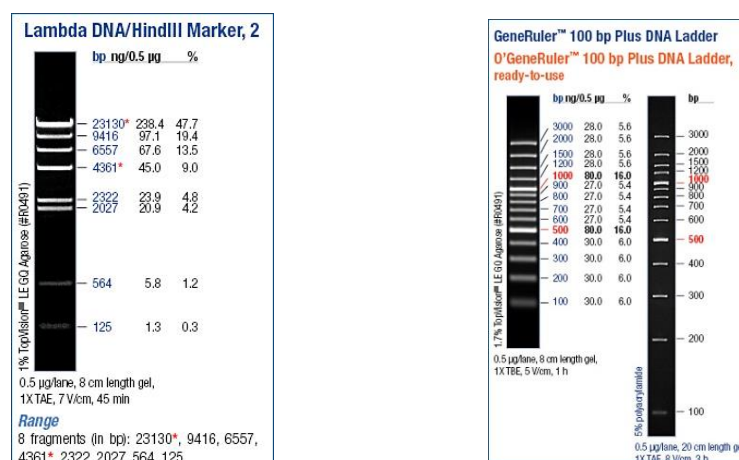


Abbildung 2.1: verwendete Molekulargewichtsmarker (http://www.thermoscientificbio.com/uploadedImages/Products/DNA_Electrophoresis/DNA_Ladders/)

Die Gelelektrophorese lief, ebenfalls in den GENTERphorese™-Gelkammer, bei 150 V und 130 mA für ca. 20 min. Anschließend wurden die Gele für etwa 2 min zum Anfärben der DNA in ein Ethidiumbromid (EtBr)-Färbelösung inkubiert, unter dem Transilluminator betrachtet und mit dem Carestream System dokumentiert (siehe 2.2.6.1).

2.2.7 cDNA-Synthese

Für weitere Versuche wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Sämtliche Synthesen wurden mit der SuperScript® III Reversen Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Es wurde eine Ausgangskonzentration von etwa 1 µg gewählt, alle verwendeten RNA-Proben hatten einen RIN-Wert von 7 und größer. Die Erststrangsynthese erfolgte mittels des Oligo(dT)₁₈-Primers (0,5 µg/µl). Der Protector RNase Inhibitor (40 U/µl) wurde nicht genutzt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Die Synthesen der jeweiligen cDNAs wurden mithilfe einer Intron-überspannenden PCR auf das Haushaltsgen GAPDH auf ihre Vollständigkeit und mögliche Rückstände genomischer DNA überprüft. Anschließend wurden für weitere Versuche 1:100-Verdünnungen mit HPLC-H₂O hergestellt und die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.7.1 qRT-PCR

Die Grundlage für die quantitative Real-Time-PCR bildeten isolierte Total-RNA aus verschiedenen Blütenorganen sowie aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*) als exogener Standard. Insgesamt wurden 350 ng Total-RNA für die Erststrangsynthese eingesetzt, wovon etwa 50 ng des externen Standards eingesetzt wurden. Nach Überprüfung auf eine vollständige Synthese und dem Ausschließen einer genomischen Verunreinigung mit den GAPDH-spezifischen, Intron-überspannenden Primern wurden sowohl eine 1:10, als auch eine 1:100-Verdünnung hergestellt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Polymerasekettenreaktion und Aufreinigung

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden jeweils spezifische Primer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nach Herstellerangaben mit HPLC-H₂O auf die entsprechenden Konzentrationen von 10 pmol/µl (10 µM) verdünnt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind im SI-Anhang in Tabelle 12 aufgelistet. Alle PCRs wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt Die GoTaq®DNA-Polymerase und die zugehörigen Reaktionspuffer

wurden von der Firma Promega (Madison, USA) hergestellt. Die genaue Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes in einem Volumen von 50 μl

Reagenz	Volumen
HPLC-H ₂ O	31,8 μl
5x Colorless GoTaq®Flexi Puffer	10 μl
MgCl ₂ (25mM)	4 μl
dNTPs (10mM)	1 μl
5'-Forward-Primer (10pM)	1 μl
3'-Reverse-Primer (10pM)	1 μl
GoTaq®DNA-Polymerase	0,2 μl (5 units/ μl)
Template	1 μl

Die PCR fand in einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) statt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 98 °C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 sec 98 °C Denaturierung, 30 sec zwischen 52 und 61 °C Primer-spezifischer Annealingtemperatur und 1 bis 2 min 72 °C Elongation. Der finale Elongationsschritt lief ebenfalls bei 72 °C für 10 min. Erfolgreich amplifizierte Fragmente wurden anschließend durch eine Behandlung mit 20 U Exonuklease I und 0,9 U Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) aufgereinigt.

2.2.8.1 *Inverse PCR*

Die Inverse PCR dient dazu, unbekannte Sequenzbereiche zu amplifizieren und zu analysieren. Voraussetzung ist ein kurzer bekannter Bereich in der zu untersuchenden Sequenz und eine Restriktionsschnittstelle, die statistisch nicht zu häufig ist (Abbildung 2.2, A). Die Lage der Restriktionsschnittstelle im unbekanntem Sequenzbereich kann nicht lokalisiert werden (Abbildung 2.2, B). Die Restriktion wurde in einem Volumen von 150 μl durchgeführt, welches sich aus 15 μl DNA-Template, der entsprechenden Menge an Restriktionsenzym-spezifischem Puffer und 1 μl Enzym zusammensetzt. Die Reaktion verlief für 2 Stunden bei den jeweiligen Temperaturoptima der verwendeten Enzyme. Anschließend wurden die Proben, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, gefällt und in 88 μl HPLC-H₂O gelöst.

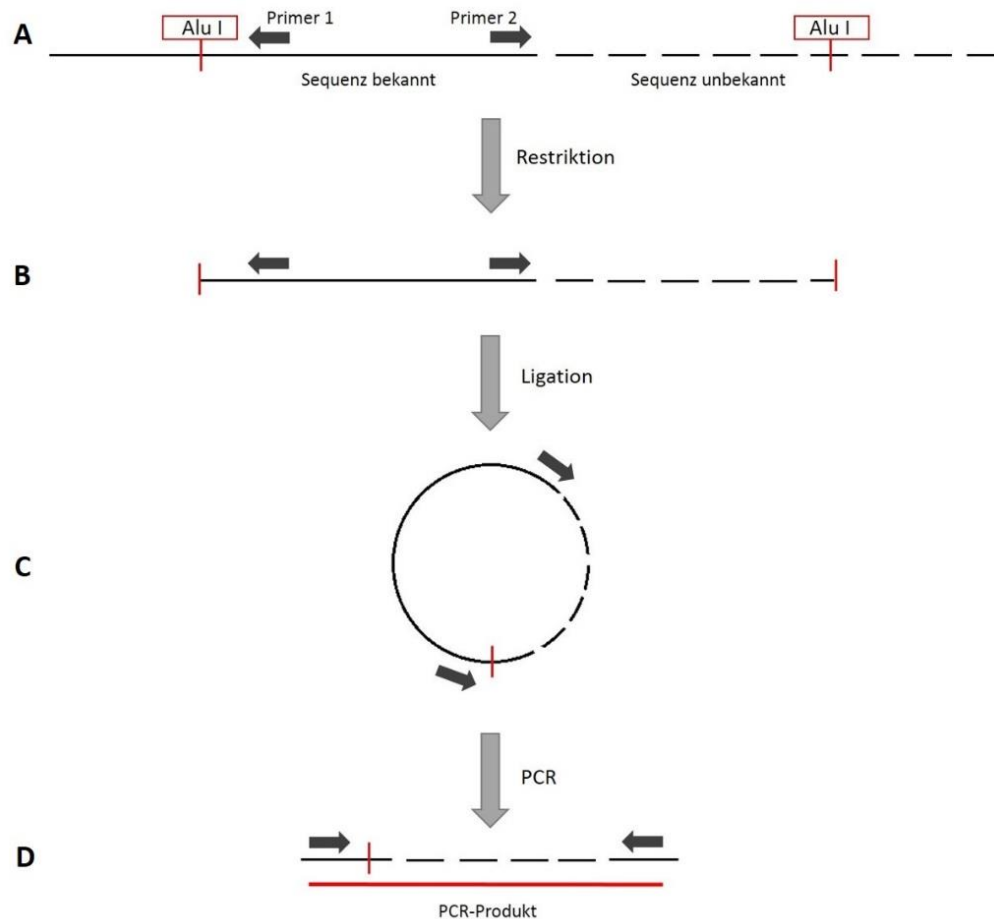


Abbildung 2.2: Ablauf einer Inversen PCR

A. Lage der beiden sequenzspezifischen Primer und der Restriktionsschnittstelle hier beispielhaft vom Restriktionsenzym Alu I im zu untersuchenden Restriktionsbereich. **B.** Sequenzbereich nach der Restriktion. **C.** Sequenzbereich nach einer monomolekularen Ligation an den Alu I-Schnittstellen. **D.** Entstehung des PCR-Produkts des unbekanntem Sequenzbereichs.

In Folge dessen wurde der restringierte Bereich ligiert (Abbildung 2.2, C). Die Reaktion verlief in einem Volumen von 100 μ l, bestehend aus 88 μ l Ligationsansatz, 2 μ l T4 DNA Ligase (5 U/ μ l) und 10 μ l 10x Ligasepuffer. Es folgte eine Inkubationsphase über Nacht bei Raumtemperatur. Die nachfolgende PCR erfolgte wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben. Das entstandene PCR beinhaltet somit einen unbekanntem Sequenzbereich (siehe Abbildung 2.2, D), der zur weiteren Analyse mittels Sanger-Sequenzierung (Abschnitt 2.2.12) aufgeschlüsselt wurde.

2.2.9 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Echtzeit (Real-Time)-PCR (qRT-PCR) wurde mithilfe des *Power SYBR® Green* PCR Master Mix der Firma Life Technologies (Carlsbad, CA; USA) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde im Gegensatz zur Standard-Polymerasekettenreaktion von 50 μ l

auf 10 µl verringert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2.4 aufgeführt. Das cDNA-Template enthielt sowohl cDNA aus *Vitis vinifera* als auch aus *Danio rerio* als exogener Standard (vgl. 2.2.7.1). Die genspezifischen Primer wurden, wenn möglich, Intron-überspannend gelegt. Dabei lag der Reverse-Primer meistens im 3'UTR. Eine Liste aller verwendeten Primer ist in der SI-Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer qRT-PCR pro Probe

Komponenten	Volumen
2x Power SYBR® Green PCR MM	5 µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	0,3 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0,3 µl
HPLC-H ₂ O	3,4 µl
cDNA-Template	1 µl

Es wurde jeweils ein Mastermix pro gemessenes Gen erstellt und dazu entsprechend mindestens zwei No Template Kontrollen (NTC) als Negativkontrolle angesetzt. Die quantitative PCR wurde in technischen Triplikaten sowie in biologischen Duplikaten und Triplikaten in einer 96-Well-Platte (96 Well PCR Platte, "Fast" Typ, Biozym®) gemessen. Die Platten wurden mittels der optischen Folien Adhesive Clear qPCR Sheels der Fa. Biozym® (Hessisch Oldendorf, Deutschland) versiegelt. Während der Durchführung des Programms (siehe

Tabelle 2.5) wurde die Fluoreszenzintensität am Ende jedes Elongationszyklus detektiert. Des Weiteren folgte direkt im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse mit jeweils zwei Denaturierungs- und zwei Annealingphasen. Diese erlaubt es, eine mögliche unspezifische Produktbildung auszuschließen. Für die PCR kam das Software Instrument Type 'Applied Biosystems 7500/ 7500 Fast Real-Time PCR System' zur Anwendung, bei dem verwendeten Assay handelte es sich um die $\Delta\Delta C_t$ (Plate)-Methode.

Tabelle 2.5: Ablauf der quantitativen Real-Time PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Hot-Start Denaturierung	95 °C	10 min	/
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	61 °C	30 sec	50
Elongation	72 °C	30 sec	
Denaturierung	95 °C	15 sec	/
Annealing	60 °C	1 min	/
Denaturierung	95 °C	15 sec	/
Annealing	60 °C	15 sec	/

2.2.9.1 Auswertung quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR ermöglicht eine genaue Bestimmung von Transkriptmengen und dadurch eine Aussage über die Expression verschiedener Gene. Die hier angewandte Methode ist für den Nachweis von Produktmengen der PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green aufgrund ihrer Sensitivität gut geeignet, zeigt aber auch eine geringe Genspezifität, da sich SYBR-Green allgemein in die große Furche doppelsträngiger DNA einlagert. Es besteht auch das Risiko, dass es sich weiterhin an Primerdimeren oder anderen Produkte, welche bei der PCR entstehen können, anlagert (Holzapfel & Wickert, 2007). Eine Möglichkeit, unspezifische Genprodukte zu erkennen, ist zum einen eine Gelelektrophorese, zum anderen eine Schmelzkurvenanalyse. Bei dieser können nicht erwünschte Produkte durch das Auftreten mehrerer Peaks unterschiedlicher Länge identifiziert werden, wohingegen sich ein spezifisches Produkt durch nur einen Peak auszeichnet (siehe Abbildung 2.3).

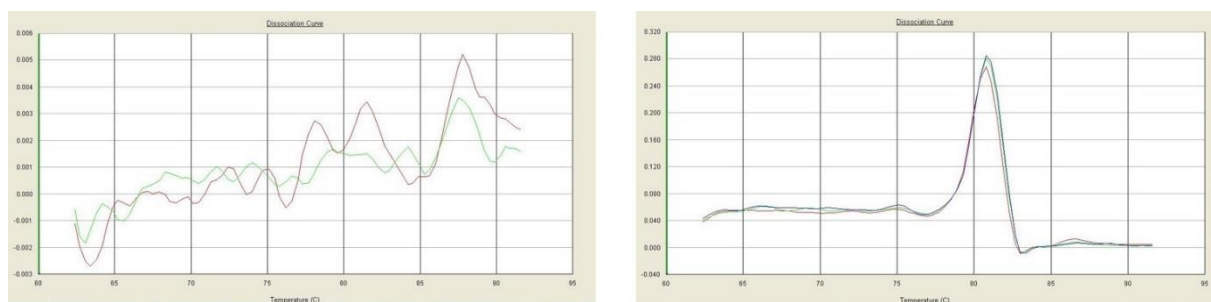


Abbildung 2.3: Dissoziationskurven eines unspezifischen Genprodukts (links) sowie eines spezifischen Genprodukts (rechts) aus der qRT-PCR

Die Auswertung der Amplifikationskurven erfolgte mit dem Programm 'Applied Biosystem 7500 Fast Systems SDS Software' ('Life Technologies', Carlsbad, USA) und mithilfe des Assays $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Study). Dabei wurden in der semilogarithmischen Ansicht der „*threshold*“ (Schwellenwert) sowie in der linearen Ansicht die „*baseline*“ (Basislinie) gesetzt. Der „*threshold*“ gibt den Wert an, an dem die Replikate die geringste Abweichung voneinander haben und sollte kleiner als 0,2 sein. Dadurch ergibt sich auch der jeweilige Ct-Wert, wie die Abbildung 2.4 zeigt.



Abbildung 2.4: Amplifikationskurve eines technischen Triplikats in der semilogarithmischen Ansicht. Eingezeichnet ist der „*threshold*“ mit einem Wert von 0,2 und dem dadurch entstandenen Ct-Wert bei ungefähr 22 Zyklen.

Die „*baseline*“ gibt den Bereich an, in dem keine Detektion stattgefunden hat bzw. in dem es sich bei den Signalen nur um Hintergrundrauschen handelt. Sie liegt im Normalfall zwischen Zyklus 3 und 15.

Zur Berechnung der Genexpression nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) wurde jeweils ein Mittelwert aus den Ct-Werten der drei technischen Replikate sowohl der Gene als auch des exogenen Standards gebildet und die Mittelwerte der Gene auf den exogenen Standard, der in jeder Probe in gleicher Menge eingesetzt wurde, normiert (siehe Formel 1). Somit wurde eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gesichert. Gab es sowohl bei den

technischen als auch bei den biologischen Replikaten Werte mit großer Abweichung, wurden diese bei der Berechnung der Mittelwerte nicht berücksichtigt.

$$\Delta Ct (\text{Zielgen}) = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Exogene Kontrolle}) \quad (1)$$

Die unterschiedliche Expression der untersuchten Gene in Bezug auf ein Zielgen oder einen Kalibrator wurde mithilfe des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes angegeben. Dieser errechnet sich wie folgt:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Zielgen}) - \Delta Ct (\text{Kalibrator}) \quad (2)$$

Zur besseren Darstellung der Expression wurde mit Formel 2 die n-fache Transkriptmenge A der jeweiligen Gene berechnet

$$A = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} \quad (3)$$

Erhält man einen Wert <1 , so ist das Gen im Vergleich zum Kalibrator unterexprimiert, ist der Wert >1 , ist das Gen im Vergleich zum Kalibrator höher exprimiert. Liegt der Wert bei 1, handelt es sich um eine gleich starke Expression.

2.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung wurden Konzentrationen von 50 -100 ng der amplifizierten PCR-Produkte (2.2.8) eingesetzt und in 10 μ l-Ansätzen mit 5ng des Vektorsystems pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, USA) ligiert. Die Vektorkarte ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Zur Ligation wurde die T4 DNA-Ligase (5 U/ μ l) der FA. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag zur Aufreinigung gefällt (siehe 2.2.5). 3 μ l des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in elektrokompente Zellen des Bakterienstammes DH10B eingesetzt, für 30-45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 200-300 μ l des Transformationsansatzes auf Agarplatten ausgestrichen (37 °C, über Nacht). Die Agarplatten enthalten Ampicillin, X-Gal und IPTG. Vermutlich rekombinante Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37 °C in 5 ml L-Medium, welches 50 μ l Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml) enthielt, angezchtet.

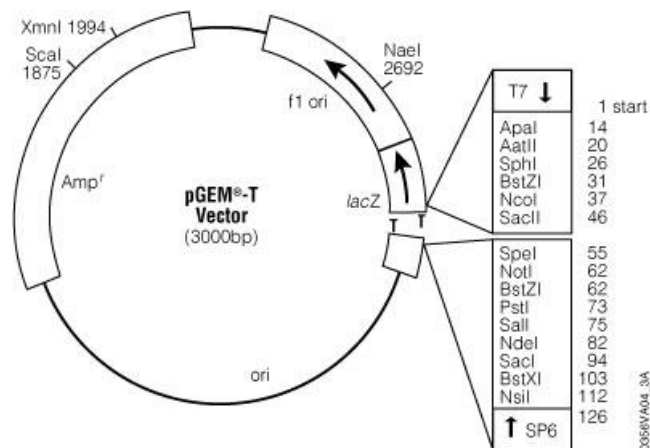


Abbildung 2.5: Vektorkarte des pGem®-T easy (http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cloning/~Media/Images/Resources/PAGuide/0356VA04_3A.ashx)

2.2.11 Plasmid-Präparation

Die Plasmide wurden aus den über Nacht angezüchteten rekombinanten Kolonien mittels des GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) isoliert. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben. Die isolierte Plasmid-DNA wurden 50 µl HPLC-H₂O eluiert.

2.2.12 Sanger-Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse der aufgereinigten PCR-Fragmente (2.2.8) aus cDNA oder DNA, sowie der isolierten Plasmid-DNA (2.2.9) wurde jeweils 50-100 ng DNA eingesetzt und mithilfe der Sequenzieretechnik nach Sanger untersucht. Des Weiteren kamen genspezifischen Primer oder, im Falle der Plasmide, die vektorspezifischen Sp6- oder T7-Primer zur Anwendung. Alle Sequenzierungen übernahm die Firma StarSEQ (Mainz, Deutschland).

2.3 Next-Generation Sequencing

Die Hochdurchsatzsequenzierung erfolgte für Fruchtknotengewebe weiblicher Blüten, Staubblätter männlicher Blüten der Subspezies *Vitis sylvestris* und sowohl Fruchtknoten als auch Staubblätter aus den hermaphroditischen Blüten aus *Vitis vinifera*. Die cDNA-Bibliotheken für eine 100 bp „paired-end“-Sequenzierung im IMSB (Mainz, Deutschland) auf dem Hiseq 2000/2500 der Firma Illumina (San Diego, CA, USA) wurden mithilfe des Illumina

True Seq RNA Sample Prep Kit v2 gemäß den Herstellerangaben von der Firma GENterprise (Mainz, Deutschland) hergestellt. Zur Datenkonvertierung wurden für die Datensätze der Blütenorgane (710-713, 2014) die Pipeline v 1.8.4 genutzt. Dabei wurde ein ASCII offset von 33 angewandt (Zhou & Rokas, 2014)

2.3.1 Verarbeitung der Daten

Die Rohdaten wurden mithilfe eines Skriptes sowohl einem Adapter- als auch einem Qualitätstrimming unterzogen (siehe Tabelle 2.6). Das Skript wurde 2014 von der NGS Core Facility des IMSB (Mainz, Deutschland) entwickelt.

Tabelle 2.6: Parameter des angewendeten Trimming-Skripts

	Datensatz 710-713
Adaptertrimming	bis auf die letzte Base
Trimming 5'-Ende	/
Trimming 3'_Ende	/
Anzahl Ns	keine
Quality Cutoff	Phred \geq 20

Zur Datenverarbeitung wurde weitestgehend die CLC Genomics Workbench (Version 6.5.1) der Firma CLC Bio/ Qiagen (Venlo, Niederlande) verwendet. Dazu wurde die „paired-end“-Entfernung von 50-500 bp (Datensätze Blütenorgane) angenommen. Anschließend wurden überlappende „reads“ ohne Veränderung der Standardeinstellungen durch die Funktion „merge overlapping pairs“ zusammengefasst. Durch die teilweise verlängerten Sequenzen können somit große Transkripte besser detektiert werden als mit kürzeren Sequenzen. Für alle weiteren Analysen wurden sowohl die zusammengeführten als auch die nicht zusammengeführten „reads“ verwendet.

2.4 Bioinformatische Methoden

2.4.1 „large gap read mapping“

Zur Darstellung und Annotation neuer Genstrukturen sowie zur Korrektur von bereits vorhandenen Annotationen wurden sowohl die NGS-Daten als auch cDNA-Sequenzen aus Sanger-Sequenzierungen gegen eine genomische Referenz kartiert. Dabei können durch RNA-

Daten ganze Genbereiche abgedeckt werden, indem Intron-überspannende Lücken aufgrund fehlender Sequenzinformation eingeführt werden. Dabei wurden größtenteils die voreingestellten Parameter verwendet. Nur die „*similarity*“ sowie die „*length fraction*“ wurden mit einem Wert 0,99 verwendet, um eine höhere Stringenz zu erzielen.

2.4.2 RNA-Seq

Mithilfe der RNA-Seq wird ein vollständiges Expressionsprofil der transkribierten Gene geliefert. Dabei wird ein „*mapping*“ gegen alle annotierten Gene des Referenzgenoms von Pinot Noir PN40024 12x, Version 0 (Jaillon et al., 2007) durchgeführt. Es wurde ein minimaler Längen- und Identitätsanteil von je 99 % angenommen und gebrochene „*paired-end reads*“ ebenfalls verwendet.

2.4.3 Analyse der differentiellen Genexpression

Für die vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen Staubblätter und Fruchtknoten sowohl der getrenntgeschlechtlichen Individuen von *Vitis sylvestris* (711 vs. 712) als auch der hermaphroditischen Blüten aus *Vitis vinifera* (710 vs. 713) wurde die absolute Genexpression anhand eindeutiger Sequenzen („*unique exon reads*“) quantifiziert. Für die weitere Auswertung der Expressionswerte in Excel wurden diese auf 1.000.000 „*reads*“ normalisiert, um die unterschiedlichen Größen der Datensätze anzupassen.

Für die Analyse der differentiell exprimierten Gene (DEG) in den beiden Vergleichen wurden die Informationen über die „*experiment range*“ (original und normalisiert), über die Expressionswerte (original und normalisiert) sowie über die eindeutigen Exontreffer („*exon matches*“) jeder Gruppe genutzt. Es wurden zum einem die maximale Anzahl der Treffer, zum anderen, für eine bessere Darstellung, der \log_2 „*fold change*“ für jedes Gen berechnet. Dieser wurde mit den Werten 15 bzw. -15 limitiert.

Als differentiell exprimierte Gene gelten alle Gene, die mindestens 200 Exontreffer zeigen und einen \log_2 „*fold change*“ von größer 5 bzw. kleiner -5 haben. Alle anderen Gene werden als gleich exprimiert angesehen und entfallen für eine Auswertung der differentiell exprimierten Gene.

2.4.4 Analyse der Sanger-Sequenzierungen

Zur visuellen Analyse wurden die Sequenzen in einem Chromatogramm mit dem Programm FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, USA) dargestellt. Bei Ergebnissen aus Direktsequenzierungen wurden die Sequenzen am Anfang und am Ende einem qualitativen Trimming unterzogen. Bei der Auswertung der Sequenzen aus Klonierungsexperimenten wurde zur Identifizierung der Vektorsequenz das Tool VecScreen des National Center for Biotechnology Information (NCBI) eingesetzt, um anschließend Vektorsequenzen zu entfernen.

2.4.5 „open reading frame“- (ORF) Suche

Zur Identifikation neuer, möglicher kodierender Bereiche wurden mithilfe des Open Reading Frame-Tools der CLC Main Workbench 7 offene Leserahmen gesucht. Die Suchkriterien beinhalteten Leserahmen von einer Länge von mindestens 120 Nukleotiden ab jedem möglichen Startkodon auf beiden Strängen. Des Weiteren sollen die Annotationen auch Stoppkodons beinhalten. Die potenzielle Bereiche wurden die Mittels BLASTx-Suche (Altschul et al., 1990) auf ihre Eigenschaft und Funktion hin untersucht.

2.4.6 Blast2GO

Zur genaueren Charakterisierung der DEGs aus Abschnitt 2.4.3 wurden die entsprechenden Gen-IDs in das Programm Blast2GO importiert. Blast2Go ermöglicht eine Einordnung von Genen in sogenannte GOs. Dabei erfolgt die Einordnung anhand von BLAST-Treffern in biologische Prozesse, molekulare Funktionen und zelluläre Kompartimente. Für signifikante Treffer wurde ein E-Value von $1.0 \cdot 10^{-3}$ als Grenzwert angegeben. Ein InterPro Scan führt aufgrund von Informationen über vorhandene Domänen eine weitere Datenbanksuche durch.

2.5 Lösungen und Puffer

10x Dialysepuffer

3 M Natriumchlorid, 0,25 M TRIS, 0,1 M Na₂EDTA in VE-Wasser pH 7,6

10x E-Puffer

0,36 M TRIS, 0,3 M Natriumhydrogenphosphat, 0,1 M EDTA in VE-Wasser

10x MOPS

0,2 M 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure, 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA in DEPC-Wasser

10x TBE

0,89 M TRIS, 0,02 M EDTA, 0,89 M Borsäure in VE-Wasser

Agarplatten

1,5 % (w/v) LB-Medium, 1 % Ampicillin-Stammlösung, 0,1 % X-Gal-Stammlösung, 0,1 % IPTG-Stammlösung

Ampicillin-Stammlösung

10 mg/ml Ampicillin in HPLC-Wasser

CI

Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)

DEPC-Wasser

0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) in VE-Wasser

DNA-Ladepuffer

30 % (w/v) Saccharose, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in VE-Wasser

Ethidiumbromid-Stammlösung

0,5 % (w/v) Ethidiumbromid in 1x E-Puffer

Ethidiumbromid-Färbelösung

0,1 % (v/v) Ethidiumbromid-Stammlösung in 1x E-Puffer

IPTG-Stammlösung

46,7 mg/ml IPTG in DMF

LB-Medium

2 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Natriumchlorid in VE-Wasser

Natriumacetat-Lösung (pH 5,2)

3 M Natriumacetat-Trihydrat in VE-Wasser

RNA-Extraktionspuffer

300 mM Tris HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 2 M Natriumchlorid, 2 % (w/v) CTAB,
2 % (w/v) PVPP, 0,05 % (w/v) Spermidin Trihydrochlorid,
2 % (v/v) β -Mercaptoethanol

TE-Puffer

10 mM TRIS, 1 mM EDTA in VE-Wasser (pH 7,5)

X-Gal-Stammlösung

100 mg/ml X-Gal in DM

3. Ergebnisse

3.1 RNA-Isolierung aus Weinblüten

Für die Analyse der Expressionsprofile wurde aus den Sexualorganen der getrenntgeschlechtlichen und hermaphroditischen Blüten der jeweiligen Subspezies Total-RNA isoliert, für weiterführende Experimente Total-RNA aus den ganzen Blüten. Diese wurde auf einem denaturierenden Gel und ebenso auf dem 2100 Bioanalyser der Firma Agilent auf ihre Quantität und Qualität hin getestet (siehe 2.2.6.1 und 2.2.4.1). Für die Illumina-Sequenzierung wurden nur Proben mit einem RIN-Wert von 7 oder höher verwendet. Die folgende Abbildung (Abbildung 3.1) zeigt exemplarisch für alle Proben ein denaturierendes Gel (A) sowie ein Elektropherogramm des Bioanalyzers (B). Man erkennt zwischen 25 und 30 „Sekunden“ (s) mehrere kleinere Peaks, die eine Mischung von kleinen RNAs (Small RNAs) repräsentieren. Dabei handelt es sich um 5 S, 5.8 S rRNA und tRNA (Agilent, n.d.). Das Programm 2100 Expert Software der Firma Agilent Technologies, welches zur Berechnung und Auswertung der Daten verwendet wurde, markiert den Peak zwischen 45 und 50 „Sekunden“ bei allen eukaryotischen RNAs als 28 S rRNA. Allerdings besitzen Pflanzen eine 25 S rRNA in den zytoplasmatischen Ribosomen (Rogers & Bendich, 1987).

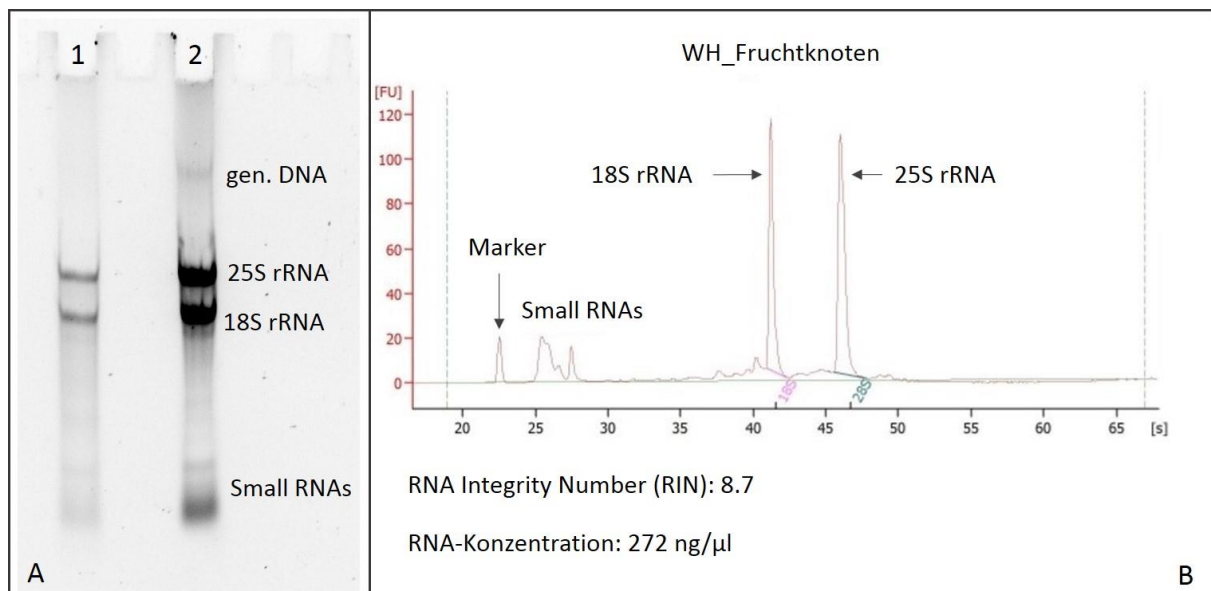


Abbildung 3.1: Ergebnisse der RNA-Isolierung

A Isolierte Total-RNA auf einem denaturierenden Agarose-Gel (1,2 % Agarose). Spur 1 zeigt die Total-RNA der Staubblätter aus *Vitis vinifera* var. Weißer Heunisch. Spur 2 zeigt die Total-RNA der Fruchtknoten aus *Vitis vinifera* var. Weißer Heunisch. **B** Elektropherogramm mittels Bioanalyzers von der Total-RNA der Fruchtknoten aus *V.v.* var Weißer Heunisch.

Für die Library-Herstellung wurde von allen vier Blüten-RNAs eine Menge von mindestens 1 µg der Total-RNA eingesetzt.

3.2 Genexpressionsanalyse mittels Illumina-Sequenzierung

Während der Analyse wurden die von der Firma Genterprise hergestellten cDNA-Libraries auf dem Illumina HiSeq2000/2500 in einem 100 bp „paired-end“ Lauf sequenziert. Dabei wurde für jede Art von Blütenorganen jeweils ein Transkriptomdatensatz erzeugt (siehe Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2). Die „reads“ hatten als Rohdaten eine Länge von 101 bp. Der Staubblatt-Datensatz aus dem männlichen Individuum (711) stellt mit 5,6 Gigabasen (Gb) in den Rohdaten den größten der vier Datensätze dar, der Staubblatt-Datensatz aus den hermaphroditischen Blüten (710) mit 4,6 Gb den kleinsten. Die beiden Fruchtknoten-Datensätze sind mit 5,1 Gb (712) bzw. 5,2 Gb (713) ähnlich groß.

Tabelle 3.1: Übersicht der Rohdaten der vier entstandenen Datensätze mit der jeweiligen totalen Sequenzanzahl (Anzahl der „reads“) und totalen Basenzahl

Datensatz	Blütenorgan	Anzahl der „reads“	Anzahl der Basen
710	Hermaphrodite Staubblatt	46.025.734	4.648.599.134
711	Male Staubblatt	56.293.494	5.685.642.894
712	Female Fruchtknoten	51.176.056	5.168.781.656
713	Hermaphrodite Fruchtknoten	51.616.296	5.213.245.896

Tabelle 3.2: Übersicht der getrimmten Daten der vier entstandenen Datensätze mit der jeweiligen totalen Sequenzanzahl (Anzahl der „reads“) und totalen Basenzahl

Datensatz	Blütenorgan	Anzahl der „reads“	Anzahl der Basen
710	Hermaphrodite Staubblatt	43.498.870	4.175.508.999
711	Male Staubblatt	53.210.562	5.105.118.096
712	Female Fruchtknoten	48.339.399	4.639.963.159
713	Hermaphrodite Fruchtknoten	49.013.728	4.713.766.322

Der durchschnittliche GC-Gehalt der meisten Sequenzen liegt nach dem Qualitätstrimming zwischen 45 und 50%. Die „reads“ besitzen PHRED-Scores zwischen 25 und 39, so dass man von einer guten Qualität ausgehen kann.

Bei den durchgeführten Sequenzierungen handelte es sich jeweils um 100 bp „paired-end“ Sequenzierungen, welche Fragmente mit einer Länge bis zu 100 Basen hervorbringen. Somit entstehen, gemessen an den Ergebnissen von z.B. Sanger-Sequenzierungen, relativ kurze Fragmente, die meist nicht einmal die durchschnittliche Länge eines Exons von 130 bp im Wein abdecken (Jaillon et al., 2007). Das anschließende „merging“ (vgl. 2.3.1) führt zu einer besseren Abdeckung von Genen, zum anderen steigert es die Qualität der Sequenzen, da diese oft zu den Enden hin abfällt. Mögliche Spleißvarianten können mit längeren Sequenzen ebenfalls besser detektiert werden. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des „merging“ für jeden Datensatz zusammengefasst. Verwendet wurden nur die „paired-end reads“ der jeweiligen Datensätze.

Tabelle 3.3: Prozentzahl an „merged reads“ für jeden Datensatz

Datensatz	„merged reads“ [%]
710 Hermaphrodite Staubblatt	66,34
711 Male Staubblatt	66,68
712 Female Fruchtknoten	66,3
713 Hermaphrodite Fruchtknoten	69,31

Die neuen Fragmente erzielen nach dem „merging“ eine Länge von bis zu 190 bp. Sie sind somit fast doppelt so lang wie die Ausgangslänge. Im Durchschnitt wurden zwischen 65 und 70 % der Sequenzen zusammengeführt.

3.3 Globale Transkriptomanalyse

Um ein umfassendes Bild der Blütentranskriptome zu erhalten und somit mögliche Rückschlüsse auf Gene, die bei der Geschlechtsrealisierung in den Hermaphroditen von *V.v.* im Vergleich zu den männlichen und weiblichen Individuen von *V.s.* eine Rolle spielen, ziehen zu können, wurden umfangreiche Analysen der NGS-Daten durchgeführt. Es wurde in erster Linie darauf geachtet, mit verschiedenen Methoden den höchst möglichen Erhalt an Information zu gewährleisten. Für die Genexpressionsanalysen wurden die prozessierten Daten gegen die annotierten Genbereiche des Referenzgenoms PN40024 (Jaillon et al., 2007) mithilfe des Tools RNA-Seq des Programms CLC Genomics Workbench kartiert. Dabei wurden insgesamt 26.345 Transkripte identifiziert.

3.3.1 Vergleich der Expressionsprofile aller Datensätze

Für eine bessere Gegenüberstellung aller exprimierten Gene in den verschiedenen Geschlechtern und Organen wurde mithilfe der CLC Genomics Workbench eine „heatmap“ erstellt (Abbildung 3.2). Hierfür wird die Ähnlichkeit der zu vergleichenden Expressionsprofile durch eine Art Stammbaum illustriert. Die Stärke der Expression wird mithilfe einer Farbkodierung verdeutlicht. Abbildung 3.2 zeigt die Stärke der Expression für jedes Gen, welches in der RNA-Seq detektiert worden ist. Dabei stellen blauen Bereiche eine niedrige Expression dar, rote Bereiche eine hohe. Durch die Farbverteilung ist zu erkennen, dass nur ein geringer Teil der Gene in allen vier Geweben stark exprimiert ist. Der Anteil an blauer Farbe überwiegt deutlich.

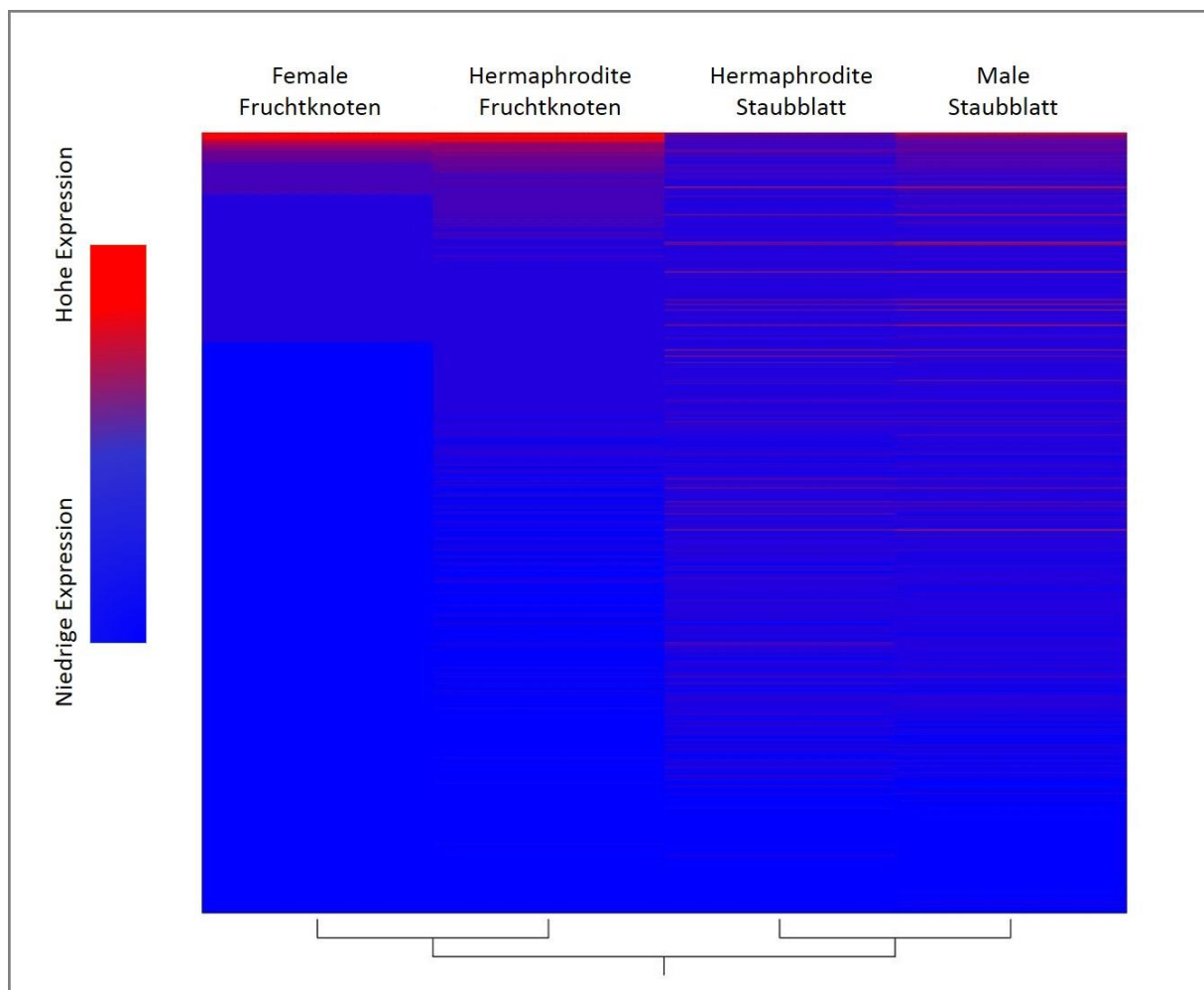


Abbildung 3.2: „heatmap“ aller Expressionsprofile der Illumina-Datensätze

Die Gewebe der beiden Fruchtknotendatensätze sind sich relativ ähnlich. Der Fruchtknoten aus der Kulturrebe (Hermaphrodite) enthält jedoch eine größere Anzahl an höher exprimierten Genen als die Fruchtknoten der Wilden Reben (Female_Fruchtknoten). Dies ist

am längeren, sich nach unten ziehenden roten Farbverlauf zu erkennen. Die beiden Datensätze aus den verschiedenen Staubblattgeweben hingegen zeigen ein sehr ähnliches Expressionsprofil, im direkten Vergleich weist der Datensatz aus der Wilden Rebe (Male_Staubblatt) bei einigen Genen die höhere Expression auf.

3.3.2 Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern männlicher Blüten aus *Vitis sylvestris*

Die Betrachtung der 100 höchst exprimierten Gene ermöglicht eine allgemeine Einschätzung über die transkriptionelle Aktivität des Gewebes und darüber, in welchen biologischen Prozessen die exprimierten Gene involviert sind. Die Ermittlung der Expressionsstärke erfolgte über die Aufsummierung der einzelnen Sequenzen, welche eindeutig für die Exons der entsprechenden Gene gezählt wurden („*unique exon reads*“). Für eine bessere Vergleichbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Datensatzgröße wurden die Expressionswerte, wie später auch für die Auswertung der differentiellen Genexpression, normalisiert (siehe 2.4.3). Die funktionelle Annotation und Einteilung in entsprechende GO-Gruppe („*terms*“) wurden mithilfe des Online-Tools agriGO (Du et al., 2010) durchgeführt. Ein Gen kann hierbei mehreren Ontologien zugeordnet werden. Eine Reduzierung redundanter Gruppen und eine anschließende Visualisierung durch eine sogenannte Treemap erfolgte mit dem Online-Tool REVIGO (Supek et al., 2011). In Abbildung 3.3 ist die Treemap für die 100 am stärksten exprimierten Gene des Staubblattgewebes des männlichen Individuums aus der Wilden Weinrebe dargestellt. Dabei hat das Gen GSVIVG01036525001, kodierend für eine GDSL Esterase/Lipase, die stärkste Expression mit einem Expressionswert (EW) von 16.751,19. Diese lipolytischen Enzyme haben multiple Eigenschaften (Chepyshko et al., 2012). Eine vollständige Auflistung der Gene findet sich im SI-Anhang in Tabelle 1.

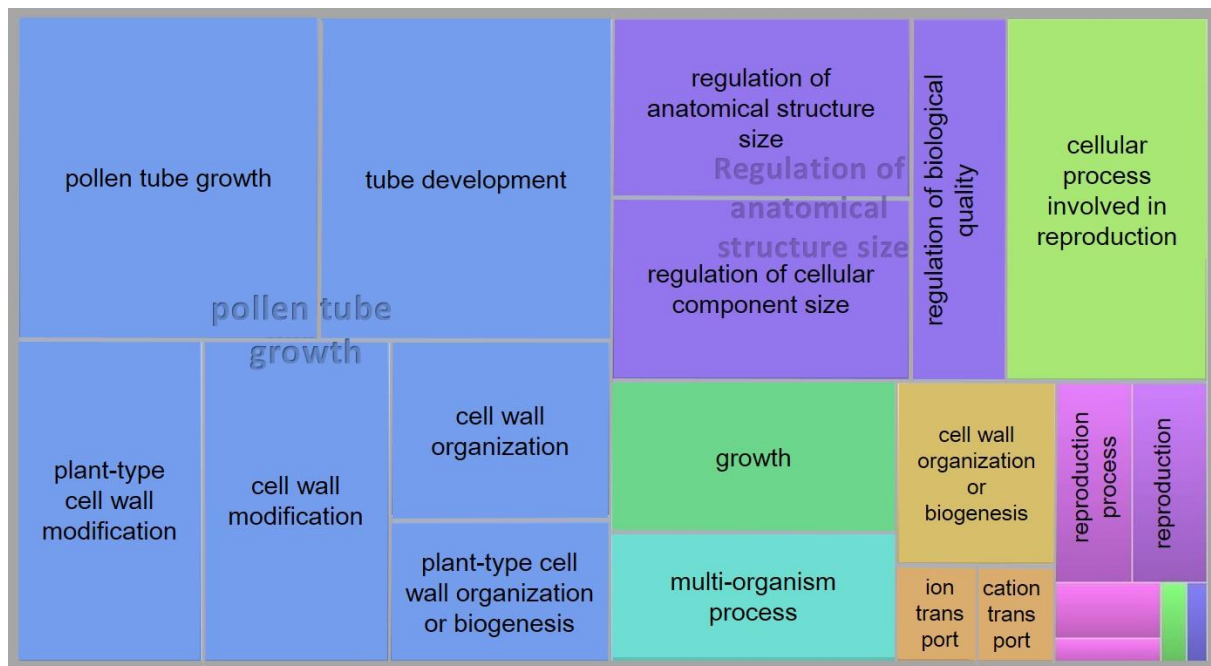


Abbildung 3.3: REVIGO-Treemap der „GO-Term“-Analyse des Staubblattgewebes des männlichen Individuums aus *Vitis sylvestris*

Die Treemap stellt von der Funktion her ähnliche „GO-Terms“ gruppiert und in gleicher Farbe dar. Basierend auf dem log10 des p-Values der Anreicherung ist die Größe der Rechtecke gewählt. Je größer diese sind, desto signifikanter ist die Anreicherung.

Von den 100 Genen konnten insgesamt 66 in eine oder mehrere GO-Gruppen eingeordnet werden. Bei den 34 Genen ohne GO-Zuordnung handelt es sich überwiegend um Gene mit unbekanntem Proteinprodukt, aber auch einige proteinkodierende Gene. Darunter finden sich einige Ionen- oder Zuckertransporter, verschiedene hydrolysierende Enzyme, welche an der Zellwandsynthese beteiligt sind und diverse Rezeptorkinasen. Bei der Einteilung der Gene werden funktionell zusammengehörige Gruppen in größere Bereichen zusammengefasst. Die meisten dieser Gene stehen in Zusammenhang mit dem Überbegriff „Wachstum des Pollenschlauchs“ („*pollen tube growth*“). Ein weiterer signifikanter Bereich ist „*regulation of anatomical structure size*“. Hier werden Gene eingeordnet, die einen Einfluss auf das Wachstum und die Größe jeglicher anatomischen Struktur haben. Unter anderem sind noch die Gruppen „Wachstum“ („*growth*“), „Zelluläre Prozesse involviert in Fortpflanzung“ („*cellular process involved in reproduction*“), „Zellwandorganisation“ („*cell wall organization or biogenesis*“) sowie „Kationentransport“ signifikant erhöht. Weiterhin sind einige Gene Vorgängen der Reproduktion zugeordnet worden („*reproduction process*“ und „*reproduction*“).

Im Vergleich mit den 100 am stärksten exprimierten Genen des Staubblattgewebes der Hermaphroditen konnten 74 Gene identifiziert werden, die in beiden Datensätzen vorhanden

sind. Unter den 26, welche nur im Gewebe des männlichen Individuums gefunden wurden, sind vor allem zwei Gene von Interesse (GSVIVG01026806001 und GSVIVG01023740001). Es handelt sich um kodierende Gene für die Proteine ECERIFERUM 1 mit einem Expressionswert (EW) von 2320,66 und ECERIFERUM 3 (EW 2278,41), also Aldehyd-Decarboxylasen, welche Aldehyde in Alkane umwandeln. Diese sind in *Arabidopsis thaliana* an der epikulären Wachssynthese des Pollenmantels beteiligt und haben einen allgemeinen Einfluss auf die Pollenfertilität (Aarts et al., 1995). Hinsichtlich der absoluten Expression befinden sich die Gene mit einem EW von 856,44 auf Platz 177 im Falle von ECERIFERUM 1 bzw. auf Platz 106 (EW 1312,73) für ECERIFERUM 3 im Datensatz der hermaphroditischen Staubblätter.

3.3.3 Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten weiblicher Blüten aus *Vitis sylvestris*

Die 100 am stärksten exprimierten Gene (siehe SI-Tabelle 2), von denen 63 funktionellen Gruppe zugeordnet werden konnten, zeigen eine grundlegend verschiedene GO-Annotation gegenüber der Annotation der Staubblätter (siehe Abbildung 3.4). Der höchste Expressionswert (Gen GSVIVG01034174001) liegt hier bei 6769,24. Dieses Gen kodiert für ein Metallothionein. In diesem Gewebe sind viele Gene exprimiert, die dem funktionellen Bereich „Translation“ zuzuordnen sind, wie z.B. dem allgemeinen Proteinstoffwechsel.

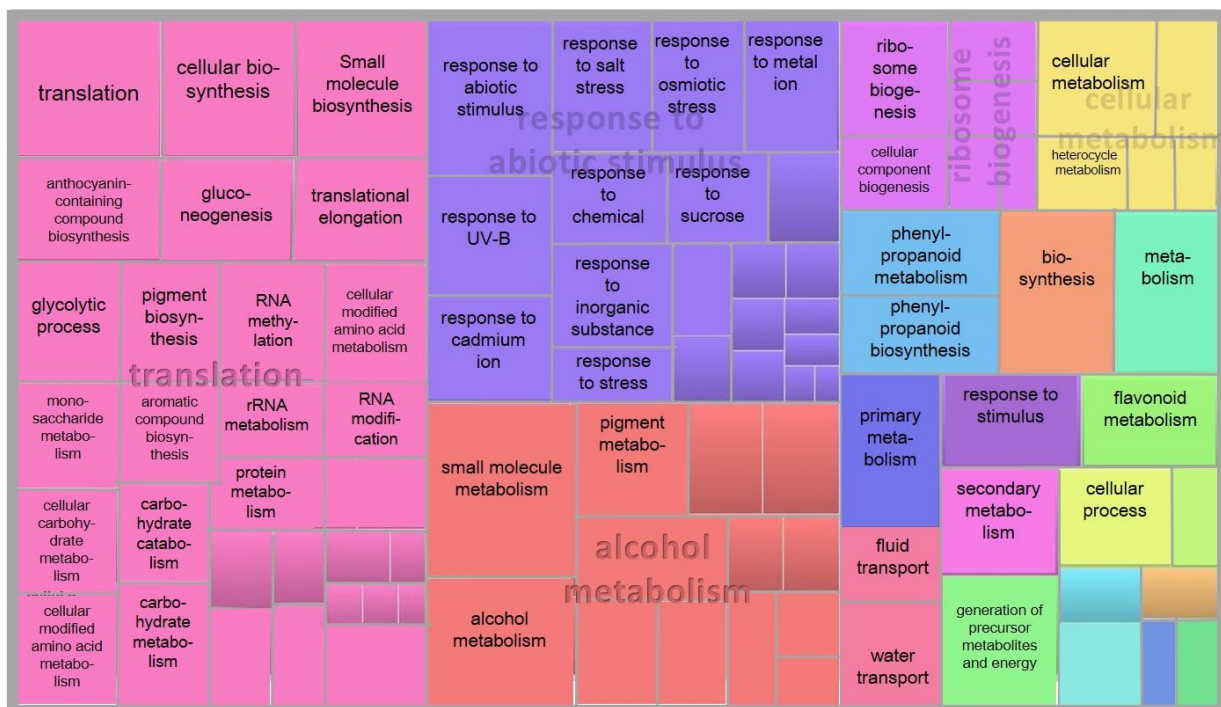


Abbildung 3.4: REVIGO-Treemap der „GO-Terms“ Analyse des Fruchtknotengewebes des weiblichen Individuums aus *Vitis sylvestris*

Ein großer Teil der exprimierten Gene sind den Stoffwechselwegen und Prozessen in Bezug auf Kohlenhydrate zugeordnet, etwa dem „Monosaccharid-Stoffwechsel“ („*monosaccharide metabolism*“), „glykolytischen Prozessen“ („*glycolytic process*“) und dem „Kohlenhydrat-Abbau“ („*carbohydrate catabolism*“). Unter anderem sind die Gruppen „RNA-Methylierung“ und „RNA-Modifikation“ aufgeführt. Passend zu diesen zeigt sich ebenso eine Anreicherung in der Gruppe „Ribosomenentstehung“ („*ribosome biogenesis*“). Eine weiterer signifikant angereicherter Bereich ist „*response to abiotic stimulus*“. Darunter versteht man alle Vorgänge, die zu einer Änderung des Zustands oder der Aktivität von Zellen bzw. des Organismus führen, meist hervorgerufen durch abiotische Stimuli. Der drittgrößte Überbegriff in der GO-Annotation ist die des „Alkohol-Metabolismus“. Hierbei handelt es sich um Prozesse und chemische Reaktionen, bei denen Stoffe mit Hydroxygruppen umgesetzt werden. Weiterhin gibt es noch Einordnungen in etwas weniger signifikante Bereiche wie den Primären und Sekundären Stoffwechselwegen, der Erzeugung von Vorläuferprodukten für verschiedene Biosynthesen und allgemein zelluläre Prozessen.

Im Vergleich zum Datensatz aus den hermaphroditischen Fruchtknoten konnten 40 Gene identifiziert werden, die dort nicht unter den 100 am stärksten exprimierten Genen zu finden sind. Darunter befinden sich vor allem proteinkodierende Gene mit Beteiligung an der Flavonoid-Biosynthese, die stark exprimiert sind.

3.3.4 Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern aus *Vitis vinifera*

Das Expressionsmuster der 100 am stärksten exprimierten Gene (vgl. SI-Anhang Tabelle 3) aus dem Staubblattgewebe des Hermaphroditen zeigt ein ähnliches Profil wie das des Staubblattgewebes der männlichen Blüten. Es konnten hier 62 Gene verschiedenen Gruppen zugeordnet werden, von denen das Gen GSVIVG01022916001 die stärkste Expression aufweist (EW 23407,76). Es kodiert für das Glutelin-Protein Typ A, einem Speicherprotein bekannt aus Reis (Takaiwa et al., 1986). Die meisten Gene sind auch hier dem Pollenschlauchwachstums zuzuordnen (siehe Abbildung 3.5). Außerdem signifikant angereichert sind, wie auch schon im Staubblattgewebe aus *Vitis sylvestris*, die Bereiche „*regulation of anatomical structure size*“ und „*cellular process involved in reproduction*“. Weitere Gruppen wie „Wachstum“, „Zellwand-Organisation“, „Reproduktion“ oder „Entwicklungsprozesse“ zeigen, dass auch in den

Staubblättern der Hermaphroditen des Kulturweins kurz nach Öffnen der Blüten vorwiegend Gene exprimiert sind, die an Fortpflanzungsprozessen beteiligt sind.

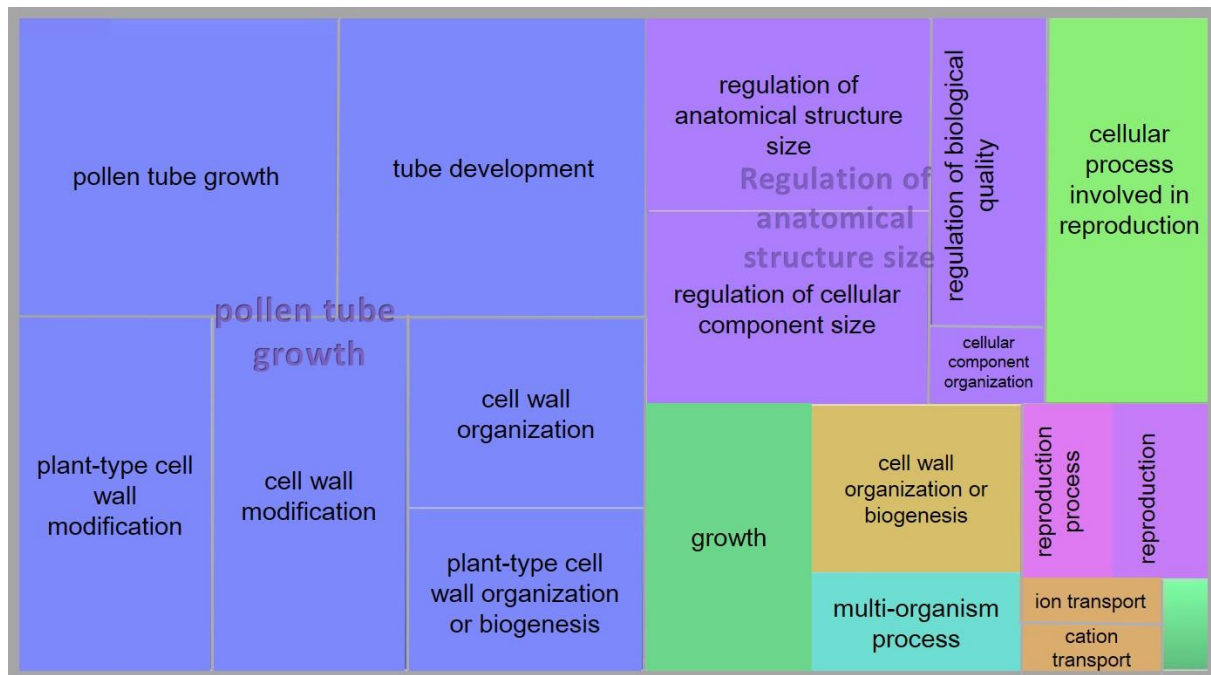


Abbildung 3.5: REVIGO-Treemap der „GO-Term“ Analyse des Staubblattgewebes des hermaphroditischen Individuums aus *Vitis vinifera*

Unter den am stärksten exprimierten Genen sind 74 Gene identisch mit den exprimierten Genen in den Staubblattgeweben aus *Vitis sylvestris*. Unter den 26 Genen, welche nicht in den Top 100 der hermaphroditischen Staubblätter auftauchen, befinden sich wieder einige Gene mit unbekanntem Proteinprodukt. Des Weiteren gibt es noch einige Gene, die mit Stresstoleranzen oder Stressantworten in Verbindung gebracht werden.

3.3.5 Funktionelle Analyse der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten aus *Vitis vinifera*

Von den im hermaphroditischen Fruchtknoten am stärksten exprimierten Genen, aufgelistet im SI-Anhang in Tabelle 4, konnte insgesamt 66 Gene eingeordnet werden. Die stärkste Expression mit einem Wert von 5748,91 zeigt hier das gleiche Gen wie im Fruchtknotengewebe von *Vitis sylvestris* (GSVIVG01034174001), kodierend für ein Metallothionein. Zwei der am meisten angereicherten Bereiche sind, wie auch schon in den weiblichen Fruchtknotengeweben, „Translation“ und „response to abiotic stimulus“ (Abbildung 3.6). Gene mit Wirkung in den verschiedenen Kohlenhydrat-Stoffwechselwegen sind hier ebenfalls vertreten. Allerdings wurden mehr Gene diesen Gruppen zugeordnet, so dass sie einen

eigenen Bereich bilden („*carbohydrate catabolism*“). Gene mit einer Beteiligung an Stoffwechselwegen und Reaktionen, die dem „Alkohol-Metabolismus“ zugerechnet werden können, sind hier im Bereich der „Translation“ zu finden.

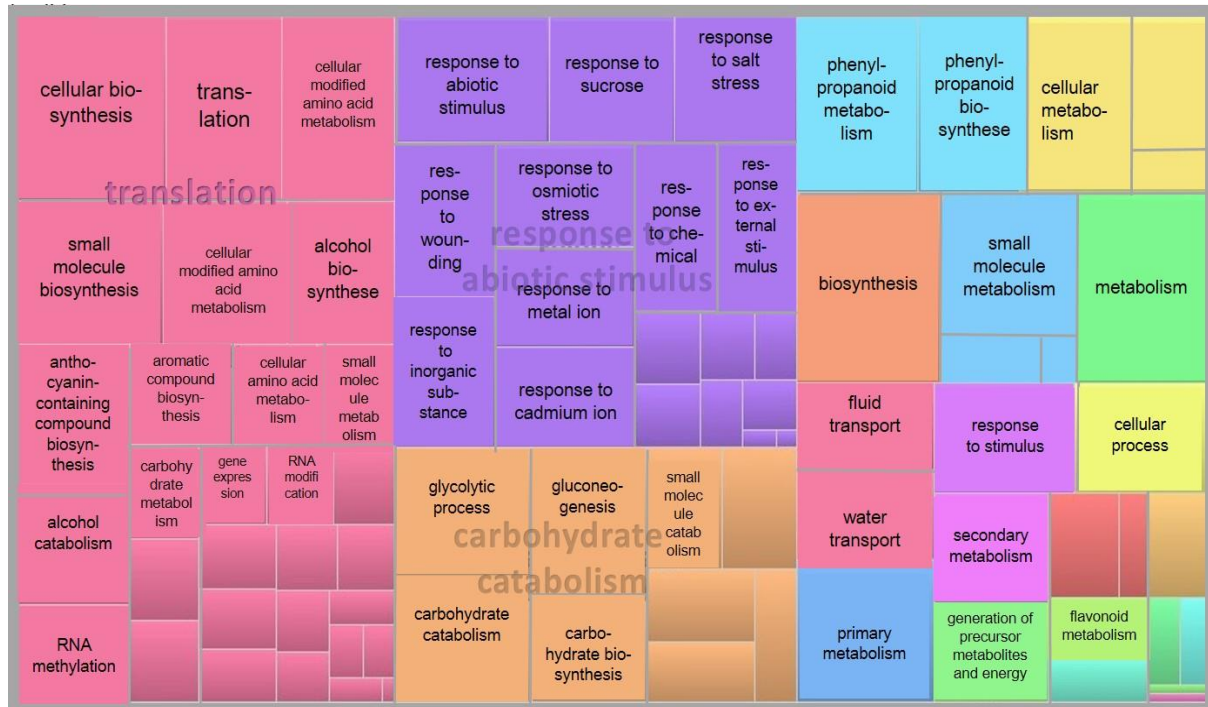


Abbildung 3.6: REVI GO-Treemap der „GO-Terms“ Analyse des Fruchtknotengewebes des hermaphroditischen Individuums aus *Vitis vinifera*

Im Vergleich mit dem Datensatz der Fruchtknoten aus rein weiblichen Blüten sind 41 Gene nicht unter den 100 stärksten exprimierten Genen zu finden. Darunter befinden sich mehrere Gene, denen eine Beteiligung an der Entwicklung des Blütenstandes bzw. der Blütenorgane zugesprochen werden kann, wie z.B. das Gen GSVIVG01008122001, kodierend für ein Cytochrom P450 Protein. Mitglieder der Familie der Hämproteine, wie Cytochrom P450, haben oft Einfluss auf die Blütenreife (Liu et al., 2015). Im Datensatz der hermaphroditischen Fruchtknoten hat Cytochrom P450 einen Expressionswert von 873,12, hingegen ist die Expression in den weiblichen Geweben mit 114,17 weitaus geringer. Andere Beispiele sind verschiedene MADS-Box Gene, welche in verschiedener Form einen starken Einfluss auf die Blütenentwicklung haben (Becker, 2003). Diese Gene sind in den Geweben der Fruchtknoten weiblicher Blüten oft nur halb so stark exprimiert. Ein weiteres interessantes Gen kodiert für das Protein RADIALIS-like 1 mit einem Expressionswert von 712, 86. In einigen Pflanzen zeigen diese Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die

Blütenmorphogenese, oft schon in sehr frühen Stadien der Entwicklung (Hamaguchi et al., 2008).

3.3.6 Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus *Vitis sylvestris*

Die differentielle Genexpression soll zusätzlich zur absoluten Genexpression betrachtet werden. Dafür werden die beiden Datensätze aus *Vitis sylvestris*, der Staubblattdatensatz (711) und der Fruchtknotendatensatz (712), miteinander verglichen (siehe SI-Anhang Tabelle 5). Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression wird aus den normalisierten „unique exon reads“, welche durch die Kartierung der Sequenzen mittels RNA-Seq gezählt wurden, der \log_2 „fold change“ (\log_2 FC) berechnet. Die Grenzwerte, für die Gene als differentiell exprimiert gelten, sind in Abschnitt 2.4.3 erläutert. Alle Gene, die diese Werte nicht erreichen, werden als basal exprimiert angesehen. Unter diesen Bedingungen sind im Datensatz des Staubblattgewebes 433 Gene differentiell exprimiert, die Daten aus den Fruchtknoten der weiblichen Blüten zeigen 735 Gene mit differentieller Genexpression. Eine Einordnung der totalen Anzahl an Genen aus beiden Datensätzen in verschiedene „Gene Ontology“ (GO) Gruppen erfolgte mit dem Programm Blast2GO (Conesa et al., 2005).

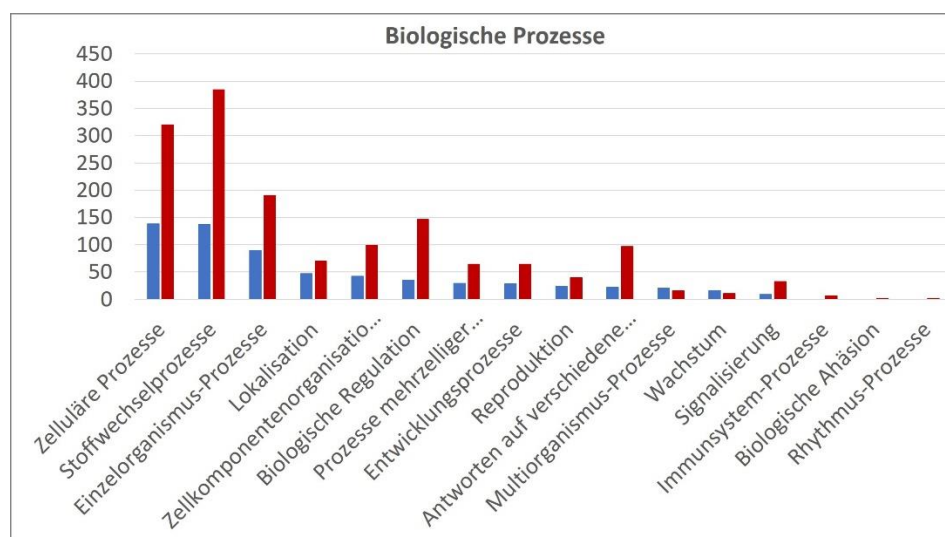


Abbildung 3.7: GO-Klassifizierung „Biologische Prozesse“ der differentiell exprimierten Gene aus *Vitis sylvestris*

Dabei zeigt sich, dass in der Kategorie „Biologische Prozesse“ (Abbildung 3.7) sowohl in den Fruchtknoten als auch in den Staubblättern die drei Gruppen „Zelluläre Prozesse“, „Stoffwechselprozesse“ sowie „Einzelorganismus-Prozesse“ am stärksten angereichert sind. Zu den „Einzelorganismus-Prozessen“ zählen unter anderem die „Zellproliferation“ oder

„Aktivitäten des Zellzyklus“. Unterschiede gibt es in den Gruppen „Biologische Regulation“, „Antworten auf verschiedene Stimuli“ sowie „Signalisierung“, die in den Fruchtknotengewebe im Verhältnis höher angereichert sind und sich somit von den Staubblattgeweben unterscheiden. In die Gruppe „Signalisierung“ kann ein Gen aus den Fruchtknoten der weiblichen Blüten eingeordnet werden, welches eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung spielt und im Gewebe der Staubblätter von *V.s.* eine geringere Expression aufweist. Der log₂ FC für dieses Gen beträgt -6,2, es kodiert für das Protein AINTIGUMENTA 5-like (GSVIVG01029219001). Weiterhin zeigt sich auch die Expression von Genprodukten der Familie der HOTHEAD-Proteine, sowohl in den männlichen (GSVIVG01010650001, log₂ FC 5,3) als auch in den weiblichen Geweben (GSVIVG01016856001, log₂ FC -5,17) von *Vitis sylvestris*. Diese Gene sind an der Organentwicklung bzw. der Organfusion von Blüten beteiligt (Lolle et al., 1998). Die Gene und ihre zugehörige GO-Einordnung sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. In die Gruppe „Entwicklungsprozesse“ können noch zwei weitere interessante Gene eingeordnet werden. In den Staubblättern des männlichen Individuums ist das Gen GSVIVG010221882001 differenziell exprimiert. Es kodiert für das MADS-Box Protein AGAMOUS-like 8 Homolog (AGL8). In den Fruchtknoten der weiblichen Blüten ist das für das MADS-Box Protein 5 kodierende Gen GSVIVG0125945001) differenziell exprimiert.

Tabelle 3.4: GO-Zuordnung von Genen mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung aus *Vitis sylvestris*

Gen	Kategorie	„GO-Term“	„Geschlecht“
GSVIVG01010650001	Biologischer Prozess	Entwicklungsprozesse	Male_SB
GSVIVG010221882001	Biologischer Prozess	Entwicklungsprozesse	Male_SB
GSVIVG01016856001	Biologischer Prozess	Signalisierung	Female_FK
GSVIVG01029219001	Biologischer Prozess	Signalisierung	Female_FK
GSVIVG01025945001	Biologischer Prozess	Entwicklungsprozesse	Female_FK

In der Kategorie „Molekulare Funktion“ (Abbildung 3.8) sind die am stärksten angereicherten GO-Gruppen „Katalytische Aktivität“ und „Bindung“. Dabei handelt es sich um die zwei am wenigstens differenzierten, in die fast jede Genaktivität eingliedert werden kann. Gentranskripte aus den Staubblättern der männlichen Blüten sind hier in der ersten

Gruppe höher angereichert, wohingegen Transkripte aus den Furchtknoten weiblicher Blüten häufiger der zweiten Gruppe zugeordnet werden können.

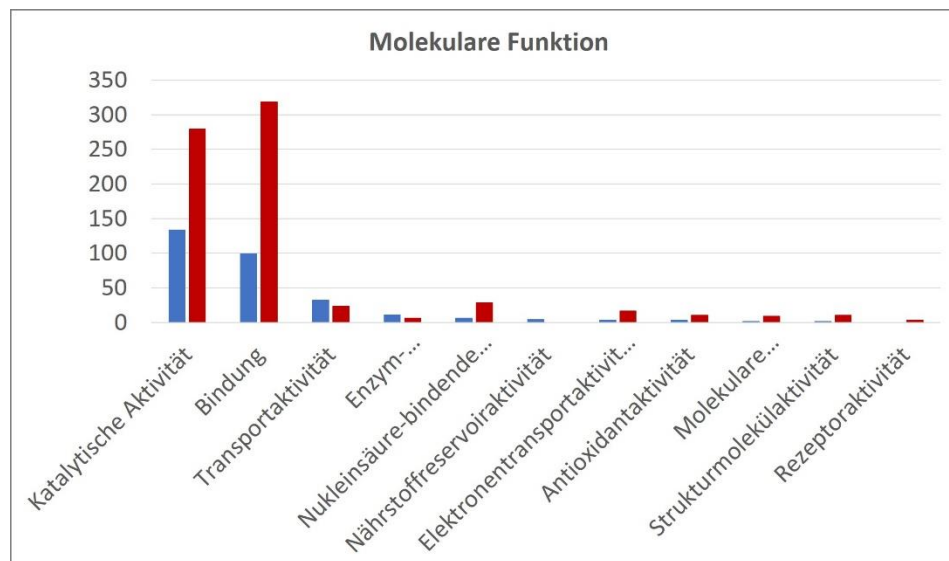


Abbildung 3.8: GO-Klassifizierung „Molekulare Funktion“ der differenziell exprimierten Gene aus *Vitis sylvestris*

Wie in der folgenden Abbildung zu sehen, laufen die meisten Prozesse in den männlichen Blüten in den Bereichen „Zelle“, „Membran“ und „Organellen“ ab. Bei den weiblichen Blüten konzentrieren sie sich ebenfalls auf die „Zelle“ und „Organellen“, allerdings zeigen auch die Bereiche „Makromolekularer Komplex“ sowie „Membran“ eine Anreicherung

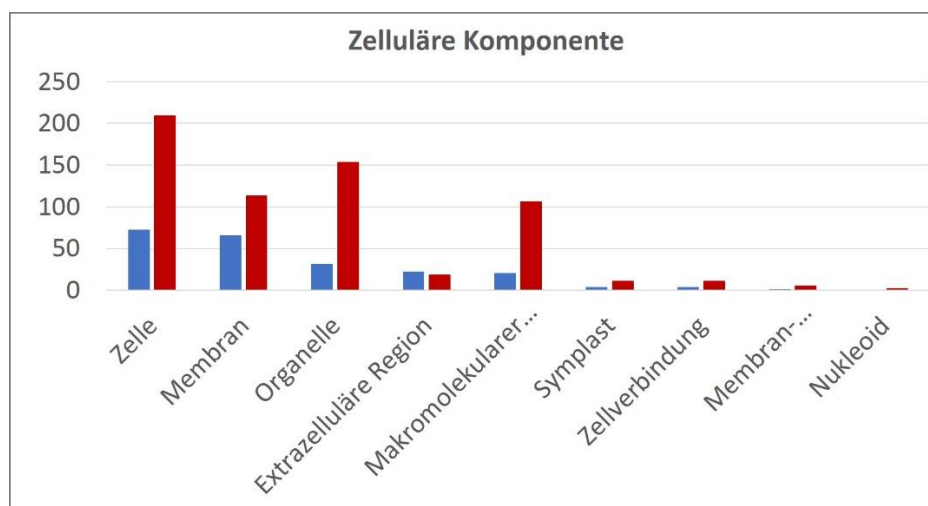


Abbildung 3.9: GO-Klassifizierung „Zelluläre Komponente“ der differenziell exprimierten Gene aus *Vitis sylvestris*

Für die genaue Charakterisierung der differenziell exprimierten Gene werden diese mit den Online-Tools agriGO (Du et al., 2010) und REVIGO (Supek et al., 2011) analysiert. Die GO-

Gruppierungen, die im Staubblattgewebe des männlichen Individuums am signifikantesten angereichert sind, sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 711

„GO-Term“	log10 p-Value
„tube development“	-22,7
„pollination“	-21,4
„plant-type cell wall modification“	-18,8
„cell wall modification“	-18
„cell morphogenesis involved in differentiation“	-17,2
„developmental growth involved in morphogenesis“	-16,8
„cellular process involved in reproduction“	-16,7
„cell wall organization“	-13,5
„plant-type cell wall organization or biogenesis“	-12,5
„regulation of cellular component size“	-12,4
„regulation of anatomical structure size“	-12,4
„growth“	-10,5

Die differenziell exprimierten Gene im Gewebe der Staubblätter männlicher Blüten aus *Vitis sylvestris* zeigen, dass sie in diesem Entwicklungsstadium der Blüte vor allem in die Vorbereitung der Produktion und Freisetzung der Pollen involviert sind („pollination“). Hierbei sind unter anderem Gruppen angereichert, die mit Veränderungen und Wachstum von Zellwänden in Verbindung gebracht werden („cell wall modification“, „plant-type cell wall organization or biogenesis“, „regulation of anatomical structure size“ etc.). Neben den allgemein benannten Gruppen Entwicklung und Reproduktion („developmental growth involved in morphogenesis“) sind die Gene in ihrer Funktion hauptsächlich dem Pollenschlauchwachstum („tube development“) zugeordnet. Insgesamt können 33 Gene Pollenschlauchwachstum bzw. –entwicklung, sowie fünf weitere allgemein der Bestäubung („pollination“) zugeordnet werden. Unter diesen Genen befindet sich unter anderem ein homologes Gen (GSVIVG01022182001) kodierend für den Transkriptionsfaktor AGL8, welches schon durch die Blast2GO-Analyse identifiziert wurde (siehe oben.) Das Gen zeigt einen log2 FC von 7,069. Die differenzielle

Genexpression der beiden Gewebe aus *Vitis vinifera* zeigt mit einem log₂ FC von 6,65 eine geringere differenzielle Expression.

Die Zuordnung der differenziell exprimierten Gene in den Fruchtknoten der weiblichen Blüten zeigt weniger signifikant angereicherte Gruppen als im Staubblattgewebe der männlichen Blüte. Die wesentlichen GO-Gruppierungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.6: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 712

„GO-Term“	log ₁₀ p-Value
„cell proliferation“	-11,1
„cytokinesis“	-10,4
„photosynthesis“	-10,1
„cell division“	-9,1
„anaphase“	-8,6
„photosynthesis, light reaction“	-8,5
„nicotinamid metabolism“	-7,6
„organelle organization“	-7,5
„alkaloid metabolism“	-7,4
„cellular amide metabolism“	-7,4
„DNA replication“	-7,2

Die angereicherten Gruppen lassen sich in drei Bereiche gliedern: Ein großer Bereich bilden Gruppen, die in Zusammenhang mit Zellvermehrung („cell proliferation“ und „cell division“) und der mitotischer Zellteilung („DNA replication“, „cytokinesis“ und „anaphase“) stehen. Des Weiteren können einige Gruppen dem Bereich Photosynthese zugeordnet werden („photosynthesis“, „light reaction“) bzw. den Kompartimenten, in denen die Photosynthese stattfindet („organelle organization“). Einen dritten signifikanten Bereich bilden die Stoffwechselreaktionen von Nikotinamiden bzw. Alkaloiden als essentieller Bestandteil bei der Synthese von Pyridinen. Dem „Metabolismus der Alkaloide“, einer weiteren Stoffgruppe des sekundären Stoffwechsels in Pflanzen, sind ebenfalls einige Gene zugeordnet.

In Bezug auf die Blütenmorphogenese kann sowohl in der GO-Gruppe „ovule development“ als auch in der Gruppe „floral organ development/ formation“ ein Gen kodieren für ein MADS-Box

Protein 5 gefunden werden (GSVIVG01025945001), welches ebenfalls schon in der Blast2GO-Analyse identifiziert wurde. Die differenzielle Genexpression liegt mit einem \log_2 FC von -5,01 an der Grenze zu den als basal exprimiert angesehenen Genen. Demgegenüber hat das Gen im Vergleich der beiden Datensätze von *Vitis vinifera* einen höheren \log_2 FC (-6,85) und somit eine stärkere differenzielle Expression.

3.3.7 Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus *Vitis vinifera*

Bei den sequenzierten Transkriptomen der Staubblätter und Fruchtknoten aus *Vitis vinifera* handelt es sich um die geschlechtsspezifischen Organe der hermaphroditischen Blüten der Variation Weißer Heunisch. Mit denselben Grenzwerten bezüglich des \log_2 „fold change“ und der Exontreffer können in dem Staubblattgewebe 465 Gene mit einem \log_2 „fold change“ größer gleich 5 und im Fruchtknotengewebe 1039 Gene mit einem Wert kleiner gleich -5 als differenziell exprimiert angesehen werden. Die vollständigen Ergebnisse der RNA-Seq sind im SI-Anhang unter Tabelle 6 zu finden. Eine GO-Einteilung in die drei Kategorien „Biologische Prozesse“, „Molekulare Funktionen“ und „Zelluläre Komponenten“ wurde mithilfe des Programms Blast2GO durchgeführt (Conesa et al., 2005). In den beiden zu vergleichenden Geweben sind in der Kategorie „Biologische Prozesse“ (Abbildung 3.10) die drei Gruppen „Zelluläre Prozesse“, „Stoffwechselprozesse“ und „Einzelorganismus-Prozesse“ die drei am signifikantesten angereicherten Gruppen. Wie schon im Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten aus *Vitis sylvestris* sind auch bei den Hermaphroditen die Gruppen „Antwort auf verschiedene Stimuli“ und „Signalisierung“ im Fruchtknotengewebe sowie „Biologische Regulation“ signifikant angereichert. Die im Folgenden bezüglich der Entwicklung der geschlechtsspezifischen Gewebe näher charakterisierten Gene können den beiden zuletzt genannten Gruppen zugeordnet werden (siehe Tabelle 3.7).

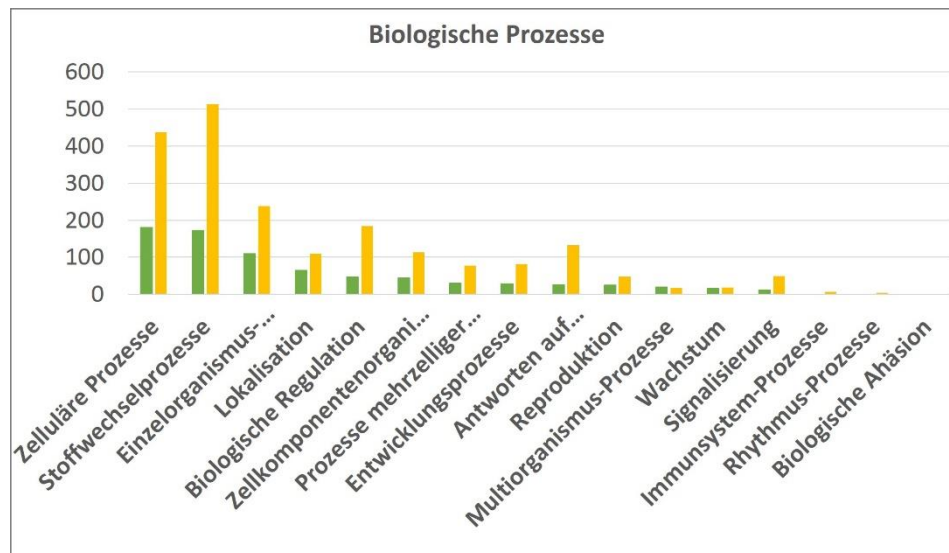


Abbildung 3.10: GO-Klassifizierung „Biologische Prozesse“ der differenziell exprimierten Gene aus *Vitis vinifera*

In den Staubblättern der Hermaphroditen konnte nur ein interessantes Gen (GSVIVG01022182001), kodierend für AGL8, in der Gruppe „Entwicklungsprozesse“ gefunden werden. In den Fruchtknoten der hermaphroditischen Blüten sind drei potenziell interessante Gene durch die Blast2GO-Analyse identifiziert worden: 1. GSVIVG01026207001, kodierend für das Protein TRANSPARENT TESTA 16, 2. ein Gen, welches für das Protein BIG Brother kodiert (GSVIVG01032082001) und 3. das Gen GSVIVG01034073001, kodierend für das BEL1-like Homeodomain Protein 9.

Tabelle 3.7: GO-Zuordnung von Genen mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung aus *Vitis vinifera*

Gen	Kategorie	„GO-Term“	„Geschlecht“
GSVIVG01022182001	Biologischer Prozess	Entwicklungsprozesse	Hermaphrodite_SB
GSVIVG01026207001	Biologischer Prozess	Biologische Regulation	Hermaphrodite_FK
GSVIVG01032082001	Biologischer Prozess	Biologische Regulation	Hermaphrodite_FK
GSVIVG01034073001	Biologischer Prozess	Signalisierung	Hermaphrodite_FK

In der Kategorie „Molekulare Funktion“ (Abbildung 3.11) sind den Gruppen „Bindung“ und „Katalytische Aktivität“ in beiden Geweben die meisten Gene zugeordnet. Im Gegensatz zum

Staubblattgewebe ist die Gruppe „Nukleinsäure-bindende Transkriptionsfaktoraktivität“ in den Fruchtknoten deutliche höher angereichert.

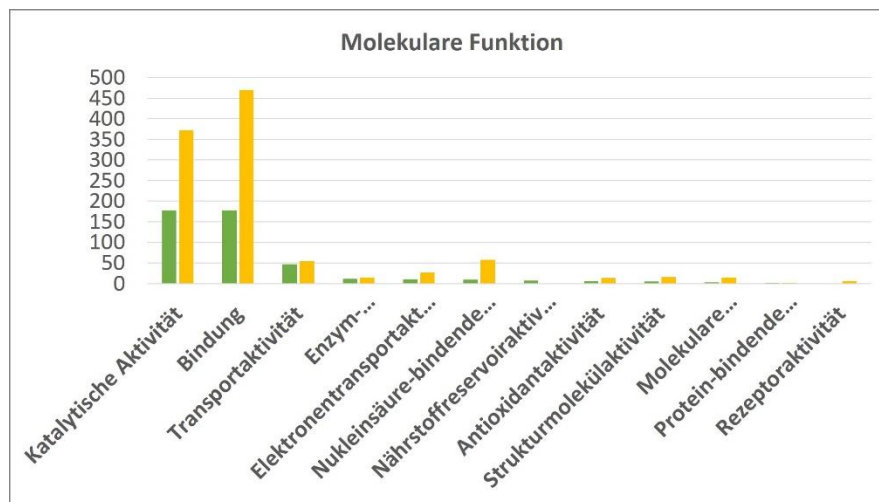


Abbildung 3.11: GO-Klassifizierung „Molekulare Funktion“ der differenziell exprimierten Gene aus *Vitis vinifera*

Abbildung 3.12 zeigt, dass die meisten Prozesse des Staubblattgewebes in den Kompartimenten „Membran“ und „Zelle“ ablaufen, wohingegen im Fruchtknotengewebe viele Gene den Kompartimenten „Zelle“, „Organelle“, „Membran“ und der „Extrazelluläre Region“ zugeordnet wurden.

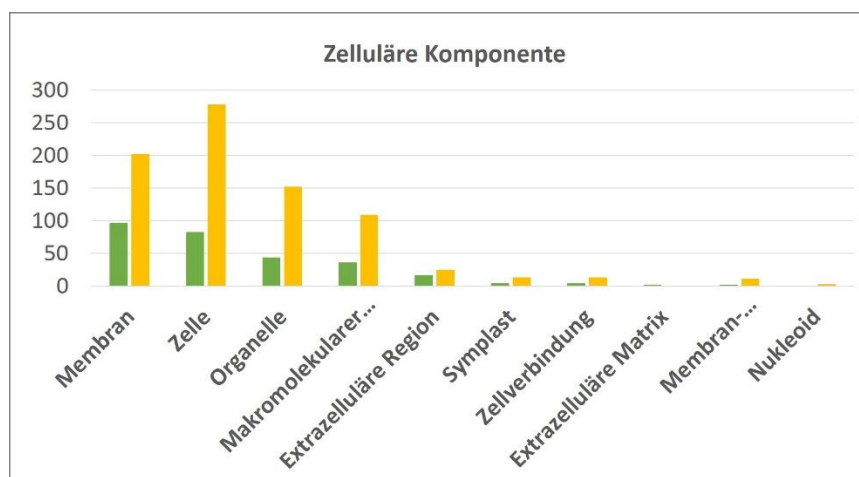


Abbildung 3.12: GO-Klassifizierung „Zelluläre Komponente“ der differenziell exprimierten Gene aus *Vitis vinifera*

Die tiefere Charakterisierung erfolgte auch hier mit den Online-Tools agriGO (Du et al., 2010) sowie REVIGO (Supek et al., 2011). Die signifikant angereicherten GO-Gruppen mit den niedrigsten log₁₀ p-Values aus dem Staubblattgewebe der Hermaphroditen sind in der Tabelle 3.8 aufgeführt. Es fällt auf, dass, wie auch bei den Staubblättern des männlichen

Individuums, die beiden Gruppen „Schlauchwachstum“ („*tube growth*“) und „Bestäubung“ („*pollination*“) am höchsten angereichert sind. Dabei zeigt sich ein ähnliches Expressionsprofil wie im Gewebe aus *Vitis sylvestris*. Ebenso wie im Staubblattgewebe der männlichen Blüten kann das Gen kodierend für den AGL8-Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Mit einem \log_2 FC von 6,65 zeigt das Gen eine geringere differenzielle Expression als im Vergleich von *Vitis sylvestris* (\log_2 FC 7,07), ist allerdings in den hermaphroditischen Staubblättern fast doppelt so hoch exprimiert (EW 155,4) wie im männlichen Staubblattgewebe, wo nur ein EW von 84,01 erreicht wird.

Tabelle 3.8: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 710

„GO-Term“	log10 p-Value
„ <i>tube development</i> “	-24,3
„ <i>pollination</i> “	-22,9
„ <i>developmental growth involved in morphogenesis</i> “	-18,7
„ <i>plant-type cell wall modification</i> “	-17,8
„ <i>cell morphogenesis involved in differentiation</i> “	-16,8

Einige Gene wurden in die GO-Gruppen „*stamen (filament) development*“ oder „*anther development*“ eingeordnet, haben also einen Einfluss auf die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane.

Im Fruchtknotengewebe der hermaphroditischen Blüten sind nur wenige Gruppen signifikant angereicht und haben dabei einen weitaus größeren \log_{10} p-Value als die im Staubblattgewebe. Demgegenüber unterscheiden sich die Gruppen von denen im Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten (siehe Tabelle 3.9). Vor allem sind Gruppen, welche grundlegende Entwicklungsprozesse beschreiben, wie z.B. „*system development*“, angereichert. Darunter werden alle Prozesse zusammengefasst, die zur Entwicklung reifer Strukturen nötig sind. Auch die Gruppen „*regulation of cellular biosynthesis*“ und „*secondary metabolism*“ zeigen, dass es sich bei den ablaufende Prozesse um fundamentale Vorgänge in diesem Gewebe handelt. Vorgänge unter dem Begriff „*adaxial/abaxial pattern specification*“ stehen im Zusammenhang mit der Differenzierung von Zellen entlang der verschiedenen Körperachsen der Pflanzen bzw. der Blüten.

Tabelle 3.9: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 713

„GO-Term“	log10 p-Value
„system development“	-5,89
„meristem maintenance“	-5,89
„regulation of cellular biosynthesis“	-3,13
„phenylpropanoid biosynthesis“	-3
nucleobase-containing small molecule metabolism“	-2,96
„secondary metabolism“	-2,89
„adaxial/abaxial pattern specification“	-2,72

Bei der Analyse der Gene, welche eine Zuordnung zur Gruppe „Ovulumentwicklung“ („*ovule development*“) haben, ist das oben erwähnte Gen kodierend für TRANSPARENT TESTA 16 gefunden worden. Dieses Gen gilt unter den gegebenen Bedingungen mit einem log2 FC von -6,47 als differenziell exprimiert, im Gegensatz zum Vergleich der Gewebe der Wilden Reben. Die absolute Expression ist mit einem Wert von 24,25 schwächer als in den Fruchtknoten der weiblichen Blüten aus *Vitis sylvestris* (EW 34,68). In der Gruppe „Blütenorganentwicklung“ („*floral organ development*“) befindet sich das Gen GSVIVG01032082001, welches für das Protein BIG BROTHER kodiert. Dieses Protein besitzt eine E3 Ubiquitinligase-Aktivität. Es hat eine höhere differenzielle Expression in *Vitis vinifera* (log2 FC -7,74) als in *Vitis sylvestris* (log2 FC -5,82). Ein weiteres Gen, welches an der Ovulum-Entwicklung beteiligt ist, ist GSVIVG01034073001. Es kodiert für das BEL1-like Homeodomain Protein 9. Eine leicht erhöhte Expression mit Werten von 62,22 bzw. 68,34 kann in den Fruchtknoten der hermaphroditischen und weiblichen Individuen detektiert werden. In beiden Staubblattgewebe hingegen zeigt sich nur eine geringe Expression von 1,84 im Hermaphroditen bzw. von 3,87 im männlichen Individuum. Dies führt zu einer differenziellen Expression mit einem log2 FC von -5,08 in *Vitis vinifera*. Unter den verwendeten Grenzwerten gilt das Gen in *Vitis sylvestris* als nicht differenziell exprimiert.

3.4 Quantitative Real-Time PCR

3.4.1 Ausgewählte Gene

Zur stichprobenartigen Überprüfung der Expressionsprofile, welche durch die RNA-Seqs entstanden sind, wurden verschiedene Gene auf ihre differenziell hohe Expression hin mittels qRT-PCR überprüft. Es wurden im Vergleich der beiden *Vitis sylvestris*-Datensätzen (Male-Staubblatt vs. Female-Fruchtknoten) die Positionen 1, 5, 13 und 28 der am höchsten differenziell exprimierten Gene sowohl aus dem Geweben der männlichen als auch der weiblichen Blüten zufällig ausgewählt. Die Gene an den gleichen Positionen wurden auch im Vergleich beider Datensätze aus *Vitis vinifera* (Hermaphrodite-Staubblatt vs. Hermaphrodite-Fruchtknoten) ausgewählt, die Expression aller Gene wurden daraufhin in den vier verwendeten Geweben untersucht. Alle ausgewählten Gene aus dem Vergleich Male-Staubblatt mit Female-Fruchtknoten und die dazugehörigen BLAST-Treffer sind in Tabelle 3.10 zu finden, die jeweiligen Ergebnisse aus den RNA-Seqs und die \log_2 „fold changes“ im SI-Anhang in Tabelle 7.

Bei dem differenziell am höchsten exprimierten Gen GSVIVG01004788001 in den Staubblättern (*V.s.*) handelt es sich um ein Gen für eine Flavin-abhängige Monooxygenase. Diese Genfamilie ist in die Biosynthese von Glucosinolaten (GSL), also Senfölglykosiden involviert, FMO-GS-OX3 ist dabei spezifisch an der Umwandlung von Methylthioalkyl-GSL zu Methylsufinylalkyl-GSL beteiligt. Glucosinolate wirken antimikrobiell auf verschiedene Pathogene und dienen als Abschreckung für Pflanzenfresser (Li et al., 2008). An Position 5 befindet sich ein Gen kodierend für das Replikationsprotein A 70 kDa (GSVIVG01001014617001). Es ist eine Untereinheit des Replikationsproteinkomplex A und für das Binden und Stabilisieren einzelsträngiger DNA zuständig, welche zwischenzeitlich während der Replikation vorkommt. Des Weiteren spielt das Protein A eine große Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden (Lin et al., 1998).

Tabelle 3.10: Ausgewählte Gene für qRT-PCR aus dem Vergleich Male-Staubblatt vs. Female-Fruchtknoten

Gewebe	Position	Gen-ID	BLAST-Ergebnis
Male-Staubblatt	1	GSVIVG01004788001	Flavin-containing mMonooxygenase FMO GS-OX-like 3 [Vitis vinifera]
Male-Staubblatt	5	GSVIVG01014617001	Replication Protein A 70 kDa DNA- Binding Subunit B [Vitis vinifera]
Male-Staubblatt	13	GSVIVG01032117001	Polygalacturonase-like Isoform X1 [Vitis vinifera]
Male-Staubblatt	28	GSVIVG01022246001	Ras-related Protein Rab7 Isoform X2 [Vitis vinifera]
Female- Fruchtknoten	1	GSVIVG01000797001	Cell Division Control Protein 45 Homolog [Vitis vinifera]
Female- Fruchtknoten	5	GSVIVG01002709001	GTP-binding Protein At3g49725, chloroplastic isoform X1 [Vitis vinifera]
Female- Fruchtknoten	13	GSVIVG01006926001	Squalene Epoxidase 3-like [Vitis vinifera]
Female- Fruchtknoten	28	GSVIVG01022044001	unnamed protein product [Vitis vinifera]

Das Gen GSVIVG01032117001 an Position 13 kodiert für ein Polygalakturonase-ähnliches Protein. Polygalakturonasen sind Pektin-Hydrolasen, Pektin wiederum ist einer der größten Strukturkomponenten der pflanzlichen Zellwand (D'Ovidio et al., 2004). Polygalakturonasen sind somit beteiligt an Modifikation und Abbau von Pektinen während der Entwicklung von Pflanzen, unter anderem bei der Dehiscenz von Antheren und während des Pollenschlauchwachstums (Hadfield & Bennett, 1998). Das Gen an Stelle 28 (GSVIVG01022246001) der am höchsten differenzierten Gene kodiert für ein mit dem G-Protein Ras verwandtes Rab7-Protein. Rab-Proteine bilden den größten Zweig der GTPase-Familie. Sie sind wichtige Regulatoren im Membrantransport. Dabei vermitteln sie den Vesikeltransport zwischen Vakuolen, der Plasmamembran, dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Allgemein sind sie oft an Schlüsselreaktionen in der Pflanzenentwicklung beteiligt, z.B. am Pollenschlauchwachstum (Abbal et al., 2007).

Das Gen mit der höchsten differenziell Expression (GSVIVG01000797001) im Fruchtknoten des weiblichen Individuums aus *Vitis sylvestris* ist ein proteinkodierendes Gen homolog zum Cell Division Control Protein 45. Es ist verantwortlich für die Initiation der Replikation in der S-Phase des Zellzyklus, indem es die DNA-Polymerase α bei der Replikation auf das Chromatin lädt (Mimura & Takisawa, 1998). Das Gen GSVIVG01002709001 an Stelle 5 im Fruchtknoten der weiblichen Blüten kodiert für ein GTP-Bindeprotein, bekannt aus *Arabidopsis thaliana*, welches in den Chloroplasten lokalisiert ist. GTP-bindende Proteine sind eine weit verbreitete Familie in der Pflanzenwelt, von denen sowohl die heterotrimeren G-Proteine als auch die kleinen monomeren G-Proteine vorkommen. Die Klasse der heterotrimeren Proteine ist in Pflanzen möglicherweise an der Regulation der Zellteilung und -differenzierung beteiligt. Die Klasse der kleinen G-Proteine zeigen in Pflanzen ähnliche Funktionen wie ihre Homologe in Tieren und Hefen, nämlich bei der Signaltransduktion und der Regulation des Zytoskeletts (Ma, 1994). An Position 13 ist ein Gen für ein Squalene-Epoxidase 3-ähnliches Protein zu finden. Squalene-Epoxidasen konvertieren Squalene in Oxidosqualene, eine Vorstufe aller zyklischen Triterpenoide in Pflanzen wie z.B. Brassinosteroide oder in der Membran vorkommenden Sterole. Diese bilden eine der größten Klassen von Sekundärstoffen in der Pflanzenwelt (Rasbery et al., 2007). Das Gen an Position 28 (GSVIVG01022044001) kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion. Eine Analyse der Proteinstruktur zeigt vor allem das Vorkommen vieler Leucin-reicher Repeats. Somit kann eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen in Betracht gezogen werden (Kobe & Deisenhofer, 1994). Weitere Hinweise auf die genaue Funktion dieses Gens konnten nicht gefunden werden.

Auch im Vergleich des Staubblatt- und Fruchtknotendatensatzes aus *Vitis vinifera* (Hermaphrodite-Staubblatt vs. Hermaphrodite-Fruchtknoten) wurden die Gene an den Positionen 1, 5, 13 und 28 der am höchsten differenziell exprimierten Gene für eine quantitative PCR ausgewählt. Die entsprechenden Gen-IDs sowie die dazugehörigen BLAST-Treffer sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.11: Ausgewählte Gene für qRT-PCR aus dem Vergleich Hermaphrodite-Staubblatt vs. Hermaphrodite-Fruchtknoten

Gewebe	Platz	Gen-ID	BLAST-Ergebnis
Hermaphrodite-Staubblatt	1	GSVIVG01000196001	Cytochrome P450 81E8 Isoform X2 [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Staubblatt	5	GSVIVG01035912001	Homogentisate Geranylgeranyltransferase, chloroplastic-like [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Staubblatt	13	GSVIVG01005843001	uncharacterized protein LOC100241834 [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Staubblatt	28	GSVIVG01018168001	putative Expansin-B2 [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Fruchtknoten	1	GSVIVG01000230001	Defensin-like protein 1 isoform X1 [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Fruchtknoten	5	GSVIVG01004077001	Protein TRANSPARENT TESTA 12 [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Fruchtknoten	13	GSVIVG01008134001	unnamed protein product [Vitis vinifera]
Hermaphrodite-Fruchtknoten	28	GSVIVG01015116001	unnamed protein product [Vitis vinifera]

Bei dem am höchsten differenziell exprimierten Gen im Gewebe der Staubblätter des Hermaphroditen handelt es sich um ein für Cytochrom P450 kodierendes Gen. Cytochrome sind Häm-bindenden Proteine, die in Tieren, Pflanzen und sogar in Viren vorkommen. In Pflanzen katalysieren diese Enzyme vor allem Reaktionen im Sekundärstoffwechsel (Bolwell et al., 1994). Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass Mitglieder der Cytochrom P450-Familie an den finalen Schritten der Blütenreifung in *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind (Liu et al., 2015).

An Stelle 5 findet sich ein Gen für eine Homogentisinsäure Geranylgeranyltransferase (HGGT), die der Form bekannt aus Chloroplasten ähnelt. Diese Enzyme sind in den Vitamin E-Stoffwechsel involviert: Sie katalysieren die Schlüsselreaktion bei der Tocotrienol-Biosynthese, die primäre Form des Vitamin E, und dienen als Antioxidantien überwiegend

dem Schutz der Pflanzenzellen vor Oxidativem Stress (Cahoon et al., 2003). Das Gen an Position 13 kodiert für ein nicht charakterisiertes Protein. Eine BLAST-Analyse ergab keine Homologien zu bekannten Proteinen in anderen Organismen. Es konnte eine Domäne gefunden werden, welche aus Genen exprimiert in Wurzelhauben bekannt ist. Diese sind beteiligt am Prozess des Absterbens der äußeren Zellschichten in der Wurzelspitze (Matsuyama, Yasumura, Funakoshi, Yamada, & Hashimoto, 1999). Stelle 28 zeigt ein Gen kodierend für ein Expansin-Protein. Expansine sind Zellwandproteine, welche durch vorübergehendes Lösen von Zellwandpolymeren das Wachstum von Zellverbänden unterstützen, ohne die Polymere zu zerstören. Sie interagieren dabei hauptsächlich mit Zellulose (Cosgrove, 2015). Es stellte sich heraus, dass Expansin sowohl organspezifisch als auch gewebe- und zellspezifisch exprimiert wird. Untersuchungen in der Wunderblume (*Mirabilis jalapa*) ergaben eine Expression während der Blütenmorphogenese und bei der Öffnung der Blüte (Gookin et al., 2003).

Im Fruchtknoten des Hermaphroditen ist ein Gen kodierend für Defensin-ähnliches Protein am höchsten differenziell exprimiert. Defensine sind kleine, basische Peptide. Sie dienen vor allem der Abwehr gegen einige Pilzpathogene, indem sie entweder das Wachstum direkt oder die α -Amylaseaktivität bzw. die Proteinsynthese hemmen (Thomma et al., 2002). An Position 5 findet sich ein Gen für das Protein TRANSPARENT TESTA 12. Das Protein aus *Arabidopsis thaliana* ähnelt einem multifunktionellen Sekundärstofftransporter, einem Transmembranen Helixtransporter. Diese sind an der Einlagerung von verschiedenen Stoffen, wie z.B. Flavonoiden, in Geweben beteiligt (Debeaujon et al., 2001). Das Gen an Stelle 13 kodiert für ein Proteinprodukt unbekannter Funktion, welches keine Homologien zu bekannten Proteinen aufweist. Eine Domänenanalyse konnte ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion des Gens geben. Auch bei dem Genprodukt an Position 28 handelt es sich um ein Protein mit nicht bekannter Funktion. Es hat eine Sequenzidentität von 47 % Übereinstimmung und einem E-Value von $4e^{-65}$ zum einem Corepressor interacting with RBPJ 1 (CIR 1), bekannt aus *Jatropha curcas*. Diese Corepressoren sind am alternativen Spleißen der pre-mRNA beteiligt (Maita et al., 2005). Es konnten keine bekannten Domänen gefunden werden.

3.4.2 Analyse der Genexpression von ausgewählten Gene aus den Staubblättern männlicher Blüten aus *Vitis sylvestris*

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit den vorhandenen Daten der RNA-Seq-Analysen der Blütenorgandatensätze verglichen. Dabei ergab sich mehrfach eine Übereinstimmung in der Expression. Abbildung 3.13 stellt die Expressionswerte der differenziell exprimierten Gene auf Position 1 (FMO), 5 (RPA) und 28 (Rab7) aus den Staubblättern von *Vitis sylvestris* dar. Alle gemessenen Werte der qRT-PCR, die daraus berechneten Expressionswerte und die entsprechenden NGS-Daten sind in den Tabellen 8-11 des SI-Anhangs aufgeführt.

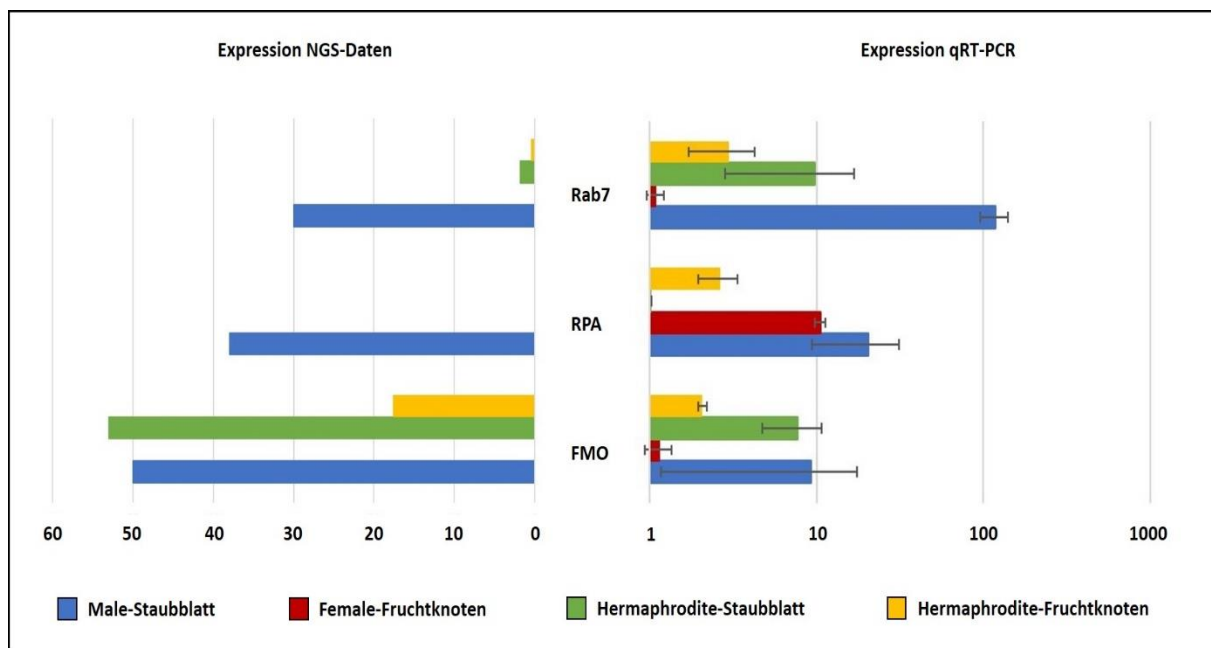


Abbildung 3.13: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus *V.s.*-Staubblatt

Das Gen kodierend für die Flavinabhängige Monooxygenase zeigt in den NGS-Daten eine hohe Expression in den Staubblattgeweben, sowohl in den männlichen als auch eine noch höhere in den hermaphroditischen Individuen. Ebenso kann eine Expression im Fruchtknotengewebe des Hermaphroditen detektiert werden. Die Werte der quantitativen PCR weisen ebenfalls eine Expression in den Staubblattgeweben auf, wobei hier im Hermaphroditen eine geringere Expression im Gegensatz zu den Staubblättern der männlichen Individuen festzustellen ist. Eine Expression wurde in den Fruchtknoten sowohl von *Vitis vinifera* als auch im geringen Maße in den weiblichen Individuen von *Vitis sylvestris* gemessen. Die Expressionswerte beider Gewebe aus *Vitis sylvestris* zeigen allerdings eine hohe Standardabweichung.

Das Gen für das Replikation Protein A zeigt in den bioinformatischen Daten nur in den Staubblättern der männlichen Individuen aus *Vitis sylvestris* eine starke Expression. Mittels qRT-PCR kann darüber hinaus eine Expression in den beiden Fruchtknotengeweben erfasst werden. Die errechneten Werte der RNA-Seq für das für Rab7 kodierende Gen zeigen eine Expression in allen Geweben außer den Fruchtknoten der weiblichen Individuen. Durch die quantitative PCR kann hier zwar eine leichte Expression detektiert werden, die Werte können aufgrund der hohen Standardabweichung aber nicht in die Analyse einbezogen werden.

Die gemessenen Werte der qPCR für das Gen an Position 13, kodierend für eine Polygalakturonase, ergaben zu große Abweichungen in den biologischen Replikaten und daraus resultierende hohe Standardabweichungen, so dass hier keine fundierte Aussage erfolgen kann.

3.4.3 Analyse der Genexpression von ausgewählten Gene aus den Fruchtknoten weiblicher Blüten aus *Vitis sylvestris*

Abbildung 3.14 veranschaulicht die Ergebnisse der Expressionsdaten der DEGs ausgewählt aus den Fruchtknoten der weiblichen Individuen. Eine Expression in den beiden Fruchtknotengeweben bei dem Gen kodierend für das Cell Division Control Protein zeigt sich sowohl in den NGS-Daten als auch in den Messungen der qRT-PCR. Hier kann aber auch eine leichte Expression in beiden Staubblattgeweben detektiert werden. Dabei zeigen die Daten der Staubblätter aus *Vitis vinifera* eine hohe Standardabweichung.

Das GTP-Binding Protein ist im Fruchtknotengewebe der weiblichen Individuen laut quantitativer PCR weniger stark exprimiert als angenommen. Im Fruchtknotengewebe aus *Vitis vinifera* ist das Gen umso stärker exprimiert. Eine Expression in diesem Gewebe konnte durch die RNA-Seq nicht berechnet werden. Des Weiteren zeigen beide Gene in den qPCR-Daten eine Expression in den Staubblattgeweben der männlichen und hermaphroditischen Blüten. Für die beiden anderen ausgewählten Gene, kodierend für ein Protein mit unbekannter Funktion (Unnamed Protein Product) sowie für eine Epoxidase, konnte keine Analyse vorgenommen werden.

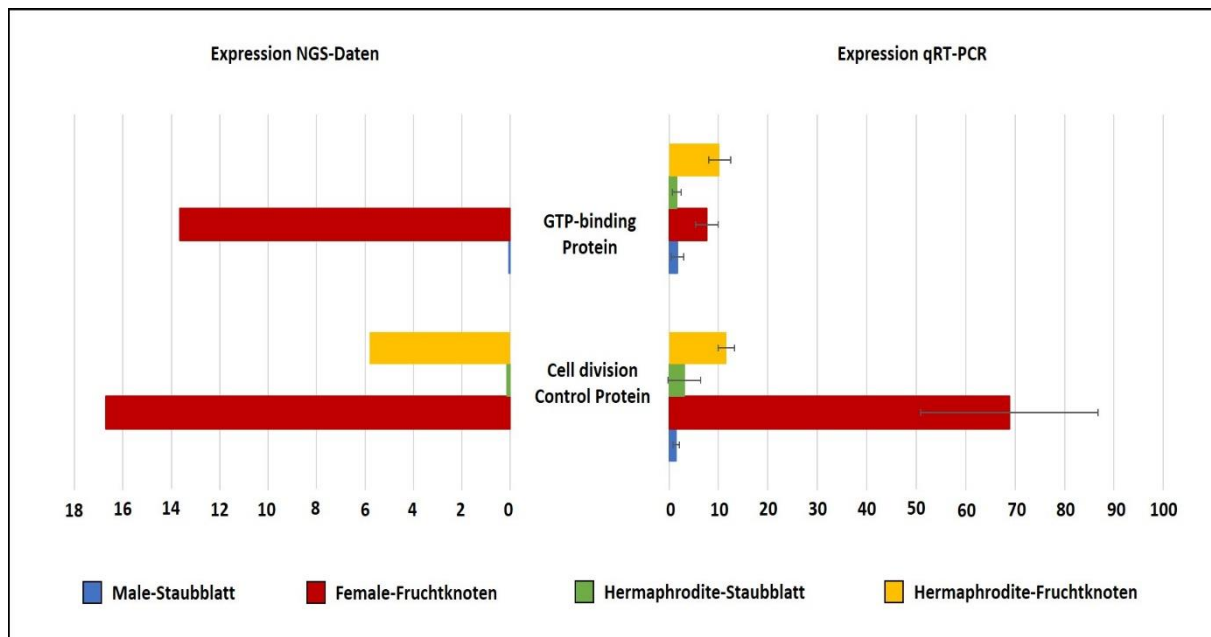


Abbildung 3.14: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.s.-Fruchtknoten

3.4.4 Analyse der Genexpression der ausgewählten Gene aus den hermaphroditischen Staubblättern

In der folgenden Abbildung ist die Expression der Gene an Position 1 (Cytochrom P450) und 13 (Unnamed Protein Product) aus dem Staubblattgewebe der hermaphroditischen Individuen dargestellt (Abbildung 3.15). Eine Expression von Cytochrom P450 kann durch die quantitative PCR, im Gegensatz zu den NGS-Daten, auch in den beiden Fruchtknotengewebe detektiert werden. Das Protein mit unbekannter Funktion zeigt in den qPCR-Daten in allen vier untersuchten Geweben eine sehr ähnliche Expression, wie die berechneten Expressionswerte durch die RNA-Seq mit den NGS-Daten. Allerdings ist hier in den Fruchtknotengewebe sowohl der weiblichen als auch der hermaphroditischen Blüten eine hohe Standardabweichung berechnet worden, so dass diese Werte nicht berücksichtigt werden.

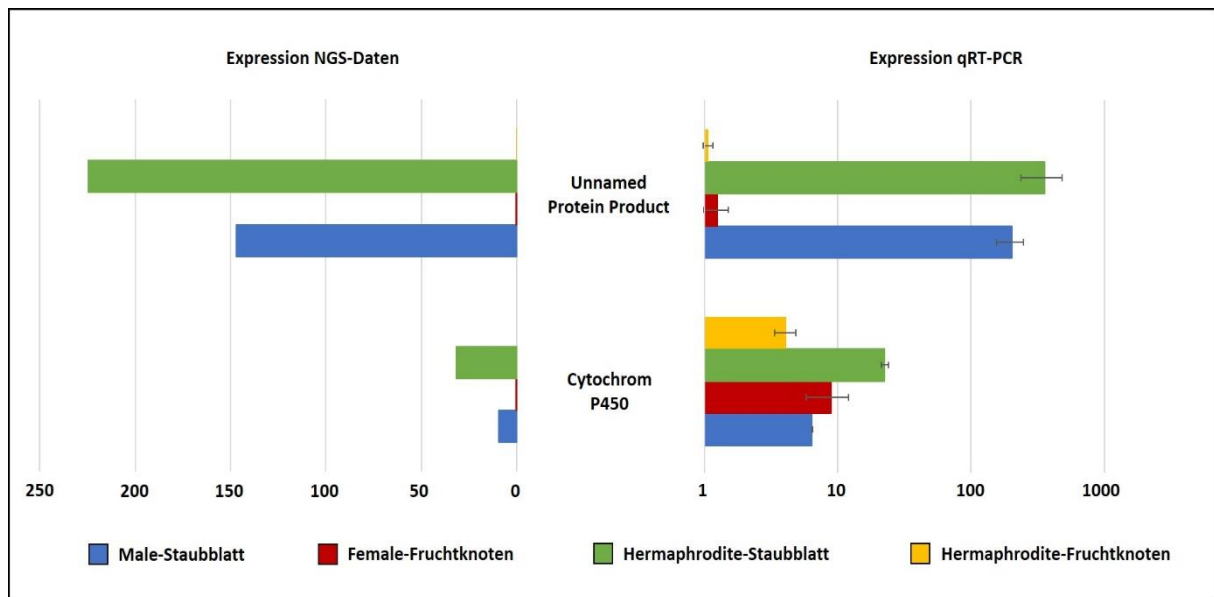


Abbildung 3.15: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus *V.v.*-Staubblatt (1)

Das Ergebnis der qRT-PCR des Gens kodierend für die Geranylgeranyltransferase bestätigt nicht durchgehend die erwarteten Expressionen. Auch hier konnte durch die quantitative PCR eine Expression in beiden Fruchtknotengewebe detektiert werden (Abbildung 3.16). Aufgrund der Skalierung ist die Expression in den Fruchtknoten aus *Vitis vinifera* schlecht zu erkennen. Eine vollständige Darstellung ist in Tabelle 11 im SI-Anhang zu finden. Sehr auffällig ist ebenfalls, dass die gemessenen Expressionswerte der qPCR viel höher sind als die Berechnung der Expressionswerte der RNA-Seq.

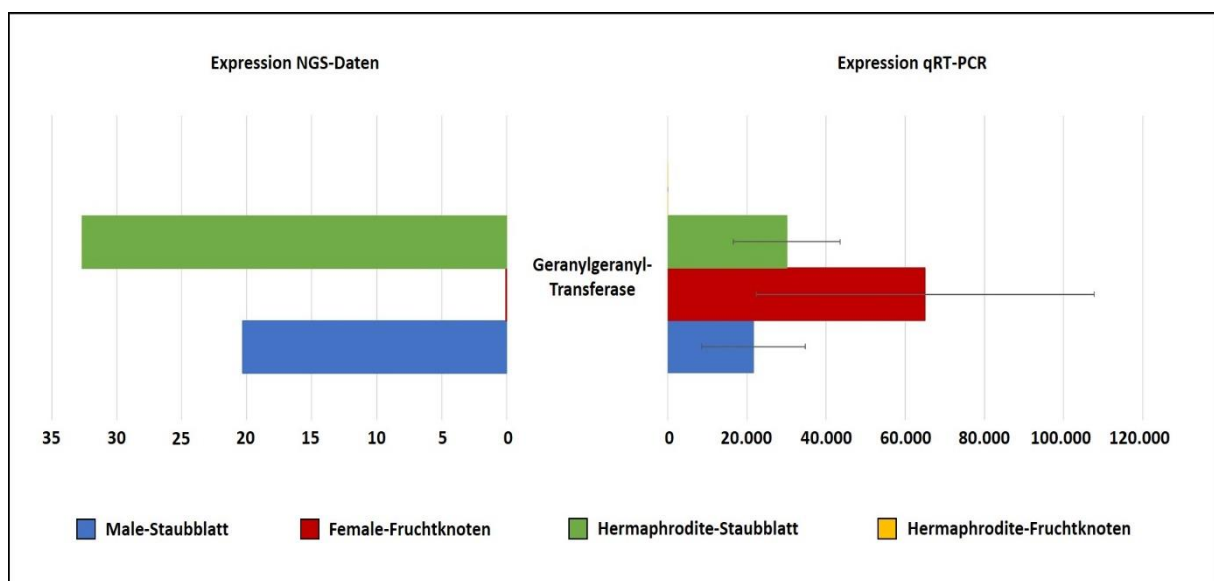


Abbildung 3.16: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus *V.v.*-Staubblatt (2)

3.4.5 Analyse der Genexpression der ausgewählten Gene aus den hermaphroditischen Fruchtknoten

Abbildung 3.17 illustriert die Expressionswerte der am höchsten differenziell exprimierten Genes in den Fruchtknoten aus *Vitis vinifera* (Defensin). Wie schon durch die NGS-Daten berechnet, kann auch in der qRT-PCR eine Expression in beiden untersuchten Fruchtknotengeweben gemessen werden. Weiterhin zeigt sich durch die quantitative Messung eine Expression in den beiden Staubblattgeweben. Dabei werden die Werte der Staubblätter der hermaphroditischen Individuen bei der Analyse vernachlässigt, da hier eine zu hohe Standardabweichung berechnet wurde.

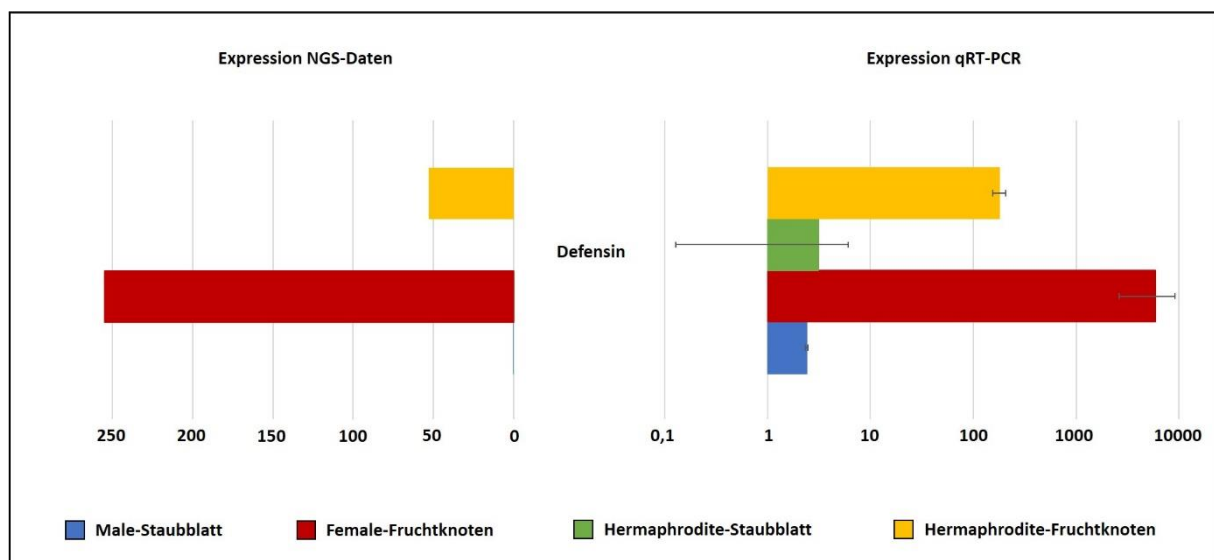


Abbildung 3.17: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus *V.v.*-Fruchtknoten (1)

Bei den Genen an Position 5 (Transparent Testa) und Position 28 (Unnamed Protein Product 2) zeigt sich, wie auch schon in den NGS-Daten, eine deutliche Expression in den beiden Fruchtknotengeweben von *Vitis sylvestris* und *Vitis vinifera* (vgl. Abbildung 3.18). In beiden Genen konnten auch Expressionen in den Staubblattgeweben durch die quantitative PCR gemessen werden, die in den Geweben der hermaphroditischen Individuen etwas höhere Werte zeigt als durch die RNA-Seq berechnet. Die Werte der Staubblätter der männlichen Blüten des Gens kodierend für das Proteinprodukt mit unbekannter Funktion (Unnamed Protein Product_2), werden aufgrund der hohen Standardabweichung nicht betrachtet.

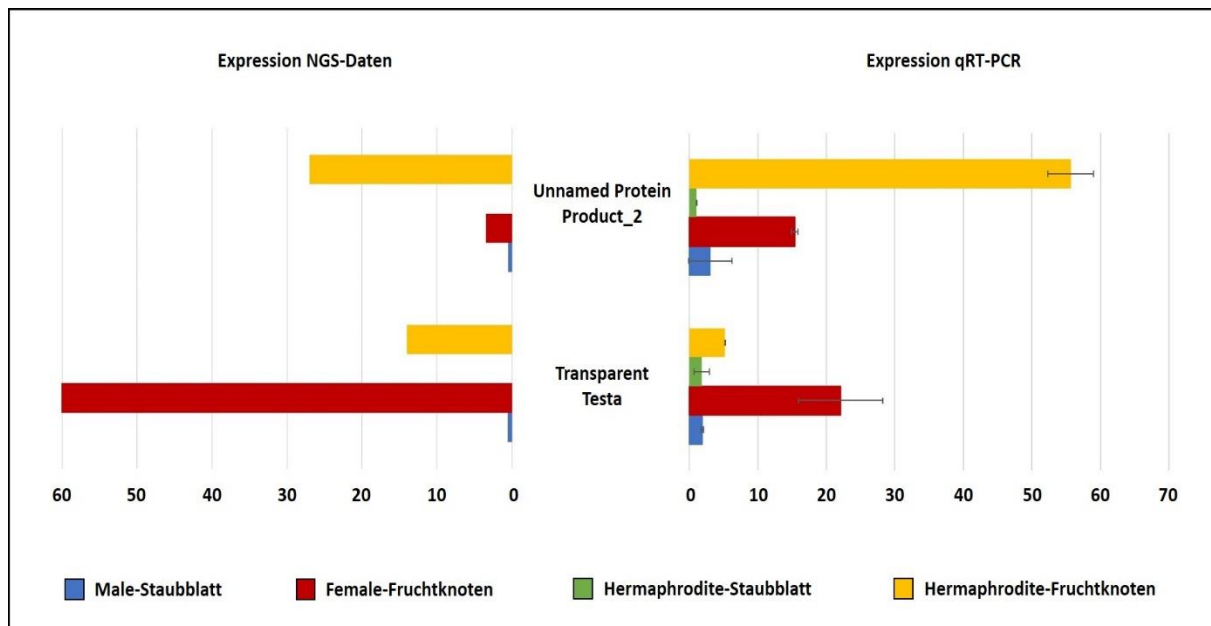


Abbildung 3.18: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus *V.v.*-Fruchtknoten (2)

3.5 Geschlechtsbestimmende Region von Fechter et al.

Auf Grundlage einer vorangegangenen Arbeit über die elf potenziellen Kandidatengene (Ding, 2013) der von Fechter et al. (2012) benannten geschlechtsbestimmenden Region wurden weitere Analysen über fehlende Sequenzinformationen durchgeführt. Die 143 kb große Region wurde mithilfe von Kopplungsanalysen an den Sequenzen von BAC-Klonen lokalisiert.

3.5.1 Aufklärung der Sequenz der 34 kb-Lücken in der geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al.

Aufgrund des „Entwurf-Charakters“ des verwendeten Referenzgenoms befindet sich neben neun kleineren Lücken mit Größen zwischen 100 bp und etwas über 2 kb eine Lücke ohne Sequenzinformation mit einer Länge von fast 34 kb im letzten Drittel der Region. Diese liegt ungefähr zwischen der Position 4.991.000 und 5.011.000 in PN40024 Version 0 (siehe Abbildung 3.19).

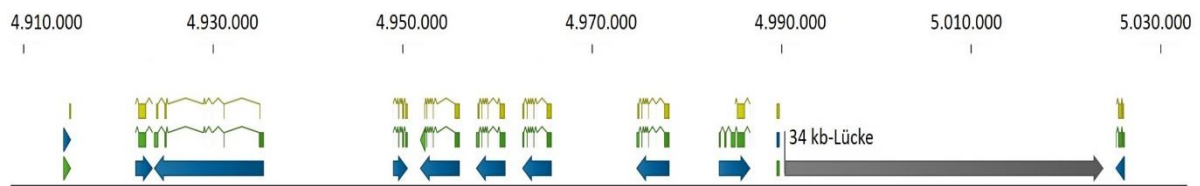


Abbildung 3.19: Lage der 34 kb-Lückenregion in der geschlechtsbestimmenden Region

Wegen der annotierten Größe der Lücke ist es möglich, dass sich dort unbekannte Genbereiche befinden, welche ebenfalls eine Beteiligung an der Geschlechtsbestimmung in *Vitis* haben könnten. Für die Aufklärung der Lückensequenz wurden unterschiedliche Methoden angewandt: Zum einen wurde versucht, mittels Inverser PCR auf genomische DNA aus Blättern (vgl. 2.2.8.1) die Sequenz an den Randbereichen zu entschlüsseln, zum anderen konnten durch Contigs aus dem von Velasco et al. veröffentlichten Referenzgenom größere Bereiche aufgefüllt werden. Eine weitere Quelle waren die bioinformatischen Daten von Diplombiologin Sabine Fischer (IMSB, Mainz). Diese sind durch Illumina-Sequenzierung des Genoms von Individuen aus *Vitis sylvestris* vom Standort Hördt entstanden. Die folgende Abbildung veranschaulicht, wie die fehlende Sequenzinformation mit Hilfe der unterschiedlichen Methoden aufgeklärt werden konnte.

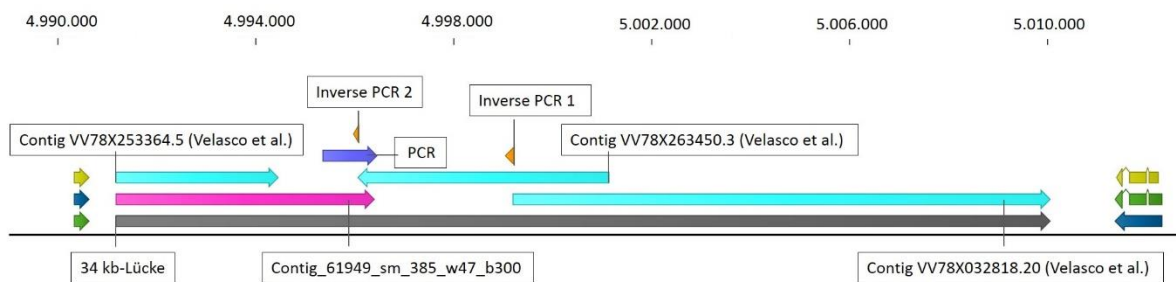


Abbildung 3.20: Arbeitsvorgang für die Aufklärung der Sequenzinformation in der 34 kb-Lückenregion

Die Randsequenzen der Lückenregion sind sowohl durch Contigs aus dem Pinot Noir-Genom (Velasco et al., 2007) als auch durch einen etwas längerer Contig aus der Illumina-Sequenzierung von *Vitis sylvestris* aus Hördt (Contig_61949) mit einer Länge von ca. 5 kb aufgefüllt worden. Ein Nachteil der Contigs aus dem veröffentlichten Genom von Velasco ist die oft nicht eindeutige Basensequenz-Information. Die Verlängerung des Contigs VV78X032818.20 (knapp 11 kb) erfolgte mithilfe von Inverser PCR (Inverse PCR 1), um in die unbekannte Sequenzregion zu gelangen (vgl. Abschnitt 2.2.8.1). Ebenso wurde ein weiterer

Contig von Velasco mit einer Länge von etwa 5 kb kartiert (VV78X263450.3), welcher einen Überlapp mit dem vorangegangenen Contig zeigt. Auch am Ende dieses Contigs konnte ein Stück Sequenzinformation mithilfe Inverser PCR (Inverse PCR 2) ermittelt werden. Die Größe der entschlüsselten Bereiche beträgt am linken Rand etwa 5 kb und, ausgehend vom rechten Rand mit den verschiedenen Contigs und PCRs, etwa 14 kb. Basierend auf der Größe der Lücke im Referenzgenom wurden bis zu diesem Zeitpunkt etwa 2/3 der Sequenz entschlüsselt. Eine Assemblierung des Contigs_61949 mit dem Contig VV78X26350.3 lässt allerdings darauf schließen, dass es an dieser Stelle bereits zu einer Überlappung dieser beiden Contigs kommt. Der Nachweis wurde mithilfe einer PCR mit genomischer DNA als Template erbracht. Somit hat die Lückenregion eine Größe von fast 19 kb und ist damit kleiner als in der Referenz angegeben.

Nachdem die vollständige Sequenz der Lücke entschlüsselt werden konnte, wurde anschließend die bioinformatische Analyse dieses Bereichs durchgeführt. Zunächst wurden mittels ORF („*open reading frame*“)-Suche (vgl. 2.4.5) die offenen Leserahmen bestimmt, welche einen Anhaltspunkt für die Lage möglicher Genbereiche ergeben. Insgesamt konnten in dem Lückenbereich und den Randregionen elf potenzielle ORFs gefunden werden (Abbildung 3.21), sechs davon auf dem Minus-Strang und fünf auf dem Plus-Strang orientiert.

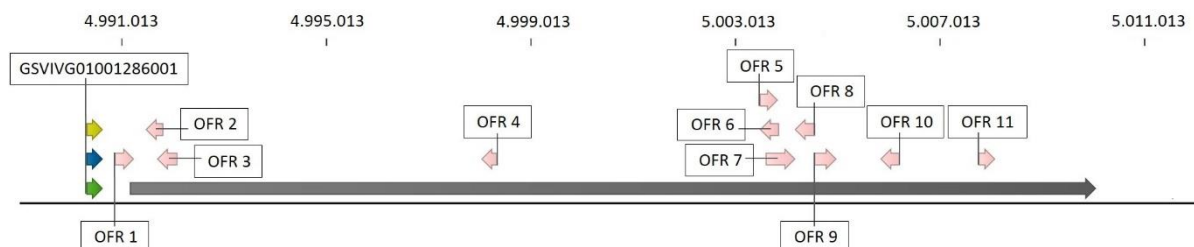


Abbildung 3.21: Lage der vorhergesagten ORFs in der 34 kb-Lückenregion

Die identifizierten ORFs wurden daraufhin mithilfe des BLASTx-Tools analysiert, ob Informationen über ihre potenziellen Funktionen oder Homologien zu anderen bekannten Genen/Protein vorhanden sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 aufgelistet.

Tabelle 3.12: Übersicht über die Lage und BLAST-Treffer der identifizierten ORFs

ORF	Start	Ende	Strang	BLAST-Treffer	Identität
1	4.990.873	4.991.247	Plus	Deoxyribodipyrimidine - Photolyase [<i>Methylo Marinum vadi</i>]	35 %
2	4.991.479	4.991.823	Minus	Galectin-8-like [<i>Myotis lucifugus</i>]	29 %
3	4.991.702	4.992.100	Minus	Transporter [<i>Stomatobaculum longum</i>]	36 %
4	4.998.044	4.998.352	Minus	/	
5	5.003.486	5.003.839	Plus	Adeninphosphoribosyltransferase 3, [<i>Vitis vinifera</i>]	100 %
6	5.003.491	5.003.865	Minus	Adeninphosphoribosyltransferase 3, [<i>Vitis vinifera</i>]	99 %
7	5.003.602	5.004.180	Plus	Adeninphosphoribosyltransferase 3, [<i>Vitis vinifera</i>]	99 %
8	5.004.173	5.004.568	Minus	Adeninphosphoribosyltransferase 1, [<i>Vitis vinifera</i>]	96 %
9	5.004.554	5.004.985	Plus	cytochrome C biogenesis protein [<i>Arcticibacter svalbardensis</i>]	33 %
10	5.005.848	5.006.222	Minus	Hypothetical Protein BRAFLDRAFT [<i>Branchiostoma</i>]	39 %
11	5.007.763	5.008.089	Plus	unnamed protein product [V. <i>vinifera</i>]	56%

Bei den ersten drei ORFs zu Beginn des Lückenbereichs (ORF 1-3) handelt es sich um BLAST-Ergebnisse für Genbereiche, welche aus verschiedenen Bakterien (*Methylo Marinum vadi* und *Stomatobaculum longum*) bekannt sind. Des Weiteren existieren noch Homologien zu einem proteinkodierenden Gen bekannt aus der Mausohrfledermaus (*Myotis lucifugus*). Allerdings haben alle drei Treffer eine Sequenzidentität von unter 40 %. ORF 4 zeigt mit seiner geringen Sequenzlänge keine Homologien zu Genen in der getesteten Datenbank. ORF 5 bis ORF 8 zeigen nahezu perfekte Übereinstimmung mit zwei aus *Vitis vinifera* bekannten Adeninphosphoribosyltransferase (APT). ORF 9 ähnelt zu einem für Cytochrom C

kodierenden Gen aus einem Bakterium (*Arcticibacter soalbardensis*), allerdings hier nur mit sehr geringer Sequenzidentität (33 %). Ein weiterer Bereich lässt geringe Ähnlichkeiten zu einem Gen aus dem Lanzettfischchen (*Branchiostoma*) erkennen, welches für ein noch nicht charakterisiertes Protein kodiert (ORF 10). ORF 11 ist 56 % sequenzidentisch mit einem n proteinkodierenden Gen mit unbekannter Funktion aus *Vitis vinifera*.

Um genauere Erkenntnisse über die Struktur potenzieller Gene in der Region der Lücke zu erhalten, wurden mit jedem der vier Datensätze der Blütenorgane ein „large gap read mapping“ (siehe 2.4.1) durchgeführt. Dabei wurden die einzelnen Datensätze jeweils mit dem Lückenbereich als Referenz abgeglichen. Da jeder der Datensätze ein ähnliches Expressionsmuster aufweist, wird in Abbildung 3.22 nur das Ergebnis des Mappings des Fruchtknoten (FK)- Datensatz der Hermaphroditen (H) aus *Vitis vinifera* var. Weißer Heunisch (713_H_FK) gezeigt. Die verschiedenen Arten von „reads“ sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Rote und grüne Sequenzen sind „single reads“, bei denen der zugehörige Partner entweder beim Qualitätstrimming (siehe Abschnitt 2.3.1) aussortiert wurde oder zu weit entfernt liegt und deshalb nicht in diesem Bereich der Sequenz kartiert werden kann.

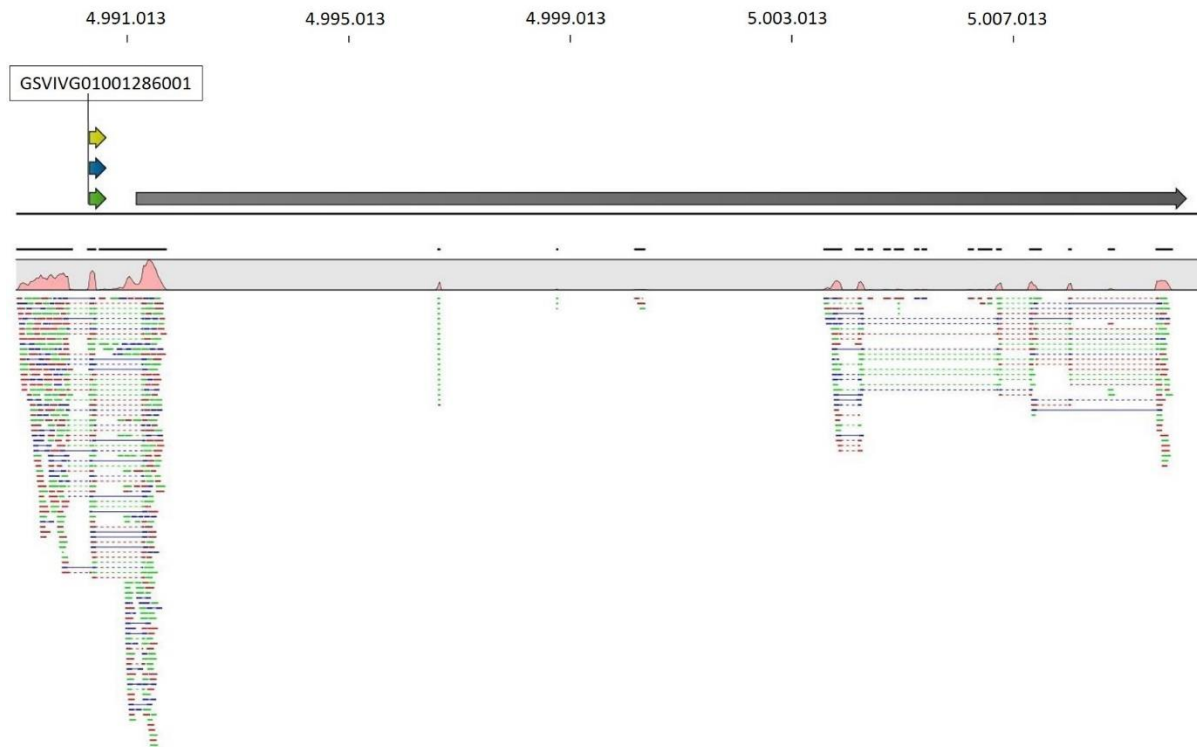


Abbildung 3.22: „large gap read mapping“ vom Datensatz 713 gegen die Lückenregion

Die blauen „reads“ hingegen sind zusammengehörige „paired-end reads“. Die etwas dünneren gestrichelten Linien zwischen den „reads“ kennzeichnen die fehlende Sequenzinformation der cDNA in den Intronbereiche. Somit lässt sich im Bereich des Gens GSVIVG01001286001 eine Exon-Intron-Struktur ausmachen. Ein weiterer nicht annotierter Bereich zwischen den Positionen 5.003.000 und 5.010.000 zeigt ebenfalls eine Exon-Intron-Struktur. In diesem Bereich konnten die ORFs 5-11 lokalisiert werden, welche unter anderem Homologien zu einer Adeninphosphoribosyltransferase erkennen lassen. Weitere Regionen, in denen eine geringe Anzahl an „reads“ gegen die Referenz kartiert sind, konnten nicht genauer charakterisiert werden. Die Ergebnisse der vier Datensätze unterscheiden sich nur in der Höhe der Abdeckung der neuen potenziellen Genbereiche. Der größte Unterschied ergibt sich dabei beim „mapping“ des Datensatzes (710) der Staubblätter (SB) aus dem Hermaphroditen (Abbildung 3.23). Neben einem gut abgedeckten Bereich für die potenzielle Adeninphosphoribosyltransferase sind im Vergleich zu den drei anderen Datensätzen keine weiteren „reads“ und demzufolge auch keine Expression des Gens GSVIVG01001286001 zu detektieren.

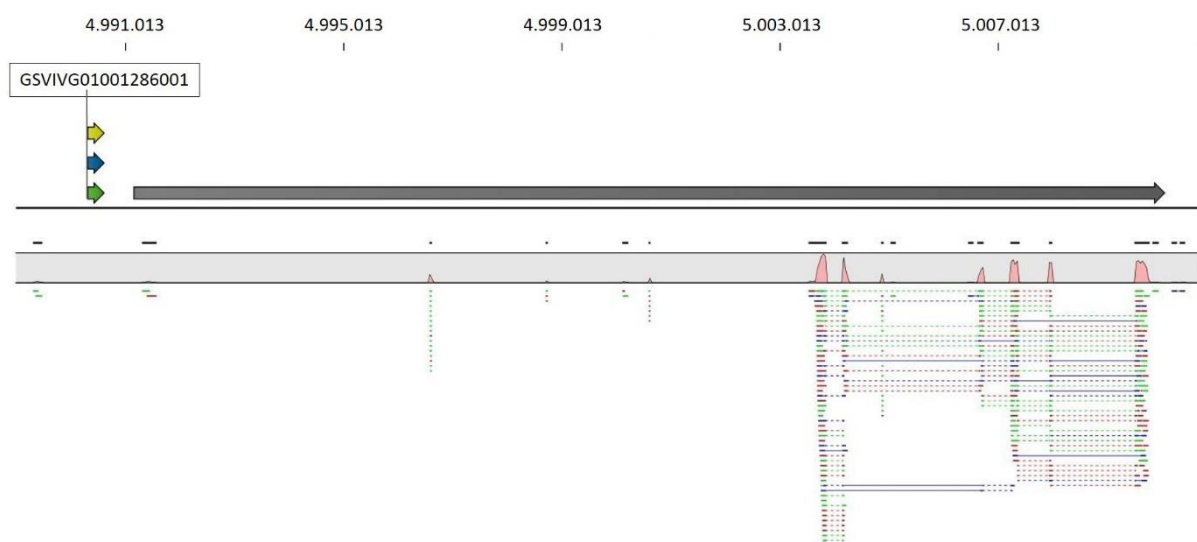


Abbildung 3.23: „large gap read mapping“ vom Datensatz 710 gegen die Lückenregion

Es konnten durch alle „mappings“ keine weiteren transkribierten Abschnitte in der fast 19 kb große Lückenregion identifiziert werden.

3.5.1.1 Adeninphosphoribosyltransferase

Die „large gap read mapping“ der vier verschiedenen Datensätze zeigen im Bereich zwischen Position 5.003.500 und 5.010.000 eine potenzielle Genstruktur mit sehr guter Abdeckung. Laut

NGS-Daten besteht das potenzielle Gen aus sechs Exons und fünf Introns. Diese Region beinhaltet laut BLAST-Analyse des gesamten Bereichs mit einer Sequenzidentität von 99 % einen Treffer für die Adeninphosphoribosyltransferase 3 in *Vitis vinifera*. Zur Verifizierung der Daten wurden mit Intron-überspannenden Primern PCRs mit cDNA aus männlichen, weiblichen und hermaphroditischen Blüten als Template durchgeführt. Dabei liegt der Forward-Primer im ersten Exon und der Reverse-Primer im 3'UTR. Somit überspannt das Primer-Paar das gesamte Gen. Die nachfolgende Abbildung zeigt das „large gap read mapping“ mit je einer Sequenz aus der Sanger-Sequenzierung (siehe Absatz 2.2.12) pro Individuum. Die Sanger-Sequenzen bestätigen die Genstruktur mit 6 Exons, die aus dem „large gap read mapping“ der NGS-Daten vorhergesagt wurde.

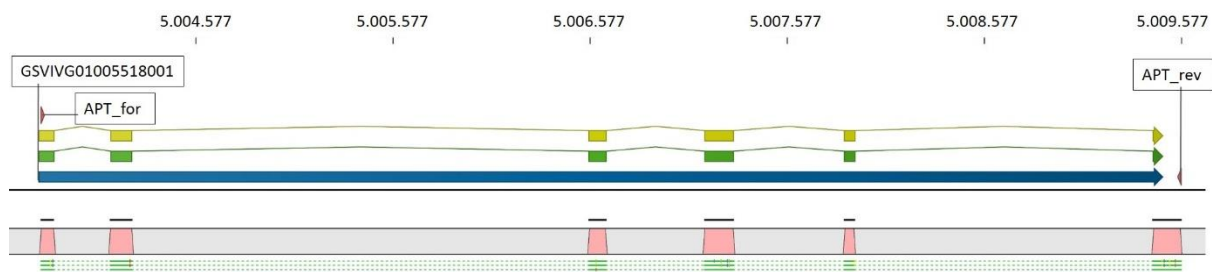


Abbildung 3.24: „large gap read mapping“ der Sanger-Sequenzen aus der RT-PCR

Fechter et al. berichten in ihrer Publikation von einer Tandemrepeat- oder auch Indelregion im zweiten Intron. Diese Indelregion wurde zur Entwicklung eines PCR-Markers verwendet, der die Anwesenheit des weiblichen (F) bzw. des männlichen (M) und hermaphroditischen (H) Allels zeigen soll. Das weibliche Allel enthält nur eine Repeateinheit. Sowohl das hermaphroditische als auch das männliche Allel sollen das Tandemrepeat enthalten und sind somit nicht durch die Größe des PCR-Produkts zu unterscheiden. Nach dem 3-Allel-Modell ist dabei das männliche Allel dominant über das hermaphroditische und dieses wiederum über das weibliche Allel. Somit kann es nur bei einem homozygot-rezessiven Genotypen zur Ausprägung des weiblichen Zustandes kommen (Antcliff, 1980). Auf Grundlage der Referenzsequenz des Introns aus PN40024, die aus der Sequenzierung eines hermaphroditischen Individuums entstanden ist, wurde ein Alignment durchgeführt. Mithilfe einer dotplot-Analyse konnte eine Repeatregion am Ende des Introns lokalisiert werden. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung illustriert.

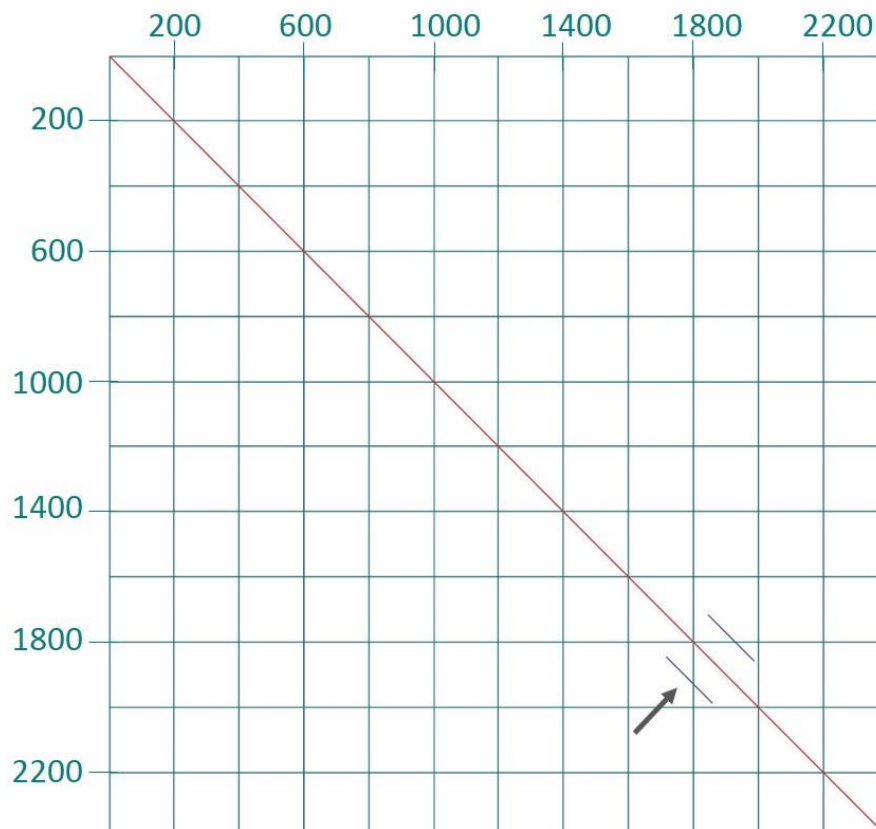


Abbildung 3.25: Dotplot des Alignments der Forward-Sequenz des Introns aus der Referenz PN40024
Im Bereich zwischen 1600 und 2000 bp ist eine Repeatregion in der Sequenz zu erkennen (mit Pfeil gekennzeichnet).

Zu erkennen sind zwei Repeateinheiten, welche nicht vollständig identisch sind, sondern in einigen Basen Unterschiede aufweisen. Die Lage dieser Indel sowie der von Picq et al. (2014) publizierten Primer im zweiten Intron in der Referenzsequenz zeigt die folgende Abbildung.

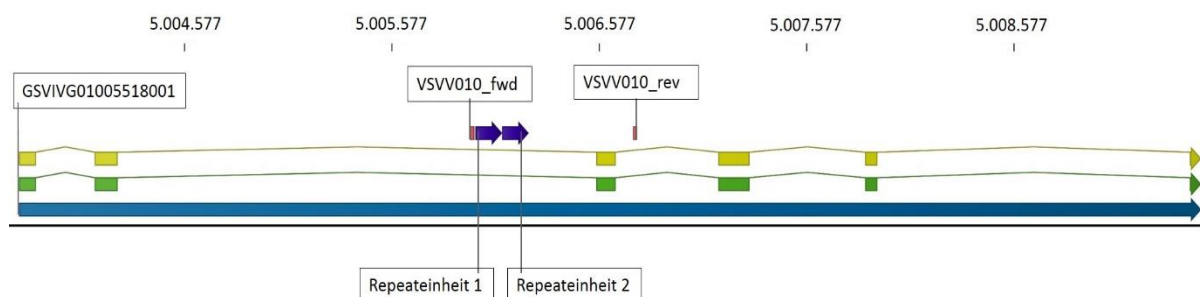


Abbildung 3.26: Lage der Indel sowie des spezifischen Primer-Paars im Gen GSVIVG01005518001

Um die Aussage von Fechter et al. zu verifizieren, dass es sich um eine geschlechtsspezifische Indel handelt, wurden PCRs mit DNA aus verschiedenen Individuen als Template durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei männliche und weibliche Individuen aus *Vitis sylvestris* sowie drei hermaphroditische Individuen aus *Vitis vinifera* getestet. Des Weiteren

wurden noch ein männliches und ein weibliches Individuum der Spezies *Vitis berlandieri*, einer amerikanischen Wildart, untersucht (siehe Tabelle 3.13).

Die publizierten Primer wurden bereits zur Analyse des möglichen geschlechtsspezifischen Indel verwendet. Die Lage der Primer zu den Indel ist ebenfalls in Abbildung 3.26 zu sehen. Die PCR erfolgte auf genomische DNA, isoliert aus jungen Blättern (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Größe der erwarteten PCR-Produkte beträgt laut Referenzsequenz für das männliche/hermaphroditische Allel mit beiden Repeats 812 bp. Das PCR-Fragment des weiblichen Allels hingegen soll 128 bp kleiner sein und somit eine Größe von 648 bp haben. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.6.2) aufgetrennt (siehe Abbildung 3.27).

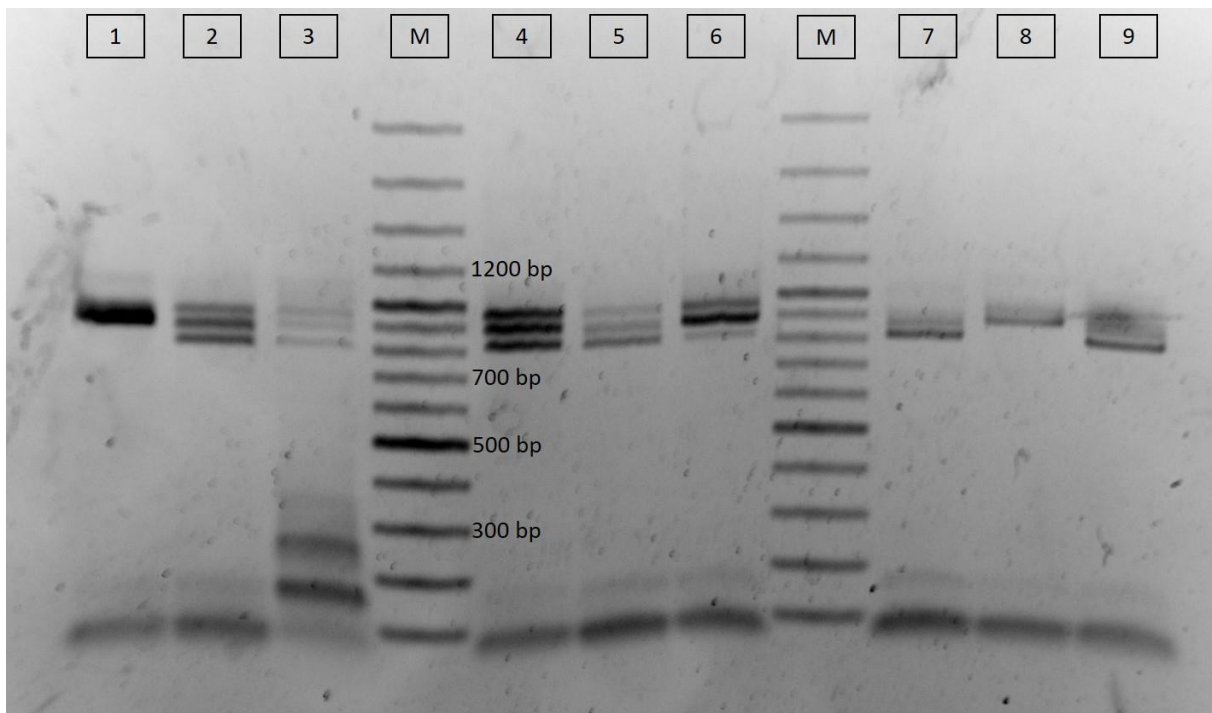


Abbildung 3.27: Ergebnis der PCR mit den VSVV010-Primern

Spur 1: *Vitis berlandieri* ♂; Spur 2: *Vitis sylvestris* Alba ♂; Spur 3: *Vitis sylvestris* Hördt Klon 29 ♂; Spur 4: *Vitis vinifera* var. Grüner Silvaner; Spur 5: *Vitis vinifera* var. Ruländer; Spur 6: *Vitis vinifera* var. Weißer Heunisch; Spur 7: *Vitis sylvestris* Ketsch Nr.6 ♀; Spur 8: *Vitis berlandieri* ♀; Spur 9: *Vitis sylvestris* Ketsch Klon 53 ♀; Spur M: 100 bp plus-Marker

Zunächst einmal fällt auf, dass alle PCR-Produkte eine abweichende Größe aufweisen, als laut Referenz anzunehmen. Die Spuren 1-3 zeigen alle PCR-Produkte der DNA aus männlichen Individuen. In Spur 1 (*Vitis berlandieri* ♂) ist ein PCR-Produkt mit einer Größe von etwa 900 bp vorhanden. Dies stellt vermutlich das PCR-Fragment für das männliche/hermaphroditische Allel dar. Die PCRs der DNA zweier männliche Individuum in Spur 2 (*Vitis sylvestris* Alba ♂)

und Spur 3 zeigen wider Erwarten 3 Banden: 1. die Bande bei etwa 900 bp, 2. bei 800 bp und 3. bei etwa 950 bp. Bei der 2. Bande handelt es sich wahrscheinlich um das Produkt des weiblichen Allels, da bei zwei der weiblichen Individuen in Spur 7 und Spur 9 ebenfalls diese Bande sichtbar ist.

Die Spuren 4-6 zeigen die PCR-Produkte mit der DNA aus hermaphroditischen Blüten als Template. Auch hier sind die drei oben benannten Banden zu sehen. Die weiblichen Individuen in Spur 7 und 9 haben jeweils nur eine Bande bei etwa 800 bp, das weibliche Allel. Die PCR mit der DNA aus den weiblichen Blüten aus *Vitis berlandieri* als Template enthält ebenfalls nur eine Bande, allerdings auf Höhe von 900 bp.

In allen Spuren findet sich eine intensivere Bande bei weniger als 100 bp sowie eine weitere, schwächere Bande bei ca. 200 bp, vermutlich Primer-Dimere. In Spur 3 sind im Bereich zwischen 100 bp und 300 bp noch zwei weitere Banden erkennbar, bei denen es sich aber wahrscheinlich nicht um geschlechtsspezifische Produkte handelt. Eine Übersicht der sequenzierten Individuen und der aus den PCR-Ergebnissen abgeleiteten Allelkombinationen der Genotypen ist in der folgenden Tabelle veranschaulicht.

Tabelle 3.13: verwendete Individuen für die DNA-Isolierung aus Blättern mit dem dazugehörigen Genotyp. Dabei bezeichnet M das männliche Allel, H das hermaphroditische sowie F das weibliche Allel.

(Sub)Spezies	Geschlecht	Bezeichnung	Genotyp
<i>Vitis sylvestris</i>	Männlich	Alba	MF
<i>Vitis sylvestris</i>	Männlich	Hördt Klon 29	MF
<i>Vitis sylvestris</i>	Weiblich	Ketsch Nr. 6	FF
<i>Vitis sylvestris</i>	Weiblich	Ketsch Klon 53	FF
<i>Vitis vinifera</i>	Hermaphrodit	Weißer Heunisch	HF
<i>Vitis vinifera</i>	Hermaphrodit	Ruländer	HF
<i>Vitis vinifera</i>	Hermaphrodit	Grüner Silvaner	HF
<i>Vitis berlandieri</i>	Männlich		MM/MH

Bei der Assemblierung der Sanger-Sequenzen des PCR-Produkts von *Vitis vinifera* Ketsch Klon 53 (♀) gegen die Referenzsequenz PN40024 fällt auf, dass wider Erwarten beide Repeats abgedeckt sind und bis auf Individuen-spezifische SNPs keine Unterschiede zur Referenz festgestellt werden können (siehe Abbildung 3.28).

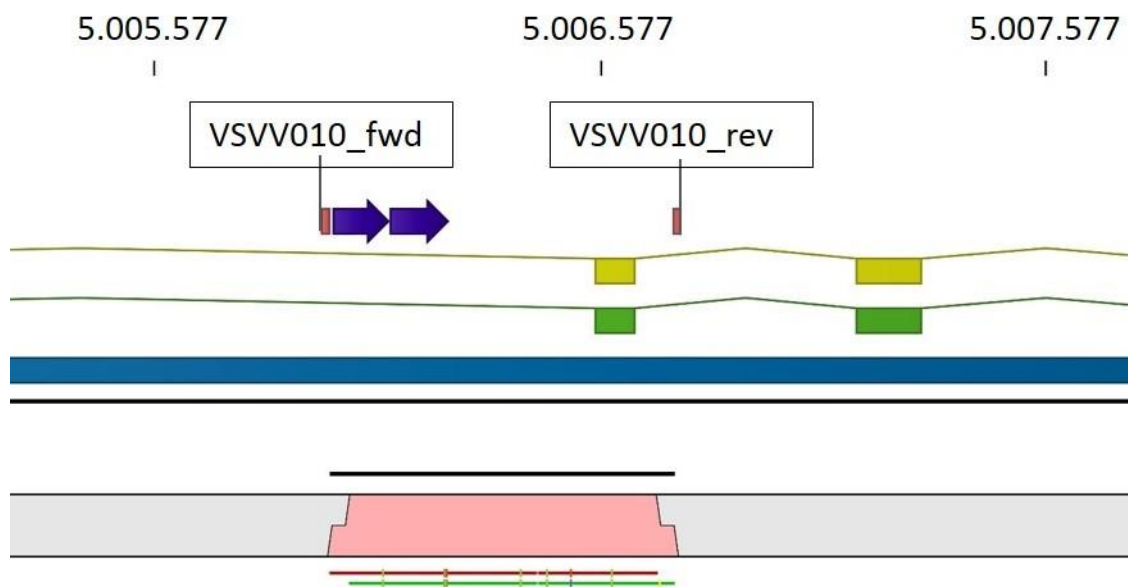


Abbildung 3.28: Assemblierung der Sequenzen aus *Vitis sylvestris* Ketsch Klon 53 ♀
Die grüne Linie steht für die Forward-Sequenz, die rote Linie für die Reverse-Sequenz des PCR-Produkts.

Einen Unterschied zur Referenzsequenz zeigt sich allerdings in den Sequenzen des männlichen bzw. hermaphroditischen Allels. Dabei sind, wie schon bei den Sequenzen des weiblichen Individuums, beide Repeateinheiten vorhanden. Allerdings kann noch eine 70 bp lange Insertion identifiziert werden. Diese befindet sich direkt „downstream“ des angeblichen geschlechtsspezifischen Tandemrepeats (siehe Abbildung 3.29). Bei *Vitis sylvestris* Alba ♂ wurden zwei Klone sequenziert, die einmal das Fragment des weibliche Allels und einmal das Fragment des männlichen Allels enthalten. Ebenso wurde vom Individuum *Vitis vinifera* var. Weißer Heunisch sowohl das weibliche als auch das hermaphroditische Allel sequenziert.

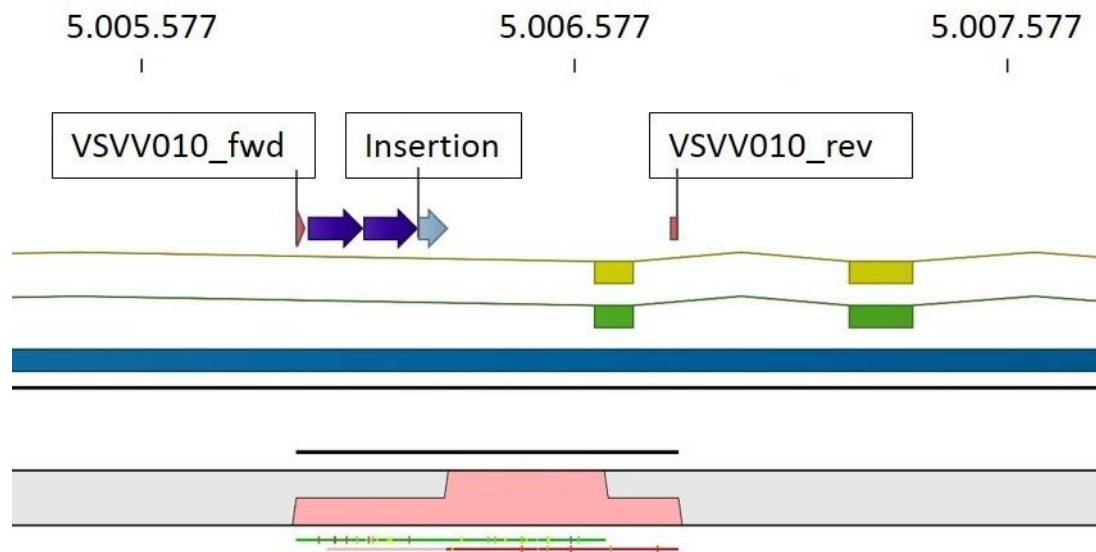


Abbildung 3.29: Assemblierung der cDNA-Sequenzen aus *Vitis sylvestris* Alba ♂

Die grüne Linie zeigt die Sequenz des männlichen, die rote Linie die Sequenz des weiblichen Allels.

Die vorangestellte Abbildung enthält nur die Assemblierung der Sequenz (grün) aus dem männlichen Individuum gegen die Referenzsequenz als Beispiel, da bis auf artspezifische SNPs keine Unterschiede zum Ergebnis des Hermaphroditen festzustellen sind. Die Sequenz des männlichen/hermaphroditischen Allels deckt sowohl beide Repeateinheiten der geschlechtsspezifischen Indel als auch eine 70 bp lange Insertion ab. Das weibliche Allel hingegen zeigt, ausgehend vom Reverse-Primer bis zur Insertion, eine Übereinstimmung mit der Referenzsequenz. Ab der Insertion endet die Sequenzübereinstimmung (Linie schwach rot).

3.5.1.2 Aufklärung der Struktur des Gens GSVIVG01001286001

Aufgrund der neu erhaltenen Sequenzinformation aus der Lückenregion der „Fechter-SDR“ wurden „large gap read mapping“ durchgeführt. Im Randbereich kann dadurch ein Unterschied in der Struktur des Gens GSVIVG01001286001 ausgemacht werden. Es handelt sich hierbei um ein Gen, welches für einen WRKY-Transkriptionsfaktor kodiert. Die Annotation dieses Gens in der Referenzsequenz offenbart lediglich ein Exon, ohne weitere Introns. Aufgrund der Ergebnisse der „mappings“ kann davon ausgegangen werden, dass es, im Gegensatz zur Annotation, eine Exon-Intron-Struktur aufweist. Um die Struktur, vorhergesagt durch die bioinformatische Analyse, zu bestätigen, wurde eine PCR (2.2.8) auf cDNA ganzer Blüten durchgeführt. Dabei wurden cDNA von männlichen, weiblichen und zwittrigen Blüten als Template verwendet und die PCR-Produkte anschließend mittels Sanger-Sequenzierung

entschlüsselt. Die Sequenzen wurden danach ebenfalls mithilfe des „large gap read mappings“ mit der Referenz verglichen (vgl. Abbildung 3.30, A).

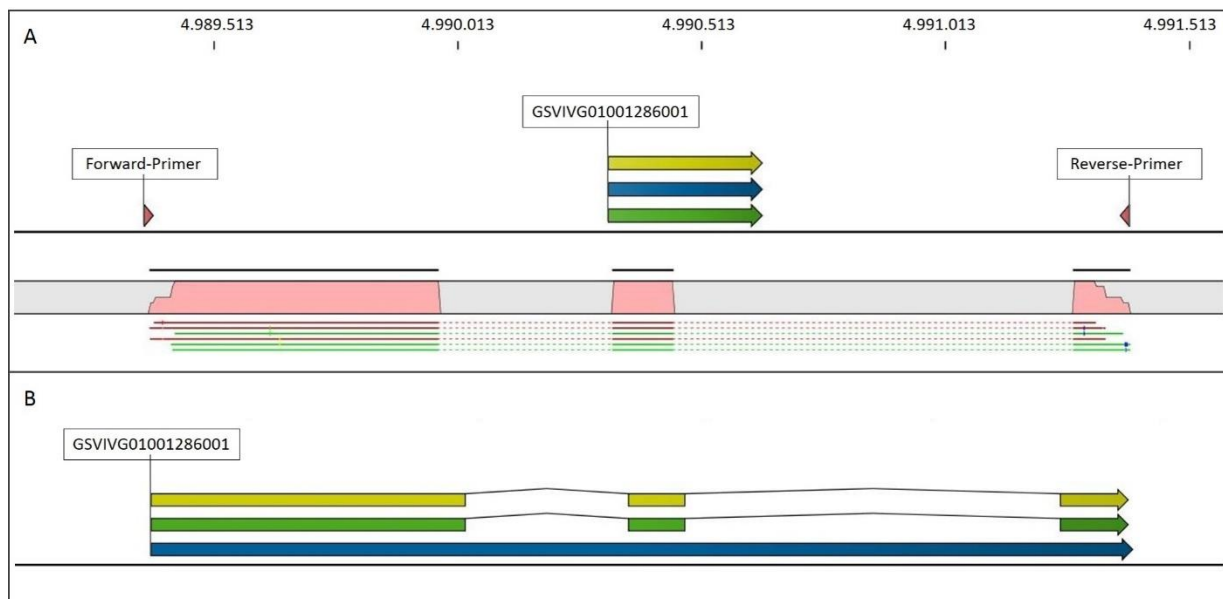


Abbildung 3.30: GSVIVG01001286001, kodierend für einen WRKY-Transkriptionsfaktor

A: „large gap read mapping“ der cDNA-Sequenzen gegen die annotierte Referenzsequenz aus PN40024. **B:** Finale Annotation aufgrund der cDNA-Sequenzen.

Die Assemblierung zeigt jeweils eine Forward-Sequenz (grün) und eine Reverse-Sequenz (rot) der drei verschiedenen Geschlechter. Diese sind über zwei Introns gespleißt. Nach der Identifikation eines Start- und Stoppkodons konnte ein durchgehender Leserahmen für dieses Gen bestehend aus drei Exons annotiert werden (siehe Abbildung 3.30, B).

4. Diskussion

4.1 Einfluss der Entnahmezeitpunkte und Materialverarbeitung

RNA-Analysen zur Bestimmung des Genexpressionsniveaus in verschiedenen Geweben sind unter anderem von den Entnahmezeitpunkten und der Qualität des Materials abhängig. Deshalb wurde bereits bei der Blütenentnahme auf dem Wingert darauf geachtet, dass alle Blüten gleich behandelt wurden, um eine Veränderung der Genexpression durch unbeabsichtigtes Hinzufügen verschiedener Stimuli zu vermeiden (León et al., 2001). Ein häufiger Grund für eine RNA-Degradation ist der Anstieg der Anzahl an RNasen oder RNA-degradierenden Komponenten durch Verletzung des Gewebes (Logemann et al., 1987). Die Blüten wurden deshalb direkt nach dem Abnehmen vom Rebstock mit Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Verwendung auf -80 °C gelagert. Ein schnelles Einfrieren bei niedrigen Temperaturen verhindert die Bildung von Eiskristallen, welche das Gewebe ebenfalls schädigen könnten (Knox, 1970). Bei der RNA-Isolierung wurde auf ein zügiges Arbeiten bei niedrigen Temperaturen geachtet. Ein Auftauen der Proben kann zum einen zur Degradation der RNA führen, zum anderen kann auch hier die Genexpression noch beeinflusst werden (Botling et al., 2009). Mögliche Unterschiede in der Qualität der RNA, welche in dieser Arbeit über den RIN-Wert bestimmt wurde, können bei der Konstruktion der cDNA-Bibliotheken starke Auswirkungen haben. Eine hohe Qualität der Total-RNA ist Voraussetzung dafür, dass durch die Sequenzierung Transkripte aller exprimierten Gene erreicht werden (Gasic et al., 2004). Weiterhin hat die RNA-Qualität auch Einfluss auf die weiterführenden Experimente wie die quantitative Real Time-PCR. Die Messung des C_p („*crossing point*“) bzw. des C_t („*cycle threshold*“)- Wertes korreliert mit der RNA-Qualität. Je niedriger sie ist, umso höher sind die Schwellenwerte (Fleige & Pfaffl, 2006). Für die RNA-Isolierung wurden die isolierten geschlechtsspezifischen Organe je eines Individuums der männlichen, weiblichen oder hermaphroditischen Blüten gepoolt, um eine Variabilität in der Genexpression der einzelnen Blüten, z.B. aufgrund nicht offensichtlicher Schäden, auszugleichen (Pina et al., 2005).

Auch unterschiedliche Entnahmezeitpunkte der Blüten können Konsequenzen für die Genexpression haben. In erster Linie wurde daher Wert darauf gelegt, dass sich alle Blüten möglichst im selben Entwicklungsstadium befinden. Zu Beginn der Anthese wird die

Kalyptra, welche die Geschlechtsorgane zunächst bedeckt, durch deren Wachstum verdrängt (Lebon et al., 2008). Bei der Entnahme wurde darauf geachtet, dass sich die Kalyptra noch an der Blüte befand. Damit kann man davon ausgehen, dass sich die Blüte am selben Morgen geöffnet hat. Da sich die meisten Blüten zwischen 7 und 8 Uhr morgens öffnen, erfolgten die Sammlungen zwischen 9 und 10 Uhr, um möglichst viele offene Blüten entnehmen zu können (Shinde et al., 2008). Eine weitere Änderung der Expression kann durch eine bereits eingetretene Bestäubung einiger Blüten hervorgerufen werden. Bei den getrenntgeschlechtlichen Blüten der Wilden Weinrebe kommt es meist zur Fremdbestäubung durch den Wind. Somit ist die Wahrscheinlichkeit kurz nach Öffnen der Blüte relativ gering, aber dennoch vorhanden, da die Stamen bereits vor Abfallen der Kappe die Pollen freigeben können (Hellmann, 2003). Bei den zwittrigen Blüten von *Vitis vinifera* kommt es zu einer Selbstbestäubung (Mullins et al., 1992). Eine vorzeitige Befruchtung sowohl der weiblichen als auch der hermaphroditischen Blüten kann also nicht vollständig ausgeschlossen werden. Analysen von Genen, die an verschiedenen Stoffwechselwegen von Phytohormonen beteiligt sind, zeigten bereits vier Stunden nach Bestäubung eine Änderung der Genexpression (Kühn & Arce-Johnson, 2012). Für eine abgesicherte Aussage über diese Einflüsse wäre die Sequenzierung biologischer Replikate von Nöten. Dies war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht möglich.

4.2 Beurteilung der Daten aus der Illumina-Sequenzierung

In dieser Arbeit wurde für eine umfassende Transkriptomanalyse der geschlechtsspezifischen Organe in Weinblüten die Illumina Hochdurchsatzsequenzierung gewählt. Sequenzierungen mittels Next Generation Sequencing (NGS) zählen inzwischen zu den Standardmethoden für eine grundlegende Sequenzbestimmung. Unter Verwendung des HiSeq2000 können bis zu 600 GB Daten mit bis zu 180 Millionen „reads“ pro Lauf generiert werden, mit neueren Modelle innerhalb von circa 30 Stunden (Buermans & den Dunnen, 2014). Bei einer Fehlerrate von etwa 0,1 % stellt Illumina eine der zuverlässigsten Sequenzierverfahren dar (Glenn, 2011). Die Grundlage für eine globale Transkriptomanalyse bildet die Abdeckung („coverage“) der exprimierten Gene. Umfassende Aussagen über differenzielle Genexpressionen können nur getroffen werden, wenn ein nahezu vollständiges Profil der exprimierten Gene vorhanden ist. Die Forschungsgruppe um Benjamin Blencowe hat anhand menschlicher Zelllinien

untersucht, wie hoch die jeweilige Anzahl an „reads“ für verschiedene Transkriptomanalysen sein muss (siehe Abbildung 4.1). Dabei wird zwischen einer globalen Transkriptomanalyse zur Erstellung von Expressionsprofilen und der Analyse von Spleißvarianten unterschieden. Es zeigte sich, dass mit etwa 50 Millionen „reads“ über 95 % der exprimierten Gene dargestellt werden können. Die Datensätze der verschiedenen Blütenorgane sind folglich ausreichend groß, um vergleichende Analysen durchzuführen. Selbst mit dem kleinsten Datensatz (710_Hermaphrodite_Staubblatt) von fast 43.500.000 „reads“ können sehr wahrscheinlich noch über 90 % der exprimierten Gene erkannt werden.

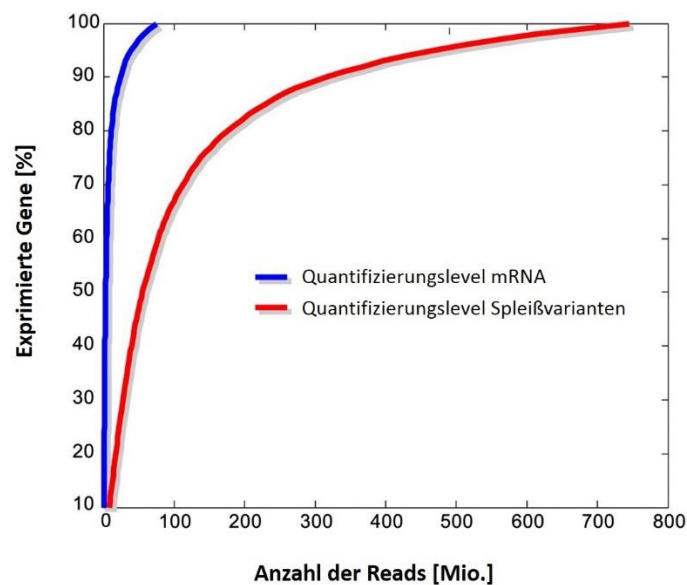


Abbildung 4.1: Anzahl der „reads“ für verschiedene Transkriptomanalyse

Die Abbildung zeigt in Blau die Anzahl der Sequenzen, welche für das Erstellen eines Expressionsprofils mit vollständiger Abdeckung aller Gene notwendig ist. Die rote Linie gibt an, dass für eine tiefgehende Analyse von Spleißvarianten weitaus mehr Sequenzen benötigt werden (verändert nach Blencowe et al., 2009).

In Verbindung mit der Veröffentlichung von Referenzgenomen verschiedener Nicht-Modell-Organismen wie der Weinrebe wird die Gestaltung globale Transkriptomanalysen vereinfacht (Morozova et al., 2009). Eine gewisse Problematik stellen bei Expressionsanalysen weiterhin die kurzen Sequenzlängen von bis zu 100 bp dar. Bei einer durchschnittlichen Exongröße von etwa 130 bp im Wein decken sie nicht einmal ein komplettes Exon ab (Jaillon et al., 2007). Das Zusammenführen überlappender „paired-end“-Sequenzen erhöht die Sequenzlängen, um unvollständige Transkripte zu verlängern, so dass teilweise sogar komplette Transkripte entstehen. Somit können auch mögliche Isoformen der proteinkodierenden Gene besser detektiert werden (Martin & Wang, 2011). Mittels dieses Verfahrens konnten in allen vier

Datensätzen zwischen 65 und 70 % der „paired-end reads“ zusammengefügt werden, was eine bessere Analyse mit fast doppelt so langen Sequenzen ermöglicht (siehe Tabelle 3.3).

Die Effektivität von „mappings“ gegen ein Referenzgenom ist vor allem bei sehr heterozygoten Varietäten wie dem Wein eine Herausforderung. Die Grundlage des Referenzgenoms ist ein Pinot Noir-Klon, welcher bis zur fast vollständigen Homozygotie gezüchtet wurde (Jaillon et al., 2007). SNP-Analysen in kodierenden Bereichen zeigten bereits, dass dadurch oft größere Übereinstimmungen zu Individuen aus *Vitis sylvestris* als zu den verwandtschaftlich näheren Kulturweinen existieren (Ding, 2013). Somit ist das Ergebnis der RNA-Seq mit ca. 60 % zur Referenz passenden Sequenzen in jedem Datensatz annehmbar. Transkriptomanalysen anderer Wissenschaftler, welche ebenfalls „mappings“ mit hoher Stringenz gegen das Referenzgenom von Jaillon et al., 2007 durchführten, zeigten ähnliche Ergebnisse (Sweetman et al., 2012; Zenoni et al., 2010). Gründe hierfür sind oft nicht vollständige oder falsche Annotationen sowie fehlende genomische Informationen aufgrund von Sequenzlücken (Sweetman et al., 2012). Im Vergleich von verschiedenen bereits veröffentlichten Pflanzengenomen ist die Qualität der Genomsequenzen von *Vitis vinifera* gegenüber denen von *Arabidopsis thaliana* oder *Zea mays* niedriger (Shangguan et al., 2013).

4.3 Vergleich der Genexpressionsprofile aller Datensätze

Für einen umfassenden Vergleich der Genexpressionen in den vier zu analysierenden Datensätzen aus den männlichen bzw. weiblichen Sexualorganen der beiden *Vitis*-Subspezies ist zunächst die Betrachtung der absoluten Expressionsniveaus nötig. Über alle Gene hinweg zeigt sich eine hohe Ähnlichkeit zwischen den beiden Fruchtknotengewebe der wilden und der Kulturrebe sowie ihrer Staubblattgewebe (Abbildung 3.2). Die Ähnlichkeit der Transkriptome in den beiden Staubblattprofilen ist größer als die der beiden Fruchtknotengewebe. Trotz des Versuchs, alle Blüten im gleichen Stadium zu entnehmen, sind Unterschiede in den Entwicklungsstadien und somit auch in den Expressionsleveln durch die Dauer der Anthese nicht ausgeschlossen (Lebon et al., 2008). Dies gilt auch für eine mögliche bereits eingetretene Bestäubung der hermaphroditischen Blüten (siehe 4.1).

4.3.1 Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern aus *Vitis sylvestris*

Das am stärksten exprimierte Gen kodiert für eine GDSL Esterase/Lipase. Einige der Enzyme dieser großen Genfamilie bewirken die Hydratation von Pollenkörnern bei der Bestäubung von *Arabidopsis* (Updegraff et al., 2009), sind aber darüber hinaus nicht bekannt für Einflüsse auf reproduktive Vorgänge. Die meisten unter den 100 am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern der männlichen Blüten können dem Pollenschlauchwachstum und Vorgängen der Reproduktion zugeordnet werden (siehe 3.3.2). Darunter fallen Gene mit den unterschiedlichsten Aufgaben während dieses Entwicklungsprozesses. So sind z.B. Gene kodierend für GTPase-Austauschfaktoren am polaren Wachstum des Pollenschlauchs beteiligt (Y. Zhang & McCormick, 2007). Andere sind vor allem in den Aufbau und die Modifikation der Zellwand des Pollenschlauchs involviert. Darunter befinden sich viele Biopolymere wie das Arabinogalactan-Peptid (Coimbra et al., 2010). Exprimierte Gene kodierend für einige hydrolytische Enzyme, wie z.B. Pektinesterasen, sind während des Wachstums besonders wichtig für die Stabilität und Flexibilität der Pollenwand (Bosch et al., 2005). Weitere essentielle Gene sind die Mitglieder der Expansin-Familie. Diese sind ausschlaggebend für die Auflockerung der Zellwand der weiblichen Narbe, so dass der Pollenschlauch hineinwachsen und die Befruchtung der Blüte erfolgen kann (Cosgrove, 2000). Weitere häufig vorkommende Gene kodieren für verschiedene Arten von Transporterproteinen. Transporter z.B. für Zucker oder verschiedene Kationen sind häufig an der Entwicklung reproduktiver Organe in Pflanzen beteiligt (Bassil et al., 2011; Yuan & Wang, 2013).

Die zwei Gene kodierend für die Aldehyd-Decarboxylasen ECERIFERUM 1 und 3 sind nur im Datensatz der Staubblätter aus dem männlichen Individuum unter den Top 100. Im Datensatz der Staubblätter hermaphroditischer Blüten befinden sie sich an Position Platz 177 bzw. 106. Diese Decarboxylasen haben in *Arabidopsis* unter anderem einen Einfluss auf die Pollenfertilität (Aarts et al., 1995). Frühere Untersuchungen zur Dauer der Lebensfähigkeit von Pollen zeigten, dass diese bei Wind-bestäubenden Arten oft niedriger ist als bei Selbstbestäubern (Dafni & Firmage, 2000). Somit könnte eine höhere Expression dieser Gene in den Staubblättern der männlichen Blüten zu einer höheren Pollenfertilität führen. Da die hermaphroditischen Blüten aus *Vitis vinifera* zur Selbstbestäubung fähig sind, wäre dieser Mechanismus dort nicht nötig.

4.3.2 Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten aus *Vitis sylvestris*

Die Expression der Gene in den Fruchtknoten der weiblichen Blüten (*V.s.*) zeigt, dass hier im Vergleich zu den Staubblättern vollkommen andere biologische Prozesse ablaufen (siehe Abschnitt 3.3.3). Bei dem Gen mit der stärksten Expression handelt es sich um ein für ein Metallothionein kodierendes Gen. In Tieren sind diese oft am Schutz vor oxidativem Stress beteiligt (Thornalley & Vasak, 1985). Auch ein möglicher Einfluss bei Krebserkrankungen wird diskutiert (Jin et al., 2002). Es gibt aber keinen Hinweis auf eine Beteiligung dieser proteinkodierenden Gene auf etwaige Entwicklungsvorgänge in Pflanzen. Einige exprimierte Gene können Prozessen bezüglich des zellulären Monosaccharid-Stoffwechsels, wie der Glukoneogenese, zugeordnet werden. Die erhöhte Expression ist plausibel und notwendig, da in Vorbereitung auf die spätere Fruchtentwicklung und -reifung verschiedene Saccharide essentiell sind (Gao et al., 1999).

Eine weitere wichtige Gruppe von Genen, welche zu Beginn der Anthese in den Fruchtknoten exprimiert ist, sind die aromatischen Komponenten. Dabei handelt es sich um sekundäre Pflanzenstoffe wie Flavonoide bzw. Anthocyane. Eine hohe Aktivität verschiedener Gene, die an der Flavonoid-Biosynthese beteiligt sind, konnte bereits in den Fruchtknoten von Petunien nachgewiesen werden (Koes et al., 1994). Gene, welche in der Anthocyanbiosynthese mitwirken, sind häufig schon in den Blüten exprimiert, in Vorbereitung auf die spätere Einlagerung der Farbstoffe in die Beerenhaut (Boss et al., 1996). In den Top 100 der Fruchtknoten aus hermaphroditischen Blüten wurden diese Gene nicht gefunden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Beeren der Wilden Weinreben durch die Anthocyane eine blaue bis tief violette Färbung erhalten, wohingegen die Reben von *Vitis vinifera* var. Weißer Heunisch weiße Trauben tragen. Eine durch Domestizierung begünstigte Insertion des Retroelements *Gret1* in das Gen *VvmybA1* verursacht bei den Kultursorten von *Vitis vinifera* die weiße Farbe der Beeren (This et al., 2007).

Unter den 100 am stärksten exprimierten Genen befinden sich viele Gene kodierend für ribosomale Proteine. Des Weiteren sind die signifikante Anreicherung in GO-Gruppen wie „rRNA-Metabolismus“, „Ribosomenbiogenese“ und „Translation“ ein Hinweis auf eine erhöhte Proteinsynthese. Der Anstieg an Ribosomenaktivitäten geht ebenfalls mit der Vorbereitung auf die bevorstehende Fruchtentwicklung einher (Marei & Romani, 1971; Spiers

et al., 1984). Untersuchungen an den Früchten der Tomate zeigten allerdings, dass die Zunahme der Synthese von ribosomalem Material ein Charakteristikum der Umwandlung von einem ruhendem zu einem biologisch aktiven Fruchtknoten ist, ausgelöst durch Bestäubung oder wachstumsfördernde Hormone. Durch diese Aktivierung kann ein allgemeiner Anstieg des Protein-, Aminosäure- und RNA-Gehalts detektiert werden (Linskens, 1973). Die Daten können deshalb ein Hinweis darauf sein, dass einige der gesammelten Blüten bestäubt bzw. auch schon befruchtet waren und sich somit in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befanden (siehe 4.1).

Manche Gene sind dem Überbegriff „Antwort auf abiotischen Stimuli“ zugeordnet worden. Darunter fallen z.B. Reaktionen auf Licht. Somit kommen in dieser Gruppe mehrere Gene mit einer Beteiligung an der Photosynthese vor, wie das Gen GSVIVG01008866001 kodierend für das Photosystem II 22kDA Protein. Dieses bildet die Chlorophyll-bindende Untereinheit des Photosystems II (Funkapb et al., 1994). Aufgrund der Anregung durch UV-Licht können solche Gene auch in verschiedene Stressantworten eingeordnet werden, obwohl sie nur an der Photosynthese beteiligt sind und diese einen wichtigen Prozess in den Blütenständen darstellt (Lebon et al., 2005). Allerdings lässt sich keine genaue Aussage über den Einfluss äußerer Stressfaktoren machen, da das Pflanzenmaterial von der Hochschule Geisenheim zur Verfügung gestellt und nicht selbst angezogen wurde.

Ein weiterer Bereich ist der „Alkohol-Metabolismus“. Darunter sind die chemischen Reaktionen und Stoffwechselwege zusammengefasst, bei denen Stoffe eine oder mehrere Hydroxylgruppen an gesättigten C-Atomen tragen. Es handelt sich dabei unter anderem um die auf- und abbauenden Stoffwechselwege kleiner Moleküle, wie verschiedene Saccharide. Gene kodierend für z.B. die Fruktose-Bisphosphat-Aldolase (GSVIVG01033791001) als Teilschritt der Glykolyse (Altenberg & Greulich, 2004) können in diese Gruppen eingeordnet werden. Allgemein zeigen in den Fruchtknoten der Blüten aus *Vitis sylvestris* vor allem Gene eine hohe Expression, die eine Beteiligung an Reaktionen und Stoffwechselwegen in Vorbereitung auf die bevorstehende Fruchtentwicklung haben. Des Weiteren konnten aber auch Gene als exprimiert erkannt werden, die an der Entwicklung der weiblichen Blütenorgane beteiligt sind, wie das kodierende Gen für die SHAGGY-related protein kinases. Mitgliedern dieser Familie wurde in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen, an der Entwicklung des Gynoeceums beteiligt zu sein (Dornelas et al., 2000).

4.3.3 Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Staubblättern aus *Vitis vinifera*

Die exprimierten Gene der Staubblätter der Hermaphroditen des Weißen Heunischs konnten in ähnliche Gruppen eingeordnet werden wie jene aus den Staubblattgeweben der rein männlichen Blüten von *V.s.* (siehe 3.3.4). Das Gen mit der höchsten Expression kodiert dabei für das Speicherprotein Glutelin Typ A, das unter anderem fast 80 % des Proteingehalts im stärkehaltigen Endosperm bei Reiskörnern ausmacht (Takaiwa et al., 1986). Die am deutlichsten angereicherten Gruppen sind „Pollenschlauchwachstum“, „Regulation der Größe anatomischer Strukturen“ sowie „Prozesse der Reproduktion“. So ließ sich ebenfalls eine hohe Expression von Genen kodierend für Strukturproteine wie Arabinogalactan, GTP-Austauschfaktoren oder hydrolytische Enzyme detektieren (vgl. 4.3.1). Folglich kann man sagen, dass im Vergleich zu den Staubblättern männlicher Blüten ähnliche biologische Prozesse ablaufen und auch hier zu Beginn der Anthese in den Staubblättern vorbereitende Gene für die Bestäubung exprimiert werden. Dies zeigt sich auch in der Anzahl von 74 Genen, welche in beiden Datensätzen unter den 100 am stärksten exprimierten Genen zu finden sind.

Unter den 100 Genen sind 26 nur in den Staubblattgeweben der Hermaphroditen zu finden. Dabei findet sich erneut einige proteinkodierende Gene, welche mit Stress assoziiert sind. Mehrere Genprodukte kodieren für das in *Arabidopsis thaliana* unter osmotischem Stress exprimierte Protein KIN2 (Kurkela & Borg-Franck, 1992). Weitere Gene, kodierend für sogenannten LEA („late embryogenesis abundant“)-Proteine. Diese sind nicht nur verstärkt in der späten Phase der Embryogenese vertreten (Battaglia & Covarrubias, 2013), sondern hängen ebenfalls mit einer Reaktion auf Stress-induzierenden Salzgehalt oder Trockenheit zusammen (Zhu, 2011). Die entsprechenden Gene sind in den Staubblättern aus *Vitis sylvestris* weniger stark exprimiert. In den Fruchtknotengeweben der weiblichen Blüten kann nur eine minimale Expression erkannt werden. Im Fruchtknotengewebe der hermaphroditischen Blüten ist eine Expression vorhanden, allerdings weniger stark als in den Staubblättern der Hermaphroditen. Der Unterschied in der Expression dieser Stressgene in den verschiedenen Subspezies lässt sich durch die unterschiedlichen Standorte der Rebstöcke erklären. Da die getrenntgeschlechtlichen Blüten auf einem anderen Wingert angepflanzt sind als die Variation Weißer Heunisch, kann es hier zu einer unterschiedlichen Bodenbeschaffenheit kommen. Die hohe Expression in den Staubblattgeweben von *V.v.* und *V.s.* lässt sich möglicherweise auf eine

unterschiedliche Sensitivität der geschlechtsspezifischen Organe auf Wassermangel zurückführen. Versuche mit Weizenpflanzen zeigten, dass Wasserdefizite während der Pollenentwicklung zur Sterilität führen können (Lalonde et al., 1997).

4.3.4 Auswertung der am stärksten exprimierten Gene in den Fruchtknoten aus *Vitis vinifera*

In den Top 100-Genen können auch in den Fruchtknotengewebe der Hermaphroditen Zuordnung zu ähnlichen Prozessen wie in den Fruchtknoten der weiblichen Blüten gemacht werden (siehe Absatz 3.3.5). Das am stärksten exprimierte Gen ist hier ebenfalls das Gen kodierend für ein Metallothionein. Im Vergleich konnten nur 66 Gene gefunden werden, die in beiden Geweben unter den Top 100 sind. Folglich herrscht zwischen den beiden Staubblattgeweben bei den am höchsten exprimierten Genen eine größere Übereinstimmung als unter den Fruchtknotengeweben, was auch schon die „heatmap“ zeigt (3.3.1). In den hermaphroditischen Fruchtknoten sind die exprimierten Gene vor allem in „Translation“ und „Antwort auf abiotische Stimuli“ eingeordnet. Dabei zeigen sich ebenfalls Gruppen wie die „Synthese aromatischer Produkte“, z.B. Anthocyane, oder die „Synthese von kleinen Molekülen“, wie RNA, signifikant angereichert. Des Weiteren wird auch hier eine hohe Anzahl an ribosomalen Genen exprimiert, so dass man, wie auch in den Fruchtknotengeweben der weiblichen Blüten, wieder auf eine hohe Aktivität des Proteinstoffwechsels schließen kann (vgl. Abschnitt 4.3.2). Die Gene unter dem Begriff „Antwort auf abiotische Stimuli“ können teilweise auch anderen Ontologien zugeordnet werden und sind somit nicht unbedingt spezifischen Stressantworten zuzuordnen, wie die unter Begriff aufgeführten Gruppen zunächst vermuten lassen. Die gleichen Gene sind auch in den Top 100 des weiblichen Gewebes zu finden, wie z.B. das für das Photosystem II 22kDA Protein kodierende Gen GSVIVG01008866001. Ein weiterer Überbegriff ist der „Kohlehydrat-Katabolismus“. Die Wirkung der Gene, die an den verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt sind, wurde bereits in Abschnitt 4.3.2 besprochen.

Unter den 41 Genen, welche nur im Fruchtknotengewebe von *Vitis vinifera* in den Top 100 zu finden sind, tauchen auch einige Genprodukte mit Einfluss auf die Blütenreifung und die Blütenorganentwicklung auf. Ein Gen kodierend für das Hämprotein Cytochrom P450 zeigt in den Fruchtknoten des Individuums von *Vitis vinifera* eine 8fach so hohe Expression wie in den Geweben des weiblichen Individuums. Mitglieder dieser Genfamilie, die im Genom

niedrige Anzahl von Genkopien haben, haben essentielle Funktionen in der Blütenreifung. Allerdings wurde für diese Gene eine gewebsspezifische Expression in den Antherfilamenten festgestellt (Liu et al., 2015). Somit ist dieses Gen, aufgrund der Expression in den Fruchtknotengewebe, vermutlich eher als Elektronentransporter an der Photosynthese beteiligt (Jensen & Møller, 2010). Auch die weiteren Gene mit einem Einfluss auf die Blütenentwicklung sind im Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten niedriger exprimiert. Eines dieser Gene (GSVIVG01031975001) kodiert für den Transkriptionsfaktor RADIALIS-like 1. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren sind bekannt dafür, bereits an der frühen Blütenmorphogenese beteiligt zu sein (Hamaguchi et al., 2008). Homologe Gene zu RADIALIS-like aus der Pima-Baumwolle (*Gossypium barbadense*) spielen eine wichtige Rolle bei der frühen Ovulumentwicklung (Zhang et al., 2010). Dieses Gen zeigt in den Fruchtknotengewebe der weiblichen und hermaphroditischen Blüten eine hohe Expression im Vergleich zu den untersuchten Staubblattgeweben.

Unter den Top 100 sind einige MADS-Box-Proteine zu finden. Diese wirken als homöotische Gene an der Determination der Blütenorganidentität. Außerdem wirken sie als Blütenmeristem-Identitätsgene (Theissen et al., 2000). Ein Gen (GSVIVG01036551001), kodierend für das MADS-Box Protein 2 von *Vitis vinifera*, ist ein putatives Ortholog zu dem SEPATALLA-Protein aus *Arabidopsis*, welches als allgemeines Blütenentwicklungsgen in die Spezifizierung der Kron- und Staubblätter sowie der Karpelle involviert ist (Boss et al., 2002). Das Gen GSVIVG01000802001 kodiert für ein, laut BLAST-Treffer nicht weiter charakterisiertes, MADS-Box Protein. Es zeigt eine hohe Expression in den späteren Stadien der Blütenentwicklung, so dass von einer Beteiligung an der Karpellentwicklung ausgegangen werden kann. Allerdings hält die Expression dieses Genes während der Fruchtentwicklung an. Somit ist es wahrscheinlicher, dass die Funktion des Gens die Entwicklung des Karpellgewebes zur Frucht ist (Boss et al., 2001). Ein weiteres Gen (GSVIVG01010521001), welches für das MADS-Box Protein 4 kodiert, zeigt eine 93%ige Aminosäuresequenz-Identität zu dem AGL9 Homolog aus der Familie der Wolfsmilchgewächse (*Jatropha curcas*). AGL9 ist in *Arabidopsis* in den späteren Entwicklungsstadien unter anderem an der Spezifizierung der Kron- und Staubblätter sowie der Karpelle beteiligt (Mandel & Yanofsky, 1998). Der hohe Expressionswert von 363,26 in den Staubblättern der männlichen Blüten ist fast genauso hoch wie im Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten (EW 467,82). Dieses

Ergebnis unterstreicht die Funktion als allgemeines Blütenentwicklungs-Gen. Mitglieder der Genfamilie der Squamosa-Promotor Binding Protein, wie das Gen GSVIVG01028208001 sind oft an der Blütenentwicklung beteiligt (Wellmer & Riechmann, 2010), allerdings gibt es keine Anhaltspunkte für eine Beteiligung an der Geschlechtsbestimmung.

4.4 Bewertung der differentiellen Genexpression in den verschiedenen Geweben

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die unterschiedliche Stärke und Dauer der Expression von Genen, welche an der Blütenentwicklung beteiligt sind, die Ausprägung der verschiedenen Sexualorgane in den drei Geschlechtern hervorrufen können. Deshalb wurde neben der absoluten Genexpression in den geschlechtsspezifischen Geweben auch die differentielle Genexpression betrachtet. Für genauere Erkenntnisse hinsichtlich dieser Annahme sind die exprimierten Gene im Vergleich Staubblatt gegen Fruchtknoten aus den getrenntgeschlechtlichen Blüten von *Vitis sylvestris* und den zweigeschlechtlichen Blüten aus *Vitis vinifera* betrachtet und auf ihre differentielle Expression hin untersucht worden. Die unter den bestimmten Grenzwerte (siehe 2.4.3) als differentiiell exprimiert angesehenen Gene wurde hinsichtlich ihrer Funktion genauer betrachtet.

4.4.1 Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus *Vitis sylvestris*

Für die Analyse der differentiiell exprimierten Gene der beiden Datensätze (711 und 712) aus *Vitis sylvestris* erfolgt die Einordnung in „gene ontology“ (GO)-Gruppen. Dabei zeigt sich, dass die drei am wenigsten spezifischen Gruppen in der Kategorie „Biologische Prozesse“, „Zelluläre“ und „Stoffwechselprozesse“ sowie „Einzelorganismus-Prozesse“ am deutlichsten angereichert sind. Diese umfassen die verschiedensten Abläufe von der Zellproliferation bis hin zu Entwicklungsprozessen in Einzelzellen sowie dem gesamten Organismus. In der Kategorie „Molekulare Funktion“ zeigt sich eine deutliche Anreicherung der Gruppen „Katalytische Aktivität“ und „Bindung“, worunter die Wechselwirkung zwischen Molekülen fällt. Dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei Blüten während der Anthese um ein sehr Stoffwechsel-aktives Gewebe handelt (van Doorn et al., 2003). Die meisten Prozesse finden in den Kompartimenten „Zelle“, „Membran“ und „Organelle“ statt, wobei der Anteil der

Prozesse in den Organellen bei den Fruchtknoten der Blüten aus *Vitis sylvestris* höher ist. Dies liegt möglicherweise an dem vermehrten Vorkommen von Chloroplasten bzw. des darin enthaltenden Chlorophylls in den Beeren und somit auch in den Fruchtknoten (Dokoozlian, 2000). Die Filamente und Staubbeutel hingegen haben eine eher weißlich bis gelbe Farbe (Dhekney et al., 2009), also einen geringen Chlorophyllanteil.

Das Augenmerk der Auswertung liegt in der GO-Analyse vor allem auf Gruppen, die stark unterschiedlich angereichert sind. Darunter zählen im Fruchtknoten der weiblichen Blüten die Gruppe „Antworten auf verschiedene Stimuli“, was sich bereits in der Analyse der absoluten Expression gezeigt hat (Abschnitt 4.3.2), und die Gruppe „Signalisierung“ (vgl. Abbildung 3.7). In diesen Gruppen wurde besonders auf Gene geachtet, die allgemein in die Entwicklung von geschlechtsspezifischen Blütenorganen involviert sind und dadurch möglicherweise an der Geschlechtsrealisierung beteiligt sein können. Unter anderem sind zwei Gene kodierend für Proteine der Familie HOTHEAD-like im Gewebe der weiblichen Fruchtknoten in die Gruppe „Signalisierung“ (GSVIVG01016856001) sowie im Gewebe der männlichen Staubblätter in die Gruppe „Staubblatt-Entwicklung“ (GSVIVG01010650001) eingeordnet worden. Diese Proteine sind bei Modellpflanzen dafür bekannt, an der Organentwicklung und –Fusion beteiligt zu sein (Lolle et al., 1998). Somit ist ein geschlechtsspezifischer Einfluss eher unwahrscheinlich. Das Gen mit dem Produkt AINTIGUMENTA 5-like (AIL5-like) zeigt ebenfalls in den Fruchtknoten der weiblichen Blüten eine erhöhte differenzielle Expression. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren wirkt in verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung, vor allem bei der Wachstumskontrolle der verschiedenen Organe (Nole-Wilson et al., 2005). AIL5 initiiert in frühen Stadien das Wachstum von Kelch- und Blütenblättern in *Arabidopsis thaliana* (Krizek, 2015). Einen Hinweis darauf, dass dieses Gen an der direkten Entwicklung der spezifischen weiblichen Geschlechtsorgane beteiligt ist, konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Für die genauere Charakterisierung der Abläufe, in die die differenziell exprimierten Gene involviert sind, erfolgte eine Einordnung in GO-Terms durch das Tool REVIGO. Die Einordnung der differenziell exprimierten Gene aus den männlichen Staubblättern zeigt ein ähnliches Bild wie schon jene bezüglich der absoluten Expression der am stärksten exprimierten Gene (siehe Tabelle 3.5). Die meisten Gene beeinflussen die Entwicklung des Pollenschlauchwachstums oder die dadurch hervorgerufene Veränderung der Zellwände.

(siehe Abschnitt 4.3.1). Von besonderem Interesse ist das laut BLAST-Analyse für das MADS-box Protein AGAMOUS-like 8 homolog (GSVIVG01022182001) kodierende Gen (AGL8). AGAMOUS-kodierende Gene zählen zu den homöotischen Genen in Pflanzen und sind verantwortlich für die Entwicklung der reproduktiven Organe wie Staubblätter und Karpell. Sie werden vor allem in den späten Phasen der Blütenentwicklung exprimiert (Bowman et al., 1991). AGL8 ist in *Arabidopsis* hauptsächlich im Infloreszenzmeristem exprimiert und akkumuliert in späteren Entwicklungsphasen in der Zellwand des Karpells (Mandel & Yanofsky, 1995). Somit steht eine Expression in den Staubblättern hierzu im Widerspruch. Allerdings zeigt die abgeleitete Proteinsequenz ebenfalls eine Übereinstimmung von 79 % mit der Aminosäuresequenz von AGAMOUS-like 104. Dieses Protein ist unter anderem an der Pollenreifung und dem Schlauchwachstum in *Arabidopsis* beteiligt (Adamczyk & Fernandez, 2009) und hat vermutlich die entsprechende Funktion auch im analysierte Gewebe. Die genaue Funktion dieses Gens konnte für *Vitis vinifera* bis heute nicht geklärt werden. Da homöotische Gene im Allgemeinen in die Entwicklung von Staubblättern und Karpell involviert sind (Bowman et al., 1991), ist eine Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung nicht auszuschließen.

In den Fruchtknoten der Blüten aus *V.s.* sind die meisten differenziell exprimierten Gene Vorgängen zugeordnet worden, die mit Zellvermehrung, Zellteilung und der Photosynthese in Verbindung stehen (vgl. Tabelle 3.6). Zellvermehrung und Zellteilung geben Hinweise darauf, dass eine Veränderung der Zellverbände bzw. eine Veränderung des Gewebes in den Fruchtknoten kurz nach Beginn der Blüte stattfindet. Eine Anreicherung von Genen, welche an Prozessen der Photosynthese beteiligt sind, ist ebenfalls ein Charakteristikum der Blüten allgemein und des Fruchtknotens im Besonderen. Die Blütenstände der Weinrebe sind zur Photosynthese befähigt und dadurch in der Lage, sich selbst mit Energie zu versorgen. Eine erhöhte Aktivität an Photosynthese kann zur Vorbereitung des Fruchtansatzes in den weiblichen Reproduktionsorganen dienen (Lebon et al., 2005). Die Stoffwechselreaktionen von Nicotinamiden bzw. von Alkaloiden spielen hierbei eine wichtige Rolle. Nicotinamide werden zu entsprechenden Nukleotiden umgesetzt und sind essentiell für die Neubildung von NAD und NADP (Matsui et al., 2007). Dem Metabolismus der Alkaloide sind ebenfalls einige Gene zugeordnet. Bestandteile der meisten Alkaloide sind verschiedene Aminosäuren (Robinson, 1974).

Bezüglich der Entwicklung des Ovulums wurde die Expression des Gens GSVIVG0125945001, kodierend für das MADS-Box Protein 5 (MADS5) detektiert, ein aus der Gerste (*Hordeum vulgare*) bekanntes Homolog zum SQUAMOSA-Protein. Die Expression des Gens zeigt sich dort in allen Organprimordia während der Entwicklung des Blütenstandes (Schmitz et al., 2000). Auch in vorherigen Untersuchungen an *Vitis vinifera* konnte eine Expression von MADS5 nur in weiblichen Blüten festgestellt werden, so dass sich eine Beteiligung an der Ovulum-Entwicklung vermuten lässt (Boss et al., 2002). Andere Hinweise auf die mögliche Funktion dieses Genprodukts hinsichtlich einer spezifischen Expression in den Fruchtknoten konnten in der Literatur nicht gefunden werden. In den hier verwendeten Daten ist das Gen in den Fruchtknoten von *Vitis sylvestris* mit einen Expressionswert von 129,92 fast genauso hoch exprimiert wie im Fruchtknotengewebe von *Vitis vinifera* (EW 156,58). Eine niedrige Expression in den untersuchten Staubblattgeweben lässt darauf schließen, dass das Gen präferierend in Fruchtknoten exprimiert wird und wahrscheinlich nicht geschlechtsspezifisch ist. Somit ist der Einfluss des Gens auf die Ausprägung der unterschiedlichen Geschlechter durch die Expression kaum vorstellbar.

4.4.2 Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Fruchtknoten- und Staubblattgewebe aus *Vitis vinifera*

Die GO-Einteilung der differentiell exprimierten Gene aus den Staubblatt- und Fruchtknotengeweben zeigt ein ähnliches Bild wie die Daten aus *Vitis sylvestris*: In der Kategorie „Biologische Prozesse“ sind „Zellulären Prozesse“, „Stoffwechselprozessen“ und die „Einzelorganismus-Prozesse“ ebenfalls die am stärksten angereicherten Gruppen (siehe Abbildung 3.12). Wie schon bei den getrenntgeschlechtlichen Blüten ist das Gewebe auch hier biologisch sehr aktiv. Besonders angereicherte Gruppen in den Fruchtknotengeweben sind, im Vergleich zum Staubblattgewebe, die „Biologische Regulation“, „Antwort auf verschiedene Stimuli“ sowie „Signalisierung“. Die Anreicherung der Reaktionen auf Stimuli erfolgt aus denselben Gründen wie auch schon bei der Analyse der absoluten Genexpressionen in den jeweiligen Fruchtknotengeweben (Absatz 4.3.2 und 4.3.4), so dass hier nicht näher drauf eingegangen wird. Vor allem die im Fruchtknoten der weiblichen Blüten erhöht exprimierten Gene mit Beteiligung an der Entwicklung der verschiedenen Blütenorgane können in die Gruppen „Signalisierung“ und „Biologische Regulation“ eingruppiert werden. In der Kategorie „Molekulare Funktion“ sind, wie auch schon in den

beiden *sylvestris*-Datensätzen, die Gruppen „Bindung“ und „katalytische Aktivität“ am stärksten angereichert, wobei es bei den Staubblättern der hermaphroditischen Gewebe keine Unterschiede in der Anzahl der eingruppierten Gene gibt. Bezüglich einer divergierenden Anreicherung zeigt sich im Fruchtknotengewebe der hermaphroditischen Blüten eine erhöhte Zuordnung von Genen in die Gruppe „Nukleinsäure-bindende Transkriptionsfaktoraktivität“. Dies lässt sich durch erhöhte Aktivität in Prozessen wie der Blütenorganentwicklung oder durch auftretende Stressreaktionen erklären (Chen et al., 2002). Hier wirken oft Transkriptionsfaktoren zur Signalübertragung und -weiterleitung, wie z.B. die MADS-Box Transkriptionsfaktoren in der Blütenentwicklung (Smaczniak et al., 2012). Die Hauptkompartimente, in denen die Prozesse ablaufen, sind wieder die Bereiche, „Zelle“, „Membran“ und „Organelle“. Auch hier zeigt sich im Fruchtknotengewebe, wie auch schon bei den weiblichen Blüten, eine höhere Anreicherung in den Organellen.

Bei der Betrachtung der signifikant angereicherten Gruppen zeigt sich auch bei den differenziell hoch exprimierten Genen der Staubblätter aus *V.v.*, dass die meisten Prozesse in Zusammenhang mit der Pollenschlauchentwicklung und der damit verbundenen Zell- bzw. Zellwandveränderungen stehen. Auch in diesem Gewebe ist das Gen GSVIVG01022182001, kodierend für AGL8, differenziell höher exprimiert. Der Einfluss dieses Gens wurde in Abschnitt 4.4.1 diskutiert. Die fast doppelt so hohe Expression in den hermaphroditischen Blüten lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass durch das parallele Ausbilden beider geschlechtsspezifischen Organe eine erhöhte Expression notwendig ist, um die vollständige Entwicklung in der fertigen Blüte zu erhalten. Im männlichen Individuum könnte die parallel verlaufende Unterdrückung der Fruchtknotenbildung dazu führen, dass bei AGL8 eine geringere Expression notwendig ist. Untersuchungen der Blüten des Wiesen-Sauerampfers (*Rumex acetosa*) zeigten bereits, dass differierende Expressionsmuster von MADS-Box-Genen einen Einfluss auf die Entwicklung der männlichen und weiblichen Blütenorgane haben. Eine fehlende Expression kann dabei die Einhaltung der Entwicklung entsprechender Organe bewirken (Parker, 1995). Des Weiteren ist GSVIVG01022182001 das einzige Gen mit einem aus anderen Pflanzen bekannten Einfluss auf die Blütenentwicklung, welches in den männlichen Reproduktionsorganen beider Subspezies eine, wenn auch nicht herausstechend hohe, Expression zeigt.

Die signifikant angereicherten Gruppen (siehe Tabelle 3.9) in den hermaphroditischen Fruchtknoten unterscheiden sich von den in den Fruchtknoten von *Vitis sylvestris* ablaufenden Prozessen. Eine Anreicherung von Genen, die für Prozesse in der Photosynthese wichtig sind, kann in den Fruchtknoten hermaphroditischen Blüten nicht nachgewiesen werden. Es zeigen sich dafür mehr Gene für Prozesse, die in grundlegende Zellfunktionen involviert sind, wie der Metabolismus von Molekülen, die Nukleobasen enthalten. Diese sind z.B. wichtige Vorläufermoleküle für die Synthese der Nukleinsäuren (Follmann, 1974). Des Weiteren sind auch Prozesse des Sekundären Stoffwechsels angereichert, wie die Synthese von Phenylpropanoiden, einem der häufigsten Produkte des Sekundärstoffwechsels (D'Auria & Gershenzon, 2005). Die Anreicherung der Gruppen „Aufrechterhaltung des Meristem“ (Fletcher, 2002), eine Untergruppe der Gewebeentwicklung, sowie „Zelldifferenzierung entlang von Körperachsen“ (Donoghue et al., 1998) zeigt weiterhin, dass diese Prozesse wesentlich für die Blütenentwicklung sind. Ähnliche Anreicherungen konnten bereits während der Analyse der absoluten Expression in den Fruchtknoten der weiblichen Blüten gefunden werden (vgl. 3.3.3). Eine starke differenzielle Expression der Gene involviert in die aufgeführten Prozesse konnte dort allerdings nicht festgestellt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Anreicherung dieser Gruppen im Fruchtknotengewebe im Vergleich der Datensätze aus *Vitis sylvestris* ebenfalls zu finden wäre, wenn die Grenzwerte für die differenzielle Genexpression abgesenkt würden. Somit ist hier nicht mit Sicherheit zu sagen, dass in den Fruchtknotengeweben des Hermaphroditen grundsätzlich andere Gene differenziell exprimiert sind.

In Hinblick auf die Blütenorganentwicklung wurden vier Gene gefunden, die von besonderem Interesse sind: 1. das Gen kodierend für MADS-Box Protein 5 (GSVIVG01025945001), für das eine Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung bereits als unwahrscheinlich gilt (siehe 4.4.1), 2. das Gen GSVIVG01026207001, kodierend für das Genprodukt TRANSPARENT TESTA 16, welches in *Arabidopsis thaliana* an der Entwicklung des Ovulums beteiligt ist (Tekleyohans, 2014). Eine differenzielle Genexpression (\log_2 FC von -6,47) kann nur im Vergleich der hermaphroditischen Gewebe festgestellt werden. Bei der Betrachtung der absoluten Expression zeigen sich sowohl in den weiblichen (EW 34,68) als auch in den hermaphroditischen Geweben (EW 24,25) keine signifikant hohe Ausprägung. Damit ist es nicht wahrscheinlich, dass dieses Gen einen Einfluss auf die Geschlechtsrealisierung hat. 3.

Das Gen kodierend für das Protein BIG BROTHER. Dabei handelt es sich um eine E3-Ubiquitinligase, welche als Repressor beim Wachstum von Pflanzenorganen agiert. Versuche in *Arabidopsis* haben ergeben, dass bereits eine geringe Änderung der Expression eine wesentliche Veränderung in der Organgröße zur Folge hat (Disch et al., 2006). Eine erhöhte Expression dieser Ligase führt allerdings zu einer limitierten Organgröße durch die Degradierung von Genprodukten mit Wachstumsfaktorenfunktion. Somit würde eine Expression in den Fruchtknoten bedeuten, dass diese nicht ausgebildet werden. Das vierte Gen, welches an der Entwicklung von weiblichen Gewebetypen beteiligt ist, ist das Gen GSVIVG01034073001. Dieses kodiert für das BEL1-like Protein 9. Mitglieder dieser Proteinfamilie sind in *Arabidopsis thaliana* für die Morphogenese des Ovulums erforderlich. Durch den Verlust dieser Funktion kann es zu einer abnormalen Entwicklung dieses Organs kommen (Kumar et al., 2007). Da dieses Gen allerdings in den Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten (EW 68,34) und der hermaphroditischen Blüten (EW 62,22) in fast gleichem Maße exprimiert ist, ist ein geschlechtsspezifischer Einfluss unwahrscheinlich

Somit konnte durch die Analyse der differenziell exprimierten Gene in den beiden Vergleichen kein potenzielles Kandidatengene für die Realisierung der weiblichen Sexualorgane gefunden werden. Die absolute aber auch differenzielle Expression des Gens kodierend für AGL8 lässt auf einen möglichen Einfluss dieses Gens auf die Entwicklung der männlichen Sexualorgane schließen.

4.5 Hypothetisches Modell über den Einfluss der potenziellen Kandidatengene auf die Geschlechtsrealisierung

Der genaue Mechanismus der Geschlechtsbestimmung im Genus *Vitis*, welcher zur Ausprägung der verschiedenen spezifischen Geschlechtsorgane in den jeweiligen Geschlechtern führt, ist bis heute ungeklärt. Als Grundzustand für die Blüten der Weinreben wird der hermaphroditische Zustand angesehen. Somit sind alle Blüten in *Vitis sylvestris* und in *Vitis vinifera* zunächst dazu befähigt, sowohl Staubblätter als auch Fruchtknoten auszuprägen (Caporali et al., 2003). Es kann folglich angenommen werden, dass die unterschiedlichen Ausbildungen auch nach der abgeschlossenen Blütenentwicklung aufrecht erhalten bleiben muss.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten im Genus *Vitis* zwei Gene identifiziert werden, für die auch bei anderen Pflanzen eine Beteiligung an der Entwicklung der Sexualorgane vermutet wird. Zum einen handelt es sich dabei um das Gen GSVIVG01031975001, kodierend für das Protein RADIALIS-like 1. Bekannte Homologe zu RADIALIS-like Proteinen aus der Baumwolle sind dort in die Ovulumentwicklung involviert. Diese besitzen in der Promotorregion *cis*-Elemente, welche direkt von MADS-Box-Proteinen gebunden werden. Somit wird die Expression vermutlich durch homöotische Entwicklungsgene reguliert (Zhang et al., 2010). Eine Funktion in *Vitis* ist für dieses Gen bisher nicht beschrieben.

Zum anderen konnte in beiden analysierten Staubblättern eine Expression des Gens GSVIVG01022182001 detektiert werden. Es kodiert für ein AGAMOUS-like Protein 8 Homolog (AGL8) aus der Gruppe der MADS-Box Proteine. Die Expression dieser homöotischen Gene in späteren Stadien der Blütenentwicklung zeigte in Versuchen mit *Arabidopsis* einen Einfluss auf die Staubblattentwicklung (Ito et al., 2007). Nach dem ABC-Model der Blütenentwicklung gehört AGAMOUS zu den Genen mit C-Aktivität (Litt & Kramer, 2010). Sie bewirken die Ausbildung der Staubblätter im dritten Wirtel des Blütenmeristems und die der Fruchtblätter im vierten Wirtel (Theißen, 2001). Der Zeitpunkt der Expression der Blütenorganidentitätsgene wird durch gegenseitige Wechselwirkungen beeinflusst (Alvarez-Buylla et al., 2010). Da das Protein AGL8 aus *Arabidopsis* vorwiegend im Infloreszenzmeristem exprimiert wird, wird vermutet, dass es an der Spitze der regulatorischen Hierarchie steht und die Expression von weiteren Meristemidentitätsgenen beeinflusst (Mandel & Yanofsky, 1995). Auch für dieses Gen ist noch keine Funktion in *Vitis* bekannt.

Durch diese Erkenntnisse lässt sich ein sehr vereinfachtes hypothetisches Modell ableiten, das den Einfluss der beiden potenziellen Kandidatengene auf die Entwicklung der Sexualorgane beschreibt. In der folgenden Abbildung ist zunächst die Wirkung der Genexpression in den hermaphroditischen Blüten der Kulturrebe *Vitis vinifera* dargestellt.

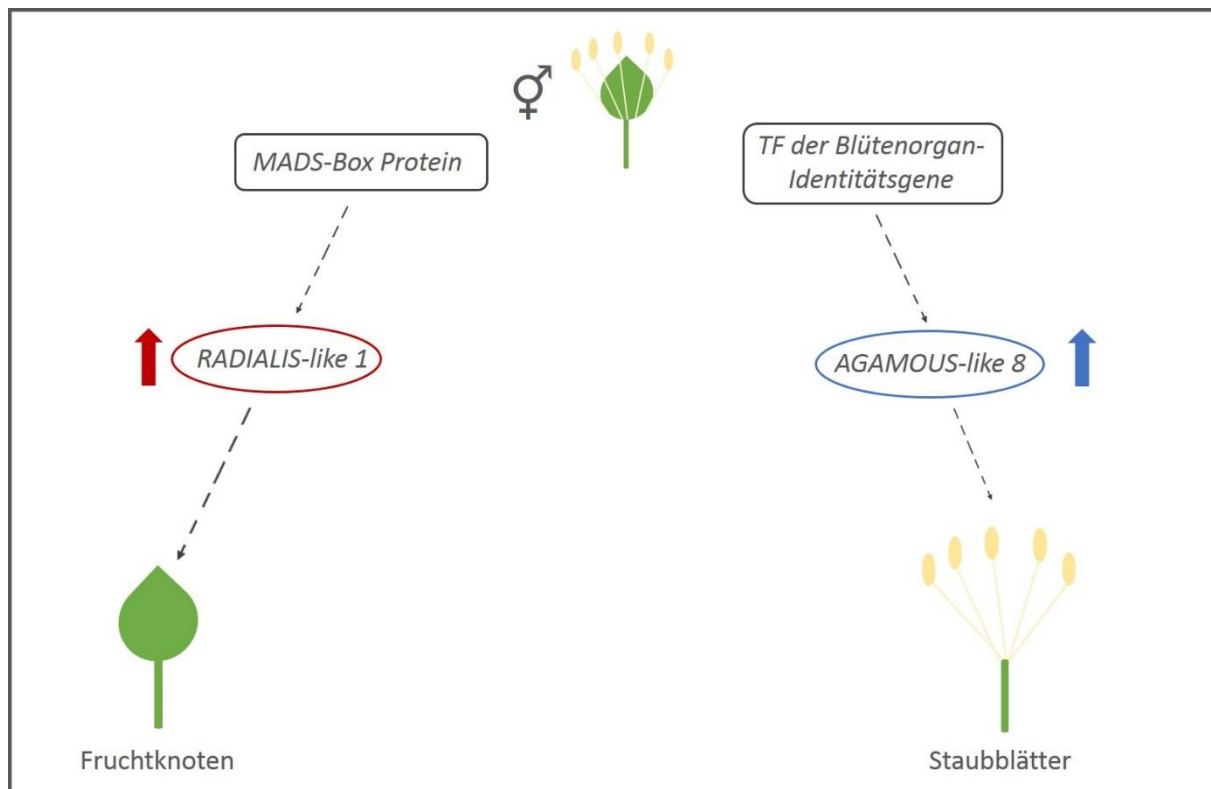


Abbildung 4.2: Modell zur Geschlechtsrealisierung beider geschlechtsspezifischen Organe in den Blüten von *Vitis vinifera*.

Eine hohe Expression von RADIALIS-like 1 (roter Pfeil) führt zur Ausprägung der Fruchtknoten, eine hohen Expression von AGAMOUS-like 8 Homolog (blauer Pfeil) führt zur parallelen Ausprägung der Staubblätter.

Die genauen Expressionswerte der beiden Gene in allen vier analysierten Geweben sind zur Übersicht in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.1: Expressionswerte der analysierten Gene mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung

Gen	<i>Vitis sylvestris</i>	<i>Vitis sylvestris</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>
	Male_SB	Female_FK	Staubblatt	Fruchtknoten
RADIALIS-like 1	62,61	291,28	243,57	712,68
AGAMOUS-like 8	84,01	0,63	155,43	1,55
Homolog				

Die höhere Expression der Gene in den hermaphroditischen Blüten zu Beginn der Anthese könnte bedeuten, dass trotz der abgeschlossenen Entwicklung der geschlechtsspezifischen Blütenorgane die Aufrechterhaltung dieses hermaphroditischen Zustandes gewährleistet sein muss. Dadurch könnte verhindert werden, dass es nicht doch zu einem späteren Absterben der Sexualorgane in den hermaphroditischen Blüten kommt. Untersuchungen der Blüten des Wiesen-Sauerampfers (*Rumex acetosa*) zeigten bereits, dass differierende Expressionsmuster

von MADS-Box Genen einen Einfluss auf die Entwicklung der männlichen und weiblichen Blütenorgane haben (Parker, 1995).

Für das Gen kodierend für das RADIALIS-like 1 Protein konnte in den Staubblättern ebenfalls eine geringere Expression festgestellt werden. Hinweise auf die Auswirkung der korrekten Ausbildung der männlichen Sexualorgane sind in der Literatur nicht belegt. Für das homologe Gen aus *Gossypium* zeigte sich ebenfalls am Tag der Anthese eine moderate Expression in den Staubblättern (Zhang et al., 2010). Weitere Versuche mit RADIALIS-kodierenden Gene zeigten zwar einen Einfluss auf die Ausprägung von Staubblättern, dieser stand aber nur im Zusammenhang mit der Entwicklung der Blütensymmetrie, nicht mit der Reproduktivität (Costa et al., 2005). Hinweise über die Auswirkung dieser Genexpression auf die korrekte Ausbildung der männlichen Sexualorgane konnten nicht gefunden werden.

Für die Entwicklung der eingeschlechtlichen Blüten besteht die Annahme, dass die fertile Entwicklung des jeweils anderen Geschlechtsorgans von Produkten bisher unbekannter Gene unterdrückt wird (Caporali et al., 2003). Diese unterdrückende Wirkung könnte auf Grund der Domestizierung verloren gegangen sein.

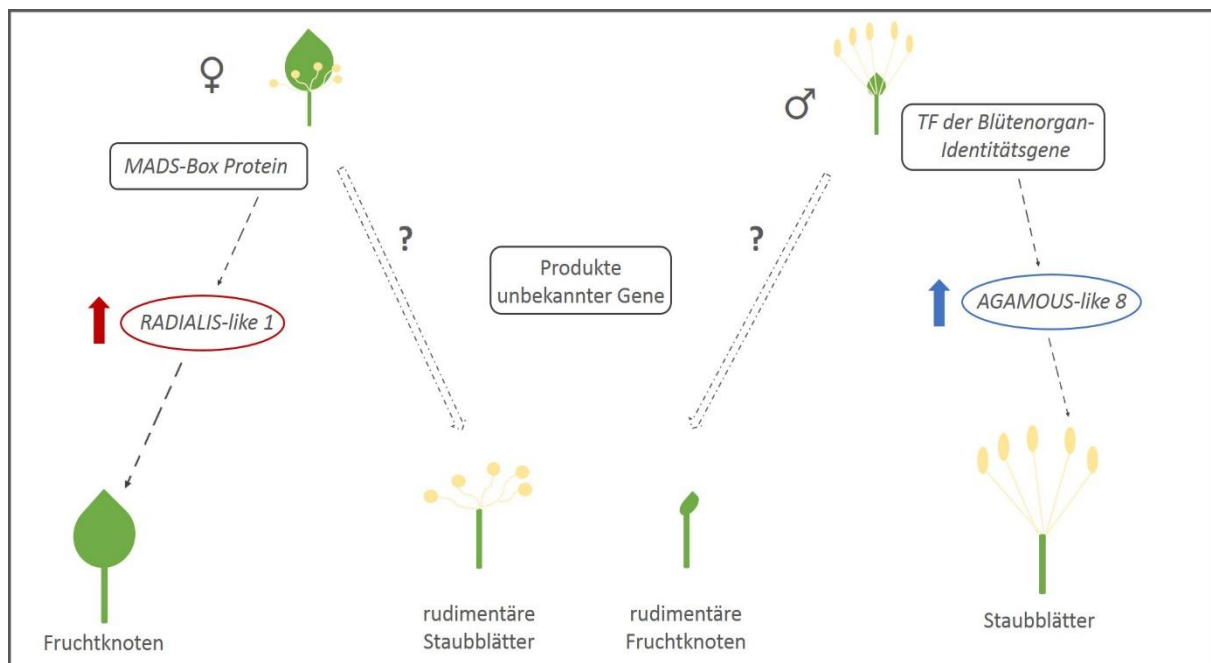


Abbildung 4.3: Modell zur Geschlechtsrealisierung beider geschlechtsspezifischen Organe in den Blüten von *Vitis sylvestris*

Die Expression von RADIALIS-like 1 (roter Pfeil) führt in den weiblichen Blüten zur Ausprägung der Fruchtknoten. Gleichzeitig ist ein Produkt bisher unbekannter Gene für die Entwicklung der missgebildeten Staubblätter verantwortlich. In den männlichen Blüten führt die Expression des AGAMOUS-like 8 Homologs (blauer Pfeil) zur Ausbildung der Staubblätter. Gleichzeitig könnte ein weiteres Produkt unbekannter Gene zur Repression des Fruchtknotens führen.

Weitere Sequenzierungen der rudimentär vorhandenen Fruchtknoten aus den männlichen Blüten und der Staubblätter der weiblichen Blüten aus *Vitis sylvestris* könnten hilfreich sein, die vermuteten Genprodukte zu identifizieren, die an der Unterdrückung der korrekten Ausbildung des jeweils anderen geschlechtsspezifischen Organs in den getrenntgeschlechtlichen Blüten beteiligt sind.

4.6 Auswertung der quantitativen Real Time-PCR

Die Auswertung der differentiellen Expression einer globalen Transkriptomanalyse auf der Basis von NGS-Daten wird durch viele Faktoren beeinflusst. So beruht beispielsweise die Quantifizierung der Expression auf der Länge der Transkripte, so dass längere Transkripte mehr „reads“ generieren als kürzere. Dies kann auch durch die gängigen Normalisierungsmethoden nicht komplett ausgeglichen werden. Dabei sind seltene Transkripte in der Menge der „reads“ schwer zu quantifizieren und fallen deshalb oft aus der Analyse (Tarazona et al., 2011). Eine weitere Herausforderung ist die Vielzahl an Mitgliedern großer Genfamilien, wie z.B. die Familie der Flavin-abhängigen Monooxygenasen. Diese Gene weisen meist Homologien aufgrund konservierter Bereiche auf. (Schlauch, 2007). Bei der RNA-Seq gegen ein Referenzgenom besteht dadurch die Gefahr, dass Sequenzen den „falschen“ Genen zugeordnet und somit die berechneten Expressionswerte verfälscht werden. Dies erfordert stichprobenartig eine Überprüfung der Ergebnisse der RNA-Seq. Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist bis heute eine der sensibelsten und effektivsten Methoden für die Analysen von Genexpressionen (Udvardi et al., 2008), die Normierung der Daten über eine stabile exogene Kontrolle macht diese Methode zudem sehr zuverlässig. Die exogene Kontrolle (50 ng Total-RNA aus *Danio rerio*) dient dabei zur Sicherstellung der Effizienz bei der reversen Transkription während der cDNA-Synthese.

4.6.1 Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differentiell exprimierten Genen der männlichen Staubblätter

Bei den Ergebnissen der quantitativen PCR der vier ausgewählten Gene aus dem Datensatz 711 (Male_Staubblatt), von denen nur drei in die Auswertung miteinbezogen wurden, offenbarten sich nur wenige Abweichungen im Vergleich zu den NGS-Daten (siehe Abbildung 3.13). Das Gen kodierend für eine Flavin-abhängige Monooxygenase zeigt in den beiden Geweben des Hermaphroditen die erwartete Expression, wohingegen über die Werte aus den beiden

Datensätzen von *Vitis sylvestris* (711 und 712) keine Aussage getroffen werden kann. Hier liegen die gemessenen Werte der zwei biologischen Replikate des männlichen Staubblattgewebes bzw. der drei biologischen Replikate der Fruchtknoten der weiblichen Blüten so weit auseinander, dass es bei beiden zu einer sehr großen Standardabweichung kommt. Diese ist beim Fruchtknotengewebe rein rechnerisch sogar größer als die eigentliche Expression. Mögliche Ursachen dieser Unterschiede wurden bereits unter Punkt 4.3 diskutiert. Das Gen kodierend für das Replikationsprotein A auf Chromosom 19 hat in den männlichen Staubblättern die erwartete Expression. Laut qPCR kann aber ebenfalls eine Expression sowohl in den weiblichen als auch den hermaphroditischen Fruchtknoten detektiert werden. Das Gen weist Sequenzähnlichkeiten mit einem anderen für ein Replikation Protein A kodierendes Gen auf Chromosom 17 auf (GSVIVG01007849001), bei dem auch die eigentlich genspezifischen Primer binden. Dieses Gen hat in den NGS-Daten eine hohe Expression in den beiden Fruchtknotendaten, so dass die gemessenen Werte der qPCR eine Mischung der Expression aus beiden Genprodukte ist. Die Dissoziationskurven der Fluoreszenzmessungen lassen ebenfalls darauf schließen, dass ein zweites Produkt mitamplifiziert wurde.

Das Gen kodierend für Rab7 tendiert in der qPCR zur gleichen Expression wie die NGS-Daten. Ein für eine Polygalakturonase kodierendes Gen hat bei den Messwerten der beiden biologischen Replikate der Staubblattgewebe aus *Vitis vinifera* eine rechnerische Standardabweichung größer als der Expressionswert, so dass hier keine Aussage getroffen werden kann (siehe Abbildung 3.13).

4.6.2 Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der Fruchtknoten aus V.s.

Bei den zwei Genen aus dem Datensatz 712 (Female_Fruchtknoten), die für eine Analyse in Frage kommen, konnte in den jeweiligen Staubblattgeweben aufgrund zu großer Standardabweichungen keine Aussage getroffen werden (vgl. Abbildung 3.14). Bei dem in der qPCR amplifizierten Produkt des Gens kodierend für das GTP-binding Protein handelt es sich laut BLAST-Analyse um eine Transkriptvariante des Gens. Ist diese im verwendeten Referenzgenom nicht annotiert, kann das Gen durch die RNA-Seq nicht detektiert werden, was die fehlende Expression im Vergleich zur qPCR erklären würde.

Die gemessene Expression in beiden Fruchtknotengeweben des Gens, welches für das Cell Division Control Protein kodiert, stimmt mit denen der RNA-Seq überein.

4.6.3 Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der hermaphroditischen Staubblätter

Die zur Analyse hinzugezogenen Gene aus dem Datensatz 710 (Hermaphrodite_Staubblatt), dargestellt in Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16, zeigen teilweise Abweichungen von den Werten der RNA-Seq. Im Gen kodierend für Cytochrom P450 kann im Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten eine mindestens ebenso hohe Expression festgestellt werden wie in den männlichen Staubblättern. Aufgrund des PCR-Produkts kommt noch ein weiteres Gen (GVIVG01000184001), ebenfalls auch Chromosom 7, für die Amplifikation in Frage. Es kodiert für ein Isoflavon 2'-Hydroxylase-like Protein. Der Reverse-Primer für das Gen kodierend für Cytochrom P450 passt bis auf die erste Base am 5'-Ende zu der Sequenz. Der Forward-Primer stimmt im 3' Bereich ebenfalls mit der Sequenz dieses Gens überein. Laut RNA-Seq ist das Gen vor allem in den Fruchtknotengewebe sowohl in *Vitis vinifera* als auch in *Vitis sylvestris* sehr hoch exprimiert. Somit könnte es sich bei den Werten der Expression in der qPCR wieder um eine Mischung aus beiden Genprodukten handeln. Die Dissoziationskurven zeigen ebenfalls die Amplifikation eines weiteren Produkts. Das für ein Protein mit unbekanntem Genprodukt kodierendes Gen zeigt in der qPCR keine Abweichungen zu den Ergebnissen der RNA-Seq. Bei dem Gen kodierend für die Geranylgeranyltransferase kann in der qPCR wider Erwarten eine hohe Expression im Fruchtknotengewebe der weiblichen Blüten detektiert werden (vgl. Abbildung 3.16). Eine BLAST-Analyse der Primer sowie der Sequenz des PCR-Produkts ergaben keine Sequenzhomologien zu anderen Genen. Auf dem Bild des Agarosegels sind bei einigen Replikaten mehrere Banden erkennbar, welche in der vorbereitenden Test-PCR nicht aufgetaucht sind. Hierbei kann es sich um Transkriptvarianten handeln, welche erst durch die hohe Prozessivität der AmpliTaq Gold™-Polymerase amplifiziert wurden (Moretti et al., 1998).

4.6.4 Beurteilung der gemessenen qPCR-Expressionswerte basierend auf den differenziell exprimierten Genen der hermaphroditischen Fruchtknoten

Von den vier ausgewählten Genen aus den hermaphroditischen Fruchtknoten (Datensatz 713) wurden nur drei Gene analysiert. Im Falle des für Defensin kodierenden Gens (siehe Abbildung 3.17) konnte eine leichte Expression in den Staubblättern der männlichen Individuen in der qPCR detektiert werden, die auf die Effektivität der verwendeten Polymerase zurückzuführen sein könnte (siehe 4.6.3.). Über die Expression in den

Staubblättern der Hermaphroditen kann aufgrund hoher Standardabweichungen keine Aussage getroffen werden. Dies gilt auch für die Werte in den Staubblättern der männlichen Blüten für das Gen mit dem nicht benannten Proteinprodukt (Unnamed Protein Product 2), die ebenfalls eine sehr hohe Standardabweichung zeigen. In beiden Fruchtknotengeweben konnte durch die qPCR eine ähnliche Expression wie in der RNA-Seq gemessen werden.

Die Expressionswerte der quantitativen PCR der beiden Gene kodierend für das Protein TRANSPARENT TESTA sowie für ein weiteres unbekanntes Proteinprodukt (siehe Abbildung 3.18) entsprechen den Erwartungen der NGS-Daten.

Somit lässt sich abschließend sagen, dass die quantitative Real Time PCR in den meisten Fällen in der Tendenz der Expression den NGS-Daten entspricht. Unterschiede sind oft auf nicht spezifische Produkte zurückzuführen, da die Methode weitaus sensitiver ist als die vorher durchgeführte Test-PCR. Auch zeigen die „*mappings*“ mit den jeweiligen NGS-Daten nicht immer alle vorhandenen Spleißvarianten, vor allem wenn sie stark unterrepräsentiert sind. Eine stichprobenartige Überprüfung mithilfe der quantitativen PCR ist aber trotzdem notwendig. Ebenso zeigt sich, dass die Messung dreier biologischer Replikate für eine qualifizierte Aussage erforderlich ist. Dies war in dieser Arbeit aufgrund limitierten Materials der Staubblattgewebe aus *Vitis sylvestris* und *Vitis vinifera* allerdings nicht möglich.

4.7 Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al.

Neben der von Fechter et al. publizierten Region wurden bis heute noch drei weitere Veröffentlichungen bezüglich der Lage möglicher geschlechtsbestimmenden Regionen auf Chromosom 2 des Referenzgenoms PN40024 (Jaillon et al., 2007) und potenzieller Kandidatengene gemacht. Um eine Übersicht zu erhalten, sind die Ergebnisse in Abbildung 4.4 grafisch zusammengefasst. Die von Battilana et al. (2013) benannte Region bestätigten zumindest Chromosom 2 als geschlechtsbestimmende Chromosom, vermuteten den Bereich allerdings weiter „*upstream*“ zwischen Position 4.666.161 und 4.864.777, wo sie 17 Kandidatengene identifizierten.

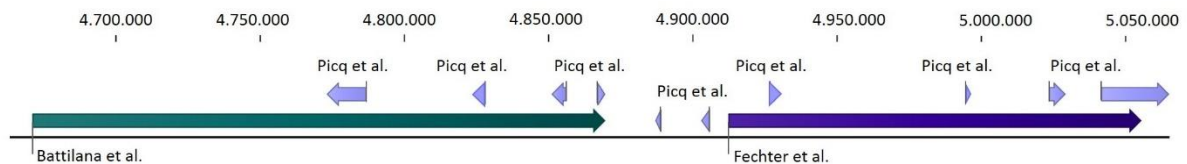


Abbildung 4.4: Übersicht der Lage der geschlechtsbestimmenden Regionen und potenzieller Kandidatengene auf Chromosom 2.

Zu sehen sind die Region publiziert von Battilana et al. sowie die Region von Fechter et al.; des Weiteren ist die Lage der Kandidatengene publiziert von Picq et al. angegeben. Die von Ramos et al. benannten Gene mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsbestimmung sind nicht aufgeführt.

Picq et al. (2014) legen sich nicht auf eine Region fest, sondern benennen zehn potenzielle Kandidatengene auf Chromosom 2. Ein weiteres Gen liegt auf dem „Chromosom Unknown“ (VVIR) und ist in der Abbildung nicht eingezeichnet. Die bis heute aktuellsten Forschungsergebnisse lieferten Ramos et al. (2014) mit einer Transkriptomanalyse ganzer Blüten von *Vitis sylvestris* (σ^7 und ♀) und zwittriger Blüten von *Vitis vinifera*. Durch Analyse der differentiellen Genexpression wurden acht potenzielle Kandidatengene ermittelt, die allerdings nicht auf Chromosom 2 liegen. Da in dieser Arbeit nur die Region von Fechter et al. betrachtet wird, wird auf die Ergebnisse der anderen Wissenschaftler nicht genauer eingegangen.

4.7.1 Analyse des Bereichs mit fehlender Sequenzinformation in der geschlechtsbestimmenden Region von Fechter et al.

Bei der von Fechter et al. (2012) benannten potenziellen Region handelt es sich um die erste beschriebene geschlechtsbestimmende Region im Genus *Vitis*, ein 143 kb großen Bereich auf Chromosom 2 des Referenzgenoms PN40024 12X (Jaillon et al., 2007). Aufgrund des Entwurf-Charakters enthält die Referenzsequenz unter anderem eine Lücke von berechneten 34 kb (siehe Abbildung 3.19). Um eine vollständige Information über die Existenz möglicher Gene in diesem Bereich zu erhalten wurde die fehlende Sequenzinformation mit Hilfe von Inverser PCR, Sequenzen des zweiten vorhandenen Referenzgenom nach Velasco (Velasco et al., 2007) sowie eigens im Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheit und Beratung (Mainz) durch Illumina-Sequenzierungen hergestellter Genomdaten ergänzt (vgl. Abschnitt 3.5.1). Es stellte sich heraus, dass die Größe der Lücke mit ca. 19 kb nur halb so groß ist wie angenommen. Durch eine ORF-Suche konnten insgesamt elf potenzielle Genbereiche gefunden werden. Davon haben nur fünf ORFs BLAST-Treffer mit einer hohen Sequenzidentität zu Proteinprodukten aus *Vitis vinifera* (siehe Tabelle 3.12). Bei vier der

detektierten ORFs handelt es sich entsprechend den BLAST-Treffern um das Gen kodierend für die Adeninphosphoribosyltransferase (APT). Dieses soll laut Fechter et al. einen geschlechtsspezifischen Unterschied aufweisen und ist somit für die Analyse ausschlaggebend.

4.7.1.1 Adeninphosphoribosyltransferase

Nach der Kartierung durch die NGS-Daten weist nur der Bereich, in dem die ORFs 5-11 liegen, eine Exon-Intron-Struktur auf. Er hat eine bis zu 100 %ige Aminosäuren-Sequenzidentität mit der Adeninphosphoribosyltransferase. Die von Fechter et al. vorhergesagte Sequenzstruktur von sechs Exons und fünf Introns konnte sowohl durch die Kartierung mit den Illumina-Daten als auch durch die mit der Sanger-Methode hergestellten cDNA-Sequenzen bestätigt werden (vgl. Abbildung 3.24). Als geschlechtsspezifischen Unterschied in diesem Gen wird ein Tandemrepeat im zweiten Intron benannt, welcher kennzeichnend für das männliche bzw. das hermaphroditische Allel sein soll. Die beiden Repeateinheiten konnten in der Sequenz des Referenzgenoms, basierend auf einem hermaphroditischen Pinot Noir-Klon, identifiziert werden (siehe Abbildung 3.25).

Bei der Überprüfung mit Hilfe von PCRs auf genomische DNA wichen die Größen der erwarteten Produkte von denen aufgrund der Annotationen in der Referenz angenommenen ab. Das vermeintlich weibliche Allel hat mit 800 bp die eigentlich für das männliche/hermaphroditische Allel vorhergesagte Größe, welches in den PCRs jedoch ca. 900 bp misst. Männliche und hermaphroditische Individuen mit einem weiblichen Allel weisen ein nicht zu erwartendes dritte PCR-Fragment bei 950 bp auf. Zur Sequenzaufklärung der einzelnen Fragmente wurden diese kloniert (siehe 2.2.10) und positive Klone sequenziert (2.2.12). Dabei konnte die größte Bande weder in Produkten basierend auf den männlichen noch auf den hermaphroditischen Individuen einzeln transformiert und identifiziert werden. Auch ein Verdau mit Exonuklease I zeigte keinen Einfluss, sodass auch die Möglichkeit der Einzelstrang („single strand“)-DNA ausgeschlossen werden konnte. Somit handelt es sich hierbei vermutlich um eine Bande, die einen Hybrid aus den PCR-Produkten des weiblichen und des männlichen/hermaphroditischen Allels darstellt. Ein weiterer Beweis dafür ist, dass diese zusätzliche Bande bei den Produkten mit nur einem PCR-Fragment nicht vorkommt. Die Kartierung der geschlechtsspezifischen PCR-Fragmente der verschiedenen männlichen und weiblichen Individuen aus *Vitis sylvestris* und *Vitis berlandieri* sowie hermaphroditischer

Individuen aus *Vitis vinifera* mittels PCR ergab, dass das geschlechtsspezifische Tandemrepeat auch in den Allelsequenzen der weiblichen Individuen vorhanden ist (vgl. Abbildung 3.28). Dadurch erklärt sich die Größe des PCR-Fragments von etwas mehr als 800 bp. Des Weiteren enthält die Sequenz des männlichen/hermaphroditischen Allels eine nicht bekannte Insertion von 70 bp. Aufgrund dieses zusätzlichen Fragments lässt sich die Größe des PCR-Produkts mit fast 900 bp statt den erwarteten 812 bp erklären.

Es zeigte sich, dass das Tandemrepeat nicht mit dem männliche/hermaphroditische Allel gekoppelt ist, da es auch im weiblichen Allel vorkommt. Daher ist der geschlechtsspezifische Einfluss eher fraglich. Vielmehr konnte eine vermutlich Allel-gekoppelte Insertion im männlichen bzw. hermaphroditischen Allel identifiziert werden.

4.7.1.2 Struktur des Gens GSVIVG01001286001

Die Aufklärung der Exon-Intron-Strukturen der Genbereiche in der Lückenregion mit den Transkriptomdaten der geschlechtsspezifischen Blütenorgane zeigt für das Gen GSVIVG01001286001, kodierend für einen WRKY-Transkriptionsfaktor, einen Aufbau abweichend von der Annotation im Referenzgenom. Das Vorkommen von drei statt dem annotierten einen Exon widerlegt die Annahme von Guo et al. (2014), dass es sich bei diesem Gen um das einzige aus der WRKY-Genfamilie in *Vitis vinifera* handelt, welches nur ein Exon trägt. In der Publikation wurde dieses Phänomen durch den evolutionär bedingten Verlust von Exoninformationen begründet. Durch die zunächst nicht vollständig vorhandene Sequenzinformation wurde das Gen ausgehend von den Genvorhersagen durch die verwendeten Tools falsch annotiert. Diese Ergebnisse zeigen erneut, dass das Arbeiten mit einer vorannotierten Referenz nicht nur Vorteile mit sich bringt. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den meisten sequenzierten Genomen um nicht perfekte Entwürfe handelt und Annotationen oft mit Hilfe von Genvorhersage-Tools durchgeführt werden, ist bei Aussagen über Genstrukturen und ihrer Bedeutung über die Entstehung dieser die Korrektheit stets zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

Die unterschiedliche Geschlechtsrealisierung in der getrenntgeschlechtlichen Wildform *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* und in der hermaphroditischen Form der Kulturrebe *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* ist ein komplexer, bis heute nicht aufgeklärter Vorgang. Aufgrund des zweigeschlechtlichen Grundzustandes der Blüten beider Subspezies wird davon ausgegangen, dass die Ausprägung und Aufrechterhaltung der unterschiedlichen Geschlechter während der Domestizierung auf einer Änderung spezifischer Genexpressionen beruht.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der erfolgreiche Versuch unternommen, durch Hochdurchsatzsequenzierungen mit der Next Generation Sequencing (NGS) Technologie ein vollständiges Expressionsprofil der geschlechtsspezifischen Blütenorgane aus je einem hermaphroditischen bzw. den männlichen und weiblichen Individuum zu Beginn der Anthese zu erstellen. Dabei lag der Fokus vor allem auf der Frage, welche Gene einen differenziellen Einfluss auf die dauerhafte Ausprägung der eingeschlechtlichen und hermaphroditischen Blüten haben, selbst nach der abgeschlossenen Blütenentwicklung. Weiterhin wurde die Aussagekraft der rein auf bioinformatischen Berechnungen beruhenden Genexpressionen durch eine weitere Expressionsstudie mittels quantitativer Real Time-PCR überprüft. Mit Hilfe einer funktionellen Eingruppierung der differenziell exprimierten Gene konnten einige identifiziert werden, die allgemein mit der Blütenentwicklung oder speziell mit der Entwicklung geschlechtsspezifischer Organe in Verbindung stehen. Die Ergebnisse lassen auf zwei Gene schließen, die aufgrund ihrer differenziellen Expression in den Blütenorganen der verschiedenen Geschlechter möglicherweise einen Einfluss auf die Geschlechtsrealisierung haben. Dabei ist das Gen kodierend für das Protein RADIALIS-like 1 für die korrekte Ausprägung der Fruchtknoten zuständig, das Gen mit dem Proteinprodukt AGAMOUS-like Protein 8 Homolog für die der Staubblätter. Eine vollständige Erklärung des gesamten Mechanismus der Geschlechtsrealisierung kann nicht gegeben werden, da weiterhin mögliche Gegenspieler zu den bisher identifizierten Genen gesucht werden, die an der Unterdrückung der Ausprägung des jeweils anderen geschlechtsspezifischen Organs in den eingeschlechtlichen Blüten beteiligt sein können.

Die Analysen und Vergleiche der bisherigen veröffentlichten Ergebnisse zur Geschlechtsbestimmung bei *Vitis* offenbaren deutliche Abweichungen zu den in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnissen. Die Lage der geschlechtsbestimmenden Region ist bis heute nicht eindeutig geklärt, da auch die hier genannten potenziellen Kandidatengene der Geschlechtsrealisierung nicht auf Chromosom 2 liegen, welches die geschlechtsbestimmende Region enthalten soll. Demzufolge bedarf es auch hier weiterer Forschungsarbeit.

Wenn auch der Mechanismus der Geschlechtsrealisierung weiterhin nicht geklärt ist, konnten durch diese Arbeit mögliche Kandidatengene herausgearbeitet werden, die eine Grundlage für weitere Untersuchungen bieten. Dabei wäre unter anderem eine Expressionsanalyse dieser Gene in den geschlechtsspezifischen Organen über die gesamte Entwicklung der Blüten hinweg wünschenswert.

Supporting Information (SI)

Alle hier angegebenen Dateien und Dokumente befinden sich im elektronischen Anhang, der dieser Arbeit beiliegt.

Tabellen

SI Tabelle_1 - Absolute Expression Vs SB

Die Tabelle enthält alle exprimierten Gene des Datensatzes 711, ebenso die Top 100 der höchst exprimierten Gene mit BLAST-Treffer.

SI Tabelle _2 – Absolute Expression Vs FK

Die Tabelle enthält alle exprimierten Gene des Datensatzes 712, ebenso die Top 100 der höchst exprimierten Gene mit BLAST-Treffer.

SI Tabelle _3 – Absolute Expression Vv SB

Die Tabelle enthält alle exprimierten Gene des Datensatzes 710, ebenso die Top 100 der höchst exprimierten Gene mit BLAST-Treffer.

SI Tabelle _4 – Absolute Expression Vv FK

Die Tabelle enthält alle exprimierten Gene des Datensatzes 713, ebenso die Top 100 der höchst exprimierten Gene mit BLAST-Treffer.

SI Tabelle _5 – Diff. Expression Male-SB vs. Female-FK

Die Tabelle enthält alle Gene, die unter den \log_2 FC-Bedingungen in dem Vergleich der Datensätze 711 und 712 als differenziell exprimiert sind. Dabei sind auch die interessantesten GO-Gruppen und die eingeordneten Gene aufgeführt.

SI Tabelle _6 – Diff. Expression Hermaphrodite-SB vs. Hermaphrodite-FK

Die Tabelle enthält alle Gene, die unter den \log_2 FC-Bedingungen in dem Vergleich der Datensätze 710 und 713 als differenziell exprimiert sind. Dabei sind auch die interessantesten GO-Gruppen und die eingeordneten Gene aufgeführt.

SI Tabelle _7 – Genaufstellung qPCR

In dieser Tabelle sind alle ausgewählten Gene für die quantitative RT-PCR mit den entsprechenden Expressionswerten aus der RNA-Seq aufgelistet.

SI Tabelle _8 – Expression Male SB qPCR

Die Tabelle zeigt die gemessenen Ct-Werte aus der quantitativen RT-PCR für die ausgewählten DEGs der Staubblattgewebe von *V.s.* sowie die daraus errechneten Expressionswerte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Weiterhin enthält sie die daraus resultierenden Diagramme der NGS- und qPCR-Daten sowie die berechneten Standardabweichungen.

SI Tabelle _9 – Expression Female FK qPCR

Die Tabelle zeigt die gemessenen Ct-Werte aus der quantitativen RT-PCR für die ausgewählten DEGs der Staubblattgewebe von *V.s.* sowie die daraus errechneten Expressionswerte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Weiterhin enthält sie die daraus resultierenden Diagramme der NGS- und qPCR-Daten sowie die berechneten Standardabweichungen.

SI Tabelle _10 – Expression Hermaphrodite SB qPCR

Die Tabelle zeigt die gemessenen Ct-Werte aus der quantitativen RT-PCR für die ausgewählten DEGs der Staubblattgewebe von *V.s.* sowie die daraus errechneten Expressionswerte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Weiterhin enthält sie die daraus resultierenden Diagramme der NGS- und qPCR-Daten sowie die berechneten Standardabweichungen.

SI Tabelle _11 – Expression Hermaphrodite FK qPCR

Die Tabelle zeigt die gemessenen Ct-Werte aus der quantitativen RT-PCR für die ausgewählten DEGs der Staubblattgewebe von *V.s.* sowie die daraus errechneten Expressionswerte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Weiterhin enthält sie die daraus resultierenden Diagramme der NGS- und qPCR-Daten sowie die berechneten Standardabweichungen.

SI Tabelle _12 – verwendete Primer für PCR

Die Tabelle enthält eine Auflistung aller in den PCRs verwendeten Primer.

SI Tabelle _13 –Primer qRT-PCR

Die Tabelle enthält eine Auflistung aller speziell in der qRT-PCR verwendeten Primer.

Sequenzen

SI Fasta_1 – 34kB-Lücke

Die FASTA-Datei enthält die Sequenz der ursprünglich mit 34kB annotierten Lücke.

SI Fasta_2 – Referenzsequenz APT

Die FASTA-Datei enthält die Referenzsequenz des Gens kodierend für die Adenosinphosphoribosyltransferase (APT).

SI Fasta_3 – Referenzsequenz_ GSVIVG01001286001

Die FASTA-Datei enthält die Sequenz des vollständig annotierten Gens GSVIVG01001286001, kodierend für einen WRKY-Transkriptionsfaktor

Dateien

SI Datei_1 – 34kB-Lücke Arbeitsvorgang

Die GFF-Datei enthält die Annotationen in der 34kB-Lücke, welche die unterschiedlichen Arbeitsschritte der Sequenzaufklärung beschreibt.

SI Datei_2 – APT-Annotation_Female

Die GFF-Datei enthält die Annotation des Gens kodierend für die Adenosinphosphoribosyltransferase (APT) auf Grundlage des „mappings“ der cDNA-Sequenzen der weiblichen Individuen gegen die Referenzsequenz der 34kB Lückenregion mit dem Tandemrepeat.

SI Datei_3 – APT-Annotation_Male/Hermaphrodite

Die GFF-Datei enthält die Annotation des Gens kodierend für die Adenosinphosphoribosyltransferase (APT) auf Grundlage des „mappings“ der cDNA-Sequenzen der männlichen/hermaphroditischen Individuen gegen die Referenzsequenz der 34kB Lückenregion mit dem Tandemrepeat und der Insertion.

SI Datei_4 – GSVIVG01001286001_Annotation

Die GFF-Datei enthält die Annotation des Gens kodierend für den WRKY-Transkriptionsfaktor auf Grundlage des „mappings“ der cDNA-Sequenzen aller Individuen gegen die in diesem Bereich vollständig entschlüsselte Referenzsequenz.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ranken am Ende eines Rebentriebes	1
Abbildung 1.2: Morphologie der Blätter	3
Abbildung 1.3: Ausschnitte von Blütenständen.....	4
Abbildung 2.1: verwendete Molekulargewichtsmarker	21
Abbildung 2.2: Ablauf einer Inversen PCR.....	24
Abbildung 2.3: Dissoziationskurven eines unspezifischen Genprodukts (links) sowie eines spezifischen Genprodukts (rechts) aus der qRT-PCR.....	26
Abbildung 2.4: Amplifikationskurve eines technischen Triplikats in der semilogarithmischen Ansicht	27
Abbildung 2.5: Vektorkarte des pGem®-T easy	29
Abbildung 3.1: Ergebnisse der RNA-Isolierung	35
Abbildung 3.2: „heatmap“ aller Expressionsprofile der Illumina-Datensätze	38
Abbildung 3.3: REVIGO-Treemap der „GO-Term“-Analyse des Staubblattgewebes des männlichen Individuums aus <i>Vitis sylvestris</i>	40
Abbildung 3.4: REVIGO-Treemap der „GO-Terms“ Analyse des Fruchtknotengewebes des weiblichen Individuums aus <i>Vitis sylvestris</i>	41
Abbildung 3.5: REVIGO-Treemap der „GO-Term“ Analyse des Staubblattgewebes des hermaphroditischen Individuums aus <i>Vitis vinifera</i>	43
Abbildung 3.6: REVIGO-Treemap der „GO-Terms“ Analyse des Fruchtknotengewebes des hermaphroditischen Individuums aus <i>Vitis vinifera</i>	44
Abbildung 3.7: GO-Klassifizierung „Biologische Prozesse“ der differenziell exprimierten Gene aus <i>Vitis sylvestris</i>	45
Abbildung 3.8: GO-Klassifizierung „Molekulare Funktion“ der differenziell exprimierten Gene aus <i>Vitis sylvestris</i>	47
Abbildung 3.9: GO-Klassifizierung „Zelluläre Komponente“ der differenziell exprimierten Gene aus <i>Vitis sylvestris</i>	47
Abbildung 3.10: GO-Klassifizierung „Biologische Prozesse“ der differenziell exprimierten Gene aus <i>Vitis vinifera</i>	51
Abbildung 3.11: GO-Klassifizierung „Molekulare Funktion“ der differenziell exprimierten Gene aus <i>Vitis vinifera</i>	52

Abbildung 3.12: GO-Klassifizierung „Zelluläre Komponente“ der differenziell exprimierten Gene aus <i>Vitis vinifera</i>	52
Abbildung 3.13: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.s.-Staubblatt.....	60
Abbildung 3.14: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.s.-Fruchtknoten.....	62
Abbildung 3.15: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.v.-Staubblatt (1)	63
Abbildung 3.16: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.v.-Staubblatt (2)	63
Abbildung 3.17: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.v.-Fruchtknoten (1)...	64
Abbildung 3.18: Vergleich der Expression ausgewählter DEGs aus V.v.-Fruchtknoten (2)...	65
Abbildung 3.19: Lage der 34 kb-Lückenregion in der geschlechtsbestimmenden Region	66
Abbildung 3.20: Arbeitsvorgang für die Aufklärung der Sequenzinformation in der 34 kb-Lückenregion	66
Abbildung 3.21: Lage der vorhergesagten ORFs in der 34 kb-Lückenregion.....	67
Abbildung 3.22: „large gap read mapping“ vom Datensatz 713 gegen die Lückenregion	69
Abbildung 3.23: „large gap read mapping“ vom Datensatz 710 gegen die Lückenregion	70
Abbildung 3.24: „large gap read mapping“ der Sanger-Sequenzen aus der RT-PCR.....	71
Abbildung 3.25: Dotplot des Alignments der Forward-Sequenz des Introns aus der Referenz PN40024	72
Abbildung 3.26: Lage der Indel sowie des spezifischen Primer-Paars im Gen GSVIVG0100518001.....	72
Abbildung 3.27: Ergebnis der PCR mit den VSVV010-Primern	73
Abbildung 3.28: Assemblierung der Sequenzen aus <i>Vitis sylvestris</i> Ketsch Klon 53 ♀	75
Abbildung 3.29: Assemblierung der cDNA-Sequenzen aus <i>Vitis sylvestris</i> Alba ♂	76
Abbildung 3.30: GSVIG01001286001, kodierend für einen WRKY-Transkriptionsfaktor	77
Abbildung 4.1: Anzahl der „reads“ für verschiedene Transkriptomanalyse	80
Abbildung 4.2: Modell zur Geschlechtsrealisierung beider geschlechtsspezifischen Organe in den Blüten von <i>Vitis vinifera</i>	96
Abbildung 4.3: Modell zur Geschlechtsrealisierung beider geschlechtsspezifischen Organe in den Blüten von <i>Vitis sylvestris</i>	97
Abbildung 4.4: Übersicht der Lage der geschlechtsbestimmenden Regionen und potenzieller Kandidatengene auf Chromosom 2.	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Stadien des modifizierten E-L Systems, zusammengefasst in größere Makrostadien (Coombe, 1995).....	6
Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Individuen für die Blütenentnahme und den jeweiligen Entnahmezeitpunkt.....	17
Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Individuen für verschiedene Gewebe und den jeweiligen Entnahmezeitpunkt.....	18
Tabelle 2.3: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes in einem Volumen von 50 µl	23
Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes einer qRT-PCR pro Probe	25
Tabelle 2.5: Ablauf der quantitativen Real-Time PCR	26
Tabelle 2.6: Parameter des angewendeten Trimming-Skripts	30
Tabelle 3.1: Übersicht der Rohdaten der vier entstandenen Datensätze mit der jeweiligen totalen Sequenzanzahl (Anzahl der „reads“) und totalen Basenzahl.....	36
Tabelle 3.2: Übersicht der getrimmten Daten der vier entstandenen Datensätze mit der jeweiligen totalen Sequenzanzahl (Anzahl der „reads“) und totalen Basenzahl.....	36
Tabelle 3.3: Prozentzahl an „merged reads“ für jeden Datensatz	37
Tabelle 3.4: GO-Zuordnung von Genen mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung aus <i>Vitis sylvestris</i>	46
Tabelle 3.5: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 711.....	48
Tabelle 3.6: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 712.....	49
Tabelle 3.7: GO-Zuordnung von Genen mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung aus <i>Vitis vinifera</i>	51
Tabelle 3.8: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 710.....	53
Tabelle 3.9: Auflistung der signifikant angereicherten „GO-Terms“ der differenziell exprimierten Gene des Datensatzes 713.....	54
Tabelle 3.10: Ausgewählte Gene für qRT-PCR aus dem Vergleich Male-Staubblatt vs. Female-Fruchtknoten.....	56

Tabelle 3.11: Ausgewählte Gene für qRT-PCR aus dem Vergleich Hermaphrodite-Staubblatt vs. Hermaphrodite-Fruchtknoten 58

Tabelle 3.12: Übersicht über die Lage und BLAST-Treffer der identifizierten ORFs 68

Tabelle 3.13: verwendete Individuen für die DNA-Isolierung aus Blättern mit dem dazugehörigen Genotyp 74

Tabelle 4.1: Expressionswerte der analysierten Gene mit möglicher Beteiligung an der Geschlechtsrealisierung 96

Literaturverzeichnis

- Aarts, M. G., Keijzer, C. J., Stiekema, W. J. & Pereira, A. (1995).** Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *The Plant Cell*, 7(12), 2115–2127. doi:10.1105/tpc.7.12.2115
- Abbal, P., Pradal, M., Chatelet, P., Paillard, S., Canaguier, A., Adam-Blondon, A.-F. & Tesniere, C. (2007).** Molecular characterization and expression analysis of the Rop GTPase family in *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot*, 58(10), 2641–2652. doi:10.1093/jxb/erm113
- Ablett, E., Seaton, G., Scott, K., Shelton, D., Graham, M. W., Baverstock, P., ... Henry, R. (2000).** Analysis of grape ESTs: Global gene expression patterns in leaf and berry. *Plant Science*, 159(1), 87–95. doi:10.1016/S0168-9452(00)00335-6
- Adamczyk, B. J. & Fernandez, D. E. (2009).** MIKC* MADS domain heterodimers are required for pollen maturation and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(4), 1713–23. doi:10.1104/pp.109.135806
- Agilent. (n.d.).** Interpretation of Agilent 2100 Bioanalyzer Data.
- Allen, M., Qin, W., Moreau, F. & Moffatt, B. (2002).** Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum*, 115(1), 56–68. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1150106.x
- Alleweldt, G. & Possingham, J. V. (1988).** Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 669–673.
- Altenberg, B. & Greulich, K. O. (2004).** Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*, 84(6), 1014–1020. doi:10.1016/j.ygeno.2004.08.010
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alvarez-Buylla, E. R., Azpeitia, E., Barrio, R., Benitez, M. & Padilla-Longoria, P. (2010).** From ABC genes to regulatory networks, epigenetic landscapes and flower morphogenesis: Making biological sense of theoretical approaches. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(1), 108–117. doi:10.1016/j.semcd.2009.11.010
- Antcliff, A. (1980).** Inheritance of sex in *Vitis*.pdf.
- Aurand, O. J. (2014).** Lage im internationalen Weinbausektor (Press Release OIV), 4–5.
- Baggiolini, M., Lorenz, H., Bleiholder, H., T, V. D. B., Stauss, R., Weber, E., ... Viret, O. (2008).** Stades phénologiques repères de la vigne. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 44(12), 7–9.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.-C., Ohto, M.-A., Ushijima, K., Nakano, R., ... Blumwald, E. (2011).** The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell*, 23(9), 3482–97. doi:10.1105/tpc.111.089581

- Battaglia, M. & Covarrubias, A. A. (2013).** Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 4(June), 1–11. doi:10.3389/fpls.2013.00190
- Battilana, J., Lorenzi, S., Moreira, F. M., Moreno-Sanz, P., Failla, O., Emanuelli, F. & Grando, M. S. (2013).** Linkage Mapping and Molecular Diversity at the Flower Sex Locus in Wild and Cultivated Grapevine Reveal a Prominent SSR Haplotype in Hermaphrodite Plants. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 1031–7. doi:10.1007/s12033-013-9657-5
- Becker, A. (2003).** The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 464–489. doi:10.1016/S1055-7903(03)00207-0
- Bellin, D., Ferrarini, A., Chimento, A., Kaiser, O., Levenkova, N., Bouffard, P. & Delledonne, M. (2009).** Combining next-generation pyrosequencing with microarray for large scale expression analysis in non-model species. *BMC Genomics*, 10, 555. doi:10.1186/1471-2164-10-555
- Benjak, A., Forneck, A. & Casacuberta, J. M. (2008).** Genome-wide analysis of the “cut-and-paste” transposons of grapevine. *PLoS ONE*, 3(9). doi:10.1371/journal.pone.0003107
- Blencowe, B., Ahmad, S. & Lee, L. (2009).** Current-generation high-throughput sequencing : deepening insights into mammalian transcriptomes. *Genes and Development*, 23, 1379–1386. doi:10.1101/gad.1788009.altered
- Bolwell, G. P., Bozak, K. & Zimmerlint, A. (1994).** PLANT CYTOCHROME P450. *Phytochemistry*, 37(6), 1491–1506.
- Bosch, M., Cheung, A. Y. & Hepler, P. K. (2005).** Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, 138(July), 1334–1346. doi:10.1104/pp.105.059865.nor
- Boss, P. K., Davies, C. & Robinson, S. P. (1996).** Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology*, 32(3), 565–569. doi:10.1007/BF00019111
- Boss, P. K., Sensi, E., Hua, C., Davies, C. & Thomas, M. R. (2002).** Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science*, 162(6), 887–895. doi:10.1016/S0168-9452(02)00034-1
- Boss, P. K., Vivier, M., Matsumoto, S., Dry, I. B. & Thomas, M. R. (2001).** A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology*, 45(5), 541–553. doi:10.1023/A:1010634132156
- Botling, J., Edlund, K., Segersten, U., Tahmasebpoor, S., Engström, M., Sundström, M., ... Micke, P. (2009).** Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 18(1), 44–52. doi:10.1097/PDM.0b013e3181857e92
- Boualem, A., Troadec, C., Kovalski, I., Sari, M. A., Perl-Treves, R. & Bendahmane, A. (2009).** A conserved ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in two Cucumis species. *PLoS ONE*, 4(7). doi:10.1371/journal.pone.0006144

- Bowman, J. L. (2000).** The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(1), 17–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679447>
- Bowman, J. L., Drews, G. N. & Meyerowitz, E. M. (1991).** Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development. *The Plant Cell*, 3(8), 749–758. doi:10.1105/tpc.3.8.749
- Buermans, H. P. J. & den Dunnen, J. T. (2014).** Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015
- Cahoon, E. B., Hall, S. E., Ripp, K. G., Ganzke, T. S., Hitz, W. D. & Coughlan, S. J. (2003).** Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology*, 21(9), 1082–1087. doi:10.1038/nbt853
- Caporali, E., Spada, A., Marziani, G., Failla, O. & Scienza, A. (2003).** The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp. *silvestris*. *Sexual Plant Reproduction*, 15(6), 291–300. doi:10.1007/s00497-003-0169-5
- Carmona, M., Cubas, P., & Marti, M. (2002).** VFL, the Grapevine FLORICAULA / LEAFY Ortholog, Is Expressed in Meristematic Regions Independently of. *Plant Physiology*, 130. doi:10.1104/pp.002428.68
- Carmona, M. J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J. M. & Thomas, M. R. (2008).** A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 59(10), 2579–96. doi:10.1093/jxb/ern160
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Eulgem, T., ... Zhu, T. (2002).** Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell*, 14(3), 559–574. doi:10.1105/tpc.010410
- Chepyshko, H., Lai, C.-P., Huang, L.-M., Liu, J.-H. & Shaw, J.-F. (2012).** Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. japonica) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics*, 13(1), 309. doi:10.1186/1471-2164-13-309
- Coimbra, S., Costa, M., Mendes, M. A., Pereira, A. M., Pinto, J. & Pereira, L. G. (2010).** Early germination of Arabidopsis pollen in a double null mutant for the arabinogalactan protein genes AGP6 and AGP11. *Sexual Plant Reproduction*, 23(3), 199–205. doi:10.1007/s00497-010-0136-x
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. & Robles, M. (2005).** Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676. doi:10.1093/bioinformatics/bti610
- Coombe, B. G. (1995).** Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(2), 104–110. doi:10.1111/j.1755-0238.1995.tb00086.x
- Cosgrove, D. J. (2000).** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321–326. doi:10.1038/35030000

- Cosgrove, D. J. (2015).** Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 162–172. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.014
- Costa, M. M. R., Fox, S., Hanna, A. I., Baxter, C. & Coen, E. (2005).** Evolution of regulatory interactions controlling floral asymmetry. *Development (Cambridge, England)*, 132(22), 5093–5101. doi:10.1242/dev.02085
- Cramer, G. R., Ghan, R., Schlauch, K. a, Tillett, R. L., Heymann, H., Ferrarini, A., ... Pezzotti, M. (2014).** Transcriptomic analysis of the late stages of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) berry ripening reveals significant induction of ethylene signaling and flavor pathways in the skin. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–21. doi:10.1186/s12870-014-0370-8
- D’Auria, J. C. & Gershenzon, J. (2005).** The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3), 308–316. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.012
- D’Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. & Bellincampi, D. (2004).** Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696(2), 237–44. doi:10.1016/j.bbapap.2003.08.012
- Dafni, A. & Firmage, D. (2000).** Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 113–132. doi:10.1007/BF00984098
- Dal Santo, S., Tornielli, G. B., Zenoni, S., Fasoli, M., Farina, L., Anesi, A., ... Pezzotti, M. (2013).** The plasticity of the grapevine berry transcriptome. *Genome Biology*, 14(6), r54. doi:10.1186/gb-2013-14-6-r54
- Dalbó, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., Steinkellner, H., Sefc, K. M. & Reisch, B. I. (2000).** A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National de Recherches Canada*, 43(2), 333–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791822>
- Debeaujon, I., Peeters, A. J. M., Léon-kloosterziel, K. M. & Koornneef, M. (2001).** The TRANSPARENT TESTA12 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Multidrug Secondary Transporter-like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium. *The Plant*, 13(April), 853–871. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/13/4/853.full.pdf+html>
- Deluc, L. G., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Tillett, R. L., Quilici, D. R., Osborne, C., ... Cramer, G. R. (2007).** Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics*, 8, 429. doi:10.1186/1471-2164-8-429
- Dhekney, S. A., Li, Z. T., Compton, M. E. & Gray, D. J. (2009).** Optimizing initiation and maintenance of *Vitis* embryogenic cultures. *HortScience*, 44(5), 1400–1406. Retrieved from <Go to ISI>://CABI:20093260308 \n<http://hortsci.ashspublications.org/>
- Díaz-Riquelme, J., Grimplet, J., Martínez-Zapater, J. M. & Carmona, M. J. (2012).** Transcriptome variation along bud development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 12(1), 181. doi:10.1186/1471-2229-12-181

- Ding, B. (2013).** Vergleich der geschlechtsbestimmenden Kandidatengene aus *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* und *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*.
- Disch, S., Anastasiou, E., Sharma, V. K., Laux, T., Fletcher, J. C. & Lenhard, M. (2006).** The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls Arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner. *Current Biology*, 16(3), 272–279. doi:10.1016/j.cub.2005.12.026
- Dokoozlian, N. (2000).** Grape berry growth and development. *Raisin Production Manual*, 30–37. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=rMoAET18u9YC&oi=fnd&pg=PA30&dq=Grape+Berry+Growth+and+Development&ots=0gLy8BKFN3&sig=JWpcM0ATvMOqmFlvDBp2xSxI5DE>
- Donoghue, M. J., Ree, R. H. & Baum, D. A. (1998).** Phylogeny and the evolution of flower symmetry in the asteridae. *Trends in Plant Science*, 3(8), 311–317. doi:10.1016/S1360-1385(98)01278-3
- Dornelas, M. C., Van Lammeren, A. A. & Kreis, M. (2000).** Arabidopsis thaliana SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 21(5), 419–29. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00691.x
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z. & Su, Z. (2010).** agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W64–W70. doi:10.1093/nar/gkq310
- Eichhorn, K. W. & Lorenz, H. (1977).** Phaenologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Deutsche Weinbau*, 1, 1977. Retrieved from http://www.winegrowers.info/spraying/development/stages_of_the_vine.htm
- Fasoli, M., Dal Santo, S., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Farina, L., Zamboni, A., ... Pezzotti, M. (2012).** The Grapevine Expression Atlas Reveals a Deep Transcriptome Shift Driving the Entire Plant into a Maturation Program. *The Plant Cell*, 24(9), 3489–3505. doi:10.1105/tpc.112.100230
- Fechter, I., Hausmann, L., Daum, M., Sørensen, T. R., Viehöver, P., Weisshaar, B. & Töpfer, R. (2012).** Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 287(3), 247–59. doi:10.1007/s00438-012-0674-z
- Fleige, S. & Pfaffl, M. W. (2006).** RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 126–139. doi:10.1016/j.mam.2005.12.003
- Fletcher, J. C. (2002).** Shoot and Floral Meristem Maintenance in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 45–66. doi:10.1146/annurev.arplant.53.092701.143332
- Follmann, H. (1974).** Die enzymatische Ribonucleotid-Reduktion: Biosyntheseweg der Desoxyribonucleotide. *Angewandte Chemie*, 406(17), 624 – 634.
- Fung, R. W. M., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L. G., He, Y., Marsh, E., ... Qiu, W. (2008).** Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiology*, 146(1), 236–249. doi:10.1104/pp.107.108712

- Funkapb, C., Schriider, W. P., Greena, B. R., Rengerb, G. & Anderssona, B. (1994).** The intrinsic 22 kDa protein is a chlorophyll-binding photosystem II subunit of, 342, 261–266.
- Gao, Z., Petreikov, M., Zamski, E. & Schaffer, A. A. (1999).** Carbohydrate metabolism during early fruit development of sweet melon (*Cucumis melo*). *Physiologia Plantarum*, 106(1), 1–8. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.106101.x
- Gasic, K., Hernandez, A. & Korban, S. S. (2004).** RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4), 437–438. doi:10.1007/BF02772687
- Glenn, T. C. (2011).** Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759–769. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x
- Goes da Silva, F., Iandolino, A., Al-Kayal, F. & Bohlmann, M. C. (2005).** Characterizing the Grape Transcriptome. Analysis of Expressed Sequence Tags from Multiple *Vitis* Species and Development of a Compendium of Gene Expression during Berry Development. *October*, 139(October), 574–597. doi:10.1104/pp.105.065748.574
- Gookin, T. E., Hunter, D. A. & Reid, M. S. (2003).** Temporal analysis of alpha and beta-expansin expression during floral opening and senescence. *Plant Science*, 164, 769–781. doi:10.1016/S0168-9452(03)00063-3
- Guo, C., Guo, R., Xu, X., Gao, M., Li, X., Song, J., ... Wang, X. (2014).** Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/eru007
- Hack, H. (1992).** Die erweiterte BBCH-Skala.
- Hadfield, K. A., & Bennett, A. B. (1998).** Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117(2), 337–343. doi:10.1104/pp.117.2.337
- Hamaguchi, A., Yamashino, T., Koizumi, N., Kiba, T., Kojima, M., Sakakibara, H. & Mizuno, T. (2008).** A Small Subfamily of *Arabidopsis* RADIALIS-LIKE SANT/MYB Genes: A Link to HOOKLESS1-Mediated Signal Transduction during Early Morphogenesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(10), 2687–2696. doi:10.1271/bbb.80348
- Hellmann, E. W. (2003).** *Grapevine Structure and Function*. *Oregon Viticulture*. Retrieved from <http://gencowinemakers.com/docs/Grapevine Structure and Function.pdf>
- Holzapfel, B. & Wickert, L. (2007).** Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in Unserer Zeit*, 37(2), 120–126. doi:10.1002/biuz.200610332
- Ito, T., Ng, K.-H., Lim, T.-S., Yu, H. & Meyerowitz, E. M. (2007).** The Homeotic Protein AGAMOUS Controls Late Stamen Development by Regulating a Jasmonate Biosynthetic Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 19(11), 3516–3529. doi:10.1105/tpc.107.055467
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., ... Wincker, P. (2007).** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161), 463–7. doi:10.1038/nature06148

- Jensen, K. & Møller, B. L. (2010).** Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry*, 71(2-3), 132–141. doi:10.1016/j.phytochem.2009.10.017
- Jiao, C., Gao, M., Wang, X. & Fei, Z. (2015).** Transcriptome characterization of three wild Chinese Vitis uncovers a large number of distinct disease related genes. *BMC Genomics*, 16(1), 1–12. doi:10.1186/s12864-015-1442-3
- Jin, R., Chow, V. T.-K., Tan, P.-H., Dheen, S. T., Duan, W. & Bay, B.-H. (2002).** Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis*, 23(1), 81–86.
- Knox, R. B. (1970).** Freeze-Sectioning of Plant Tissues. *Stain Technology*, 45(6), 265–272. doi:10.3109/10520297009067799
- Kobe, B., & Deisenhofer, J. (1994).** The leucine-rich repeat: a versatile binding motif, (October).
- Koes, R. E., Quattrocchio, F. & Mol, J. N. M. (1994).** The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution. *BioEssays*, 16(2), 123–132. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Ronald_Koes/publication/229726897_The_flavonoid_biosynthetic_pathway_in_plants_Function_and_evolution/links/0c960530635f3652a1000000.pdf
- Krizek, B. A. (2015).** AINTEGUMENTA-LIKE genes have partly overlapping functions with AINTEGUMENTA but make distinct contributions to Arabidopsis thaliana flower development. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4537–4549. doi:10.1093/jxb/erv224
- Kühn, N. & Arce-Johnson, P. (2012).** Pollination. *Plant Signaling & Behavior*, 7(1), 7–11. doi:10.4161/psb.7.1.18353
- Kumar, R., Kushalappa, K., Godt, D., Pidkowich, M. S., Pastorelli, S., Hepworth, S. R. & Haughn, G. W. (2007).** The Arabidopsis BEL1-LIKE HOMEODOMAIN proteins SAW1 and SAW2 act redundantly to regulate KNOX expression spatially in leaf margins. *The Plant Cell*, 19(9), 2719–2735. doi:10.1105/tpc.106.048769
- Kurkela, S. & Borg-Franck, M. (1992).** Structure and expression of kin2, one of two cold-and ABA-induced genes of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 19, 689–692. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00026794>
- Lalonde, S., Beebe, D. U. & Saini, H. S. (1997).** Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sexual Plant Reproduction*, 10(1), 40–48. doi:10.1007/s004970050066
- Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M. S., Santos, C. & Pinto-Carnide, O. (2006).** Nuclear DNA content of Vitis vinifera cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Reports*, 25(9), 978–85. doi:10.1007/s00299-006-0162-1
- Lebon, G., Brun, O., Magné, C. & Clément, C. (2005).** Photosynthesis of the grapevine (Vitis vinifera) inflorescence. *Tree Physiology*, 25(5), 633–639.

- Lebon, G., Wojnarowicz, G., Holzapfel, B., Fontaine, F., Vaillant-Gaveau, N. & Clement, C. (2008).** Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59(10), 2565–2578. doi:10.1093/jxb/ern135
- León, J., Rojo, E. & Sánchez-Serrano, J. J. (2001).** Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 1–9. doi:10.1093/jexbot/52.354.1
- Li, J., Hansen, B. G., Ober, J. A., Kliebenstein, D. J. & Halkier, B. A. (2008).** Subclade of Flavin-Monooxygenases Involved in Aliphatic Glucosinolate Biosynthesis. *Plant Physiology*, 148(3), 1721–1733. doi:10.1104/pp.108.125757
- Lin, Y. L., Shivji, M. K., Chen, C., Kolodner, R., Wood, R. D., & Dutta, A. (1998).** The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1453–1461. doi:10.1074/jbc.273.3.1453
- Linskens, H. F. (1973).** Activation of the Ovary. *Caryologia*, 25(sup1), 27–41. doi:10.1080/00087114.1973.10797111
- Litt, A. & Kramer, E. M. (2010).** The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(1), 129–137. doi:10.1016/j.semcdb.2009.11.019
- Liu, Z., Boachon, B., Lugan, R., Tavares, R., Erhardt, M., Mutterer, J., ... Renault, H. (2015).** A conserved cytochrome P450 evolved in seed plants regulates flower maturation. *MOLECULAR PLANT*, 0. doi:10.1016/j.molp.2015.09.002
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Logemann, J., Schell, J. & Willmitzer, L. (1987).** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 163(1), 16–20. doi:10.1016/0003-2697(87)90086-8
- Lolle, S. J., Hsu, W. & Pruitt, R. E. (1998).** Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 149(2), 607–619.
- Ma, H. (1994).** GTP-binding proteins in plants : new members of an old family. *Plant Molecular Biology*, 26, 1611–1636.
- Maita, H., Kitaura, H., Ariga, H. & Iguchi-Ariga, S. M. M. (2005).** CIR , a corepressor of CBF1 , binds to PAP-1 and effects alternative splicing. *Experimental Cell Research*, 303, 375–387. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.012
- Mandel, M. A. & Yanofsky, M. F. (1995).** The *Arabidopsis* AGL8 MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by APETALA1. *The Plant Cell*, 7(11), 1763–71. doi:10.1105/tpc.7.11.1763
- Mandel, M. A. & Yanofsky, M. F. (1998).** The *Arabidopsis* ALG9 MADS-box gene is expressed in young flower primordia. *Sex Plant Reproduction*, 11, 22–28.

- Marei, N. & Romani, R. (1971).** Ethylene-stimulated Synthesis of Ribosomes, Ribonucleic Acid, and Protein in Developing Fig Fruits. *Plant Physiology*, 48(6), 806–808. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC396953/>
- Marguerit, E., Boury, C., Manicki, A., Donnart, M., Butterlin, G., Némorin, A., ... Decroocq, S. (2009).** Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 118(7), 1261–78. doi:10.1007/s00122-009-0979-4
- Martin, D. M., Aubourg, S., Schouwey, M. B., Daviet, L., Schalk, M., Toub, O., ... Bohlmann, J. (2010).** Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biology*, 10(1), 226. doi:10.1186/1471-2229-10-226
- Martin, J. A. & Wang, Z. (2011).** Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews. Genetics*, 12(10), 671–682. doi:10.1038/nrg3068
- Matsui, A., Yin, Y., Yamanaka, K., Iwasaki, M. & Ashihara, H. (2007).** Metabolic fate of nicotinamide in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 131(2), 191–200. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00959.x
- Matsuyama, T., Yasumura, N., Funakoshi, M., Yamada, Y. & Hashimoto, T. (1999).** Maize Genes Specifically Expressed in the Outermost Cells of Root Cap. *Plant Cell Physiol.*, 40(5), 469–476.
- McGovern, P. E., Glusker, D. L. & Exner, L. J. (1996).** Neolithic resinated wine.pdf. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v381/n6582/pdf/381480a0.pdf>
- Mimura, S. & Takisawa, H. (1998).** Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase α onto chromatin under the control of S-phase cdk. *The EMBO*, 17(19), 5699–5707.
- Moretti, T., Koons, B. & Budowle, B. (1998).** Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq gold(TM) DNA polymerase. *BioTechniques*, 25(4), 716–722.
- Morozova, O., Hirst, M. & Marra, M. A. (2009).** Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 135–151. doi:10.1146/annurev-genom-082908-145957
- Mullins, M. G., Bouquet, A. & Williams, L. E. (1992).** *Biology of the Grapevine (The Biology of Horticultural Crops)*. Cambridge University Press.
- Negi, S. S. & Olmo, H. P. (1971).** Conversion and determination of sex.pdf. Davis, USA: S.S.Negi and H.P.Olmo. Retrieved from <http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/e011027.pdf>
- Nole-Wilson, S., Tranby, T. L. & Krizek, B. A. (2005).** AINTEGUMENTA-like (AIL) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant Molecular Biology*, 57(5), 613–28. doi:10.1007/s11103-005-0955-6
- Nwafor, C. C., Gribaudo, I., Schneider, A., Wehrens, R., Grando, M. S. & Costantini, L. (2014).** Transcriptome analysis during berry development provides insights into co-regulated and altered gene expression between a seeded wine grape variety and its seedless somatic variant, 15(1), 1–22. doi:10.1186/1471-2164-15-1030

- Oberle, G. D. (1938).** A Genetic Study of Variation in Floral Morphology and Function in Cultivated Forms of *Vitis*.
- Olmo, H. P. & Negi, S. S. (1970).** Studies on sex conversion in male *Vitis vinifera* L. (*sylvestris*).pdf. Retrieved from <http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/e000932.pdf>
- Parker, J. (1995).** Male and Female Flowers of the Dioecious Plant Sorrel Show Different Patterns of MADS Box Gene Expression, 7(October), 1583–1598.
- Picq, S., Santoni, S., Lacombe, T., Latreille, M., Weber, A., Ardisson, M., ... Bacilieri, R. (2014).** A small XY chromosomal region explains sex determination in wild dioecious *V. vinifera* and the reversal to hermaphroditism in domesticated grapevines. *BMC Plant Biology*, 14(1), 229. doi:10.1186/s12870-014-0229-z
- Pina, C., Pinto, F., Feijó, J. A. & Becker, J. D. (2005).** Gene Family Analysis of the Arabidopsis Pollen Transcriptome Reveals Biological Implications for Cell Growth, Division Control, and. *Plant Physiology*, 138(June), 744–756. doi:10.1104/pp.104.057935.female
- Plomin, R. & Schalkwyk, L. C. (2007).** Microarrays. *Developmental Science*, 10(1), 19–23. doi:10.1111/j.1467-7687.2007.00558.x
- Prunet, N., Morel, P., Negruțiu, I. & Trehin, C. (2009).** Time to stop: flower meristem termination. *Plant Physiology*, 150(4), 1764–1772. doi:10.1104/pp.109.141812
- Ramos, M. J., Coito, J. L., Silva, H. G., Cunha, J., Costa, M. M. & Rocheta, M. (2014).** Flower development and sex specification in wild grapevine. *BMC Genomics*, 15(1), 1095. doi:10.1186/1471-2164-15-1095
- Rasbery, J. M., Shan, H., Leclair, R. J., Norman, M., Matsuda, S. P. T. & Bartel, B. (2007).** Arabidopsis thaliana Squalene Epoxidase 1 Is Essential for Root and Seed Development * □. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 17002–17013. doi:10.1074/jbc.M611831200
- Riaz, S., Krivanek, A. F., Xu, K. & Walker, M. A. (2006).** Refined mapping of the Pierce's disease resistance locus, PdR1, and Sex on an extended genetic map of *Vitis rupestris* x *V. arizonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(7), 1317–1329. doi:10.1007/s00122-006-0385-0
- Robinson, T. (1974).** Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 184(4), 430–435. doi:10.1126/science.184.4135.430
- Rogers, S. O. & Bendich, A. J. (1987).** Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology*, 9(5), 509–520. doi:10.1007/BF00015882
- Schlaich, N. L. (2007).** Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends in Plant Science*, 12(9), 412–418. doi:10.1016/j.tplants.2007.08.009
- Schmitz, J., Franzen, R., Ngyuen, T. H., Garcia-Maroto, F., Pozzi, C., Salamini, F. & Rohde, W. (2000).** Cloning, mapping and expression analysis of barley MADS-box genes. *Plant Molecular Biology*, 42(6), 899–913. doi:10.1023/A:1006425619953
- Shangguan, L., Han, J., Kayesh, E., Sun, X., Zhang, C., Pervaiz, T., ... Fang, J. (2013).** Evaluation of genome sequencing quality in selected plant species using expressed sequence tags. *PloS One*, 8(7), e69890. doi:10.1371/journal.pone.0069890

- Shinde, B. N., Pawar, B. R., Shinde, S. J. & Kalalbandi, B. M. (2008).** Studies on anthesis and dehiscence in different varieties of grape (*Vitis vinifera* L.). *The Asian Journal of Horticulture*, 3(1), 167–168.
- Singh, K., Talla, A. & Qiu, W. (2012).** Small RNA profiling of virus-infected grapevines: Evidences for virus infection-associated and variety-specific miRNAs. *Functional and Integrative Genomics*, 12(4), 659–669. doi:10.1007/s10142-012-0292-1
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Muiño, J. M., Blanvillain, R. & Busscher, M. (2012).** Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. doi:10.1073/pnas.1112871109/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1112871109
- Sonia Tarazona, Fernando Garcia-Alcalde & Dopazo, J. (2011).** Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Research*, 2213–2223. doi:10.1101/gr.124321.111.Freely
- Spiers, J., Brady, C., Grierson, D. & Lee, E. (1984).** Changes in Ribosome Organization and Messenger RNA Abundance in Ripening Tomato Fruits. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11(3), 225. doi:10.1071/PP9840225
- Srinivasan, C. & Mullins, M. G. (1976).** Reproductive Anatomy of the Grape-vine { *Vitis vinifera* L. }: Origin and Development of the Anlage and its Derivatives. *Annals of Botany*, 1079–1084.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N. & Šmuc, T. (2011).** REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE*, 6(7), e21800. doi:10.1371/journal.pone.0021800
- Sweetman, C., Wong, D. C., Ford, C. M. & Drew, D. P. (2012).** Transcriptome analysis at four developmental stages of grape berry (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) provides insights into regulated and coordinated gene expression. *BMC Genomics*, 13(1), 691. doi:10.1186/1471-2164-13-691
- Takaiwa, F., Kikuchi, S. & Oono, K. (1986).** The structure of rice storage protein glutelin precursor deduced from cDNA. *FEBS Letters*, 206(1), 33–35. doi:10.1016/0014-5793(86)81335-7
- Tekleyohans, D. G. (2014).** Functional and molecular characterization of B sister genes in the two model species : *Arabidopsis thaliana* and *Eschscholzia californica* Dawit Girma Tekleyohans. Retrieved from http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2015/11263/pdf/TekleyohansDawitGirma_2014_04_10.pdf
- Terral, J.-F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., ... This, P. (2010).** Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105(3), 443–55. doi:10.1093/aob/mcp298
- Theißen, G. (2001).** Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(1), 75–85. doi:10.1016/S1369-5266(00)00139-4
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., ... Saedler, H. (2000).** A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 42(1), 115–49.

- This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M. & Owens, C. L. (2007).** Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 723–730. doi:10.1007/s00122-006-0472-2
- This, P., Lacombe, T. & Thomas, M. R. (2006).** Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics : TIG*, 22(9), 511–9. doi:10.1016/j.tig.2006.07.008
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A. & Thevissen, K. (2002).** Plant defensins. *Planta*, 216, 193–202. doi:10.1007/s00425-002-0902-6
- Thornalley, P. J. & Vasak, M. (1985).** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 827(1), 36–44. doi:10.1016/0167-4838(85)90098-6
- Udvardi, M. K., Czechowski, T. & Scheible, W.-R. (2008).** Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell Online*, 20(7), 1736–1737. doi:10.1105/tpc.108.061143
- Updegraff, E. P., Zhao, F. & Preuss, D. (2009).** The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of Arabidopsis pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 22(3), 197–204. doi:10.1007/s00497-009-0104-5
- van Doorn, W. G., Balk, P. A., van Houwelingen, A. M., Hoeberichts, F. A., Hall, R. D., Vorst, O., ... van Wordragen, M. F. (2003).** Gene expression during anthesis and senescence in Iris flowers. *Plant Molecular Biology*, 53(6), 845–63. doi:10.1023/B:PLAN.0000023670.61059.1d
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D. A., Cestaro, A., Pruss, D., ... Viola, R. (2007).** A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS One*, 2(12), e1326. doi:10.1371/journal.pone.0001326
- Venturini, L., Ferrarini, A., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Fasoli, M., Dal Santo, S., ... Delledonne, M. (2013).** De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. Corvina unveils varietal diversity. *BMC Genomics*, 14(1), 41. doi:10.1186/1471-2164-14-41
- Vivier, M. A., Pretorius, I. S. & Pretorius, I. (2002).** Genetically tailored grapevines for the wine industry, 20(11), 472–478.
- Wellmer, F. & Riechmann, J. L. (2010).** Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in Genetics*, 26(12), 519–527. doi:10.1016/j.tig.2010.09.001
- Yuan, M. & Wang, S. (2013).** Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant*, 6(3), 665–674. doi:10.1093/mp/sst035
- Zecca, G., De Mattia, F., Lovicu, G., Labra, M., Sala, F. & Grassi, F. (2010).** Wild grapevine: silvestris, hybrids or cultivars that escaped from vineyards? Molecular evidence in Sardinia. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 12(3), 558–62. doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00226.x
- Zenoni, S., Ferrarini, A., Giacomelli, E., Xumerle, L., Fasoli, M., Malerba, G., ... Delledonne, M. (2010).** Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq. *Plant Physiology*, 152(4), 1787–1795. doi:10.1104/pp.109.149716

- Zhang, F., Liu, X., Zuo, K., Zhang, J., Sun, X. & Tang, K. (2010).** Molecular Cloning and Characterization of a Novel *Gossypium barbadense* L. RAD-Like Gene. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2), 324–333. doi:10.1007/s11105-010-0234-9
- Zhang, Y. & McCormick, S. (2007).** A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18830–5. doi:10.1073/pnas.0705874104
- Zhou, X. & Rokas, A. (2014).** Prevention, diagnosis and treatment of high-throughput sequencing data pathologies. *Molecular Ecology*, 23(7), 1679–700. doi:10.1111/mec.12680
- Zhu, J. (2011).** Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 247–273. doi:10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329.Salt

Curriculum Vitae

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Weiterhin versichere ich, örtlich übernommene Ausführungen anderer Autoren und an Gedankengänge Anderer anlehrende eigene Formulierungen entsprechend gekennzeichnet und die Quelle zitiert zu haben.

(Ort, Datum)

(Birte Ding)