

Aus dem Institut für Obst-, Gemüse- und Weinbau  
Fachgebiet für Weinbau  
der Universität Hohenheim  
Prof. Dr. R. Blaich

# **Untersuchungen zur physikalischen Kartierung des Genoms der Weinrebe**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors  
der Agrarwissenschaften  
vorgelegt der Fakultät III  
- Agrarwissenschaften I -  
(Pflanzenproduktion und Landschaftsökologie)  
der Universität Hohenheim

von  
**Andreas Böhm**  
Diplom-Agraringenieur  
aus  
Stuttgart

2000

Die vorliegende Arbeit wurde am 26. April 2000 von der Fakultät III -Agrarwissenschaften I- der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2000

Dekan: Prof. Dr. M. Kaupenjohann

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. R. Blaich

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. C.U. Hesemann

3. Prüfer: Prof. Dr. G. Weber

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau und Struktur des Genoms der Rebe	1
1.2	Kartierung des Genoms der Weinrebe	1
1.3	Physikalische Kartierung mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese	3
1.3.1	Die Methodik der Pulsfeldgelelektrophorese	3
1.3.2	Präparation hochmolekularer DNA	6
1.3.3	Ablauf der physikalischen Kartierung mit Megarestriktionsfragmenten	6
1.4	Physikalische Kartierung mit genomischen Banken	7
1.5	Zielsetzungen der Arbeit	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>A.</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme und spezielles Labormaterial	12
2.2	PCR-Primer und Primer für die DNA Sequenzierung	12
2.3	Bakterienstämme und Plasmide	14
2.3.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	14
2.3.2	Plasmide	15
<b>B.</b>	<b>Methoden</b>	<b>15</b>
2.4	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	15
2.5	Kultur und Vermehrung von <i>in vitro</i> Pflanzen	15
2.5.1	Versuchspflanzen	15
2.5.2	Kulturmedien und Kulturbedingungen	15
2.5.3	<i>In vitro</i> Kulturnahme von Grünstecklingen	16
2.6	Präparation von DNA	16
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	16
2.6.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	17
2.6.3	Präparation hochmolekularer DNA aus Protoplasten	18
2.6.3.1	Isolierung von Protoplasten aus der Rebe	18
2.6.3.2	Aufreinigung hochmolekularer DNA aus Protoplasten	19
2.7	Auftrennung von DNA in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese	20

2.8	Restriktion von DNA mit Endonukleasen	21
2.8.1	Restriktion von genomischer DNA und Plasmid-DNA in wässriger Lösung	21
2.8.2	Restriktion von hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken mit Megarestriktionsenzymen	21
2.8.3	Partielle Restriktion von hochmolekularer DNA in Agaroseblöckchen	22
2.8.4	Partielle Restriktion von hochmolekularer DNA in wässriger Lösung	22
2.9	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	23
2.9.1	Elektroelution	23
2.9.2	Elution mit dem Qiaex-Purification Kit	24
2.10	PCR mit spezifischen Primern	24
2.11	Klonierung von PCR-Amplifikationsprodukten in <i>E. coli</i>	26
2.11.1	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide	26
2.11.2	Herstellung von transformationskompetenten Bakterienzellen aus <i>E. coli</i>	26
2.11.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.12	DNA-Sequenzierung mit dem Abi Prism 310 Genetic Analyzer	27
2.13	Auswertung der Sequenzdaten	28
2.14	Southern Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG) markierten Sonden	28
2.14.1	DNA Transfer von Agarosegelen auf eine Nylonmembran	28
2.14.2	Herstellung von „colony lifts“ zur Kolonie-Hybridisierung	29
2.14.3	Random primed DIG-Markierung von DNA	30
2.14.4	DIG-Markierung von DNA mit Hilfe der PCR	30
2.14.5	Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden	31
2.14.6	Immunologische Detektion DIG-markierter DNA durch Lumineszenz	32
2.15	Erstellung einer genomischen BAC-Bank	33
2.15.1	Extraktion partiell geschnittener hochmolekularer DNA aus PFGE- Agarosegelen	33
2.15.2	Vorbereitung des BAC-Vektorplasmids pBeloBAC11	34
2.15.3	Ligation hochmolekularer DNA in pBeloBAC11	35
2.15.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen zur BAC-Elektrotransformation	35
2.15.5	BAC-Transformation durch Elektroporation	36
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Auswahl und Anzucht des Pflanzenmaterials	37
3.2	Isolierung von Protoplasten	38
3.3	Präparation hochmolekularer DNA und Auftrennung in einer Pulsfeldgelelektrophorese	41

3.4	<i>In situ</i> Restriktion hochmolekularer DNA in Agaroseblöckchen	42
3.5	Southern-Blotting von Pulsfeldgelen und nichtradioaktive Hybridisierung	49
3.6	Erstellung einer genomischen BAC-Bank für die Rebsorte 'Vidal blanc'	53
3.7	Entwicklung genspezifischer Sonden	58
3.8	Screening der BAC-Bank	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Präparation hochmolekularer DNA aus der Rebe	62
4.2	Restriktion, Pulsfeldgelelektrophorese und Southern Hybridisierung von hochmolekularer DNA	64
4.3	Erstellung einer genomischen BAC-Bank	67
4.4	Entwicklung genspezifischer Sonden und Screening der partiellen BAC-Bank	69
4.5	Anwendung der genomischen BAC-Bank zur physikalischen Kartierung	71
4.6	Perspektiven	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	bacterial artificial chromosomes
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
CHEF	contour clamped homogeneous electric fields
cM	Zentimorgan
CpG	wiederholte Abfolge der Basen Cytosin und Guanin
CPW	Kulturmedium für Protoplasten
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FISH	Fluoreszenzinsituhybridisierung
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
MAC	mammalian artificial chromosomes
Mb	Megabasenpaare
MOPS	3'-Morpholinopropansulfonsäure
OD	optische Dichte
PAC	P1-derived artificial chromosomes
PCR	polymerase chain reaction
PF-Elektrophorese	Pulsfeldgelelektrophorese
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon

RP	Reverse-Primer
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Units (Enzymeinheiten)
UP	Universalprimer
VKM	Kulturmedium für Protoplasten
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
YAC	yeast artificial chromosomes

## 1. Einleitung

### 1.1 Aufbau und Struktur des Genoms der Rebe

Die Untersuchungen über das Genom der Rebe reichen bis in die Anfänge unseres Jahrhunderts zurück (Dorsey, 1914; Christoff 1929; Sax, 1929). Während zu Beginn der Arbeiten die Beobachtung der Rebchromosomen im Vordergrund stand, wird heute eine vollständige Kartierung des Genoms und die Entschlüsselung der genetischen Information angestrebt. Die Anzahl der Chromosomen wurde für *Vitis vinifera* mit  $n = 19$  schon sehr früh bestimmt (Kobel, 1929; Negrul, 1930; Olmo, 1937). Die geringe Größe der Rebchromosomen erschwerte jedoch ihre eindeutige Identifikation und Differenzierung (Olmo, 1937). Auf der Grundlage der Arbeiten von Patil et al. (1985) und Patil et al. (1992) wurde eine ausführliche Charakterisierung der Rebchromosomen mit Hilfe moderner Lichtmikroskopie und digitaler Bildbearbeitung von Haas et al. (1994) und Haas (1996) vorgestellt. Zur gleichen Zeit erfolgte die erste Publikation über die Struktur und den DNA-Gehalt des Genoms der Rebe (Lodhi und Reisch, 1995). Danach besitzt die Rebe eine Genomgröße von 475 Mb/1C. Der Wert entspricht der Genomgröße von Reis (Arumuganathan und Earle, 1991) und ist etwa dreimal so groß wie das Genom von *Arabidopsis thaliana* (Schmidt, 1998). Der Anteil an kodierenden Sequenzen beträgt 3,8 %, die übrige DNA besteht hauptsächlich aus repetitiver und nichtkodierender DNA (Lodhi und Reisch, 1995). Außerdem enthält das Genom eine bisher noch unbekannte Anzahl an Retrotransposons, von denen zwei unterschiedliche Typen mit hoher Kopienzahl identifiziert werden konnten (Böhm, 1995; Böhm und Zyprian, 1998). Ein ähnliches Verhältnis von kodierenden und nichtkodierenden Sequenzen ist auch von anderen Pflanzen bekannt (Flavell, 1980; Narayan, 1991). Ein hoher Anteil an nichtkodierenden Sequenzen ist oftmals ein Hinweis auf relativ weite physikalische Abstände zwischen einzelnen Genen (Flavell, 1993b). Aufgrund der Ergebnisse von Kartierungsstudien kann bei der Rebe von einem Verhältnis zwischen genetischem und physikalischem Abstand von 300 Kb/cM ausgegangen werden (Lodhi und Reisch, 1995; Flavell, 1993a).

### 1.2 Kartierung des Genoms der Weinrebe

Die Existenz einer physikalischen Karte ist eine wichtige Grundlage zum besseren Verständnis vom Aufbau und der Struktur des Genoms der Weinrebe und zur Isolierung von züchterisch relevanten Genen. Während bei genetischen Kartierungsstudien die Differenzierung von eng gekoppelten Markern schwierig ist, bietet die physikalische

Kartierung die Möglichkeit, sowohl eine Feinkartierung als auch eine Kartierung von größeren Abschnitten im Genom durchzuführen (Poustka, 1990). Die physikalische Kartierung ist nicht von genetischen Polymorphismen in einer segregierenden Population abhängig und somit kann für sie ein breites Spektrum an unterschiedlichen Techniken eingesetzt werden (Poustka, 1990). Für eine erfolgreiche Genomkartierung ist jedoch die Kombination von genetischer und physikalischer Kartierung und die Kenntnis von genetischen und physikalischen Abständen der molekularen Marker oder der Gene erforderlich (Wu et al., 1992; Zhang und Wing, 1997).

Für die Rebe stehen bisher nur wenige vollständige genetische Karten zur Verfügung (Lodhi et al., 1995; Walker et al., 1998). Von Bedeutung sind dabei solche Karten, bei denen molekulare Marker für züchterisch relevante Werteeigenschaften wie Beerenfarbe oder Widerstandsfähigkeit gegen den Echten und Falschen Mehltau der Rebe identifiziert werden konnten (Zyprian, 1998). Über die dafür verantwortlichen Gene liegen allerdings nur sehr lückenhafte Kenntnisse vor. Da es sich bei der Eigenschaft „Resistenz“ häufig um ein quantitatives Merkmal handelt (Serquen et al., 1997; Humphreys et al., 1998), sind an der Ausprägung des Merkmals mehrere Gene oder Genfamilien beteiligt. Mit Hilfe der physikalischen Kartierung konnten bei einer Reihe wichtiger Kulturpflanzen Gene für Pilzresistenz, Nematodenresistenz und Virusresistenz identifiziert und charakterisiert werden (**Soja** : Kanazin et al., 1996; Marek und Shoemaker, 1997; Danesh et al., 1998; **Reis** : Kilian et al., 1997; Rajyashiri et al., 1998; **Kartoffel** : Leister et al., 1997). Eine physikalische Karte für das Genom der Weinrebe soll auch bei *Vitis* die Voraussetzung dafür schaffen.

Bei der Erstellung einer physikalischen Karte können zwei Strategien unterschieden werden: die „top-down“ und die „bottom-up“ Strategie. Beide Methoden erfordern die Verfügbarkeit von hochmolekularer DNA und den Einsatz der Pulsfeldgelelektrophorese zur Größenfraktionierung der DNA.

Bei der „top-down“ Strategie wird die DNA mit selten schneidenden Restriktionsenzymen („rarecutter“ oder „megacutter“) in sehr große Fragmente mit mehreren 100 Kb Länge geschnitten (Megarestriktionsfragmente), die anschließend ihrer Größe nach aufgetrennt und als Restriktionskarte dargestellt werden (siehe 1.3.3). Dazu gehören beispielsweise physikalische Karten, die aus Megarestriktionsfragmenten mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese hergestellt wurden (Smith et al., 1987; Cheung und Gale, 1990; Poustka, 1990; Link und Olson, 1991; Siedler und Graner, 1991; Wu und Tanksley, 1993; McClelland et al., 1998).

Eine physikalische Karte, die nach der „bottom-up“ Strategie hergestellt wurde, setzt sich aus einer Vielzahl an kleineren, in einen Vektor klonierten Restriktionsfragmenten zusammen, aus denen, ähnlich einem Puzzle, das Genom rekonstruiert werden kann. Die aus überlappenden Klonen zusammengesetzten DNA-Abschnitte werden als Contigs („contiguous DNA blocks“) bezeichnet. Solche physikalische Karten können aus genomischen Banken mit YAC-Klonen („yeast artificial chromosomes“) (Burke et al, 1987) oder BAC-Klonen („bacterial artificial chromosomes“) (Shizuya et al, 1992) erstellt werden. Techniken, die sich noch in der Entwicklungsphase befinden, sind PAC-Klone („P1-derived artificial chromosomes“) (Ioannou et al., 1994) und MAC-Klone („mammalian artificial chromosomes“) (Monaco und Larin, 1994).

Restriktionskarten nach der „top-down“ Strategie decken weite Teile des Genoms lückenlos ab. Sie haben allerdings wegen ihrer Fragmentgröße eine geringere Auflösung als Karten aus Contigs und ihre Eignung zur Isolierung von Genen ist begrenzt. Bei Contig-Karten kann jedes Fragment als Klon individuell charakterisiert und sequenziert werden. Die Identifikation von einzelnen Genen ist daher einfacher. Der von der Karte abgedeckte Bereich ist jedoch oftmals lückenhaft, da nicht alle Bereiche der genomischen DNA zur Klonierung gleich gut geeignet sind (National Agricultural Library, USA, 1999).

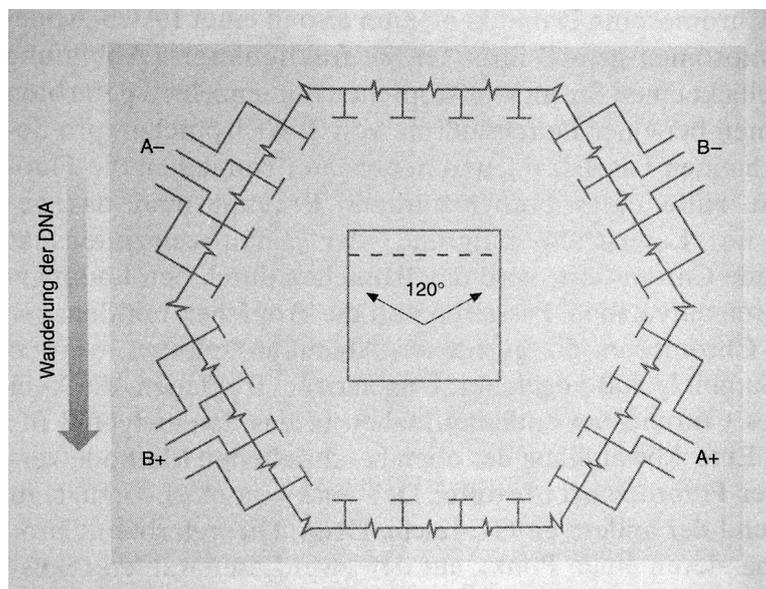
Die hier vorgestellten Methoden zur physikalischen Kartierung sollen einen kurzen Überblick über die zur Zeit eingesetzten Techniken geben. Die routinemäßige Präparation und Aufreinigung von hochmolekularer DNA ist gerade bei Pflanzen mit ihrer widerstandsfähigen Zellwand eine entscheidende Hürde, die es zu überwinden gilt. Nach der Entwicklung von Techniken zur Auftrennung und Klonierung sehr großer DNA-Moleküle steht ein leistungsfähiges System zur Erstellung von genomischen Banken zur Verfügung. Obwohl die Methode zur Herstellung von „bacterial artificial chromosomes“ noch relativ jung ist, hat sie innerhalb kurzer Zeit eine breite Anwendung gefunden (Cai et al., 1995; Lapitan et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Yang et al., 1997; Schmidt, 1998; Mozo et al., 1998; Vinatzer et al., 1998; Vanhouten et al., 1999).

### **1.3 Physikalische Kartierung mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese**

#### **1.3.1 Die Methodik der Pulsfeldgelelektrophorese**

Die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese, die von Schwarz und Cantor entwickelt (Schwarz und Cantor, 1984) und seitdem ständig verbessert wurde (Carle et al., 1986; Chu et al., 1986), ermöglicht die Auftrennung von großen DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von

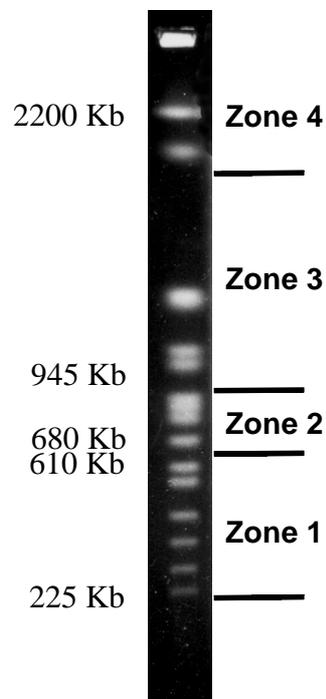
10 Mb (Fan et al., 1988). Die heute am weitesten verbreitete Technik ist die CHEF-Elektrophorese (**c**ontour clamped **h**omogeneous **e**lectric **f**ields) (Chu et al., 1986). Bei diesem System sind die Elektroden in der Form eines Sechsecks um das Agarosegel fixiert. Die Spuren laufen linear und sind über das ganze Gel miteinander vergleichbar. Die elektrischen Felder sind wechselseitig in einem bestimmten Winkel zueinander angeordnet. Je nach Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird ein Feldwinkel zwischen  $90^\circ$  für sehr große DNA Stücke und  $120^\circ$  für kleinere Fragmente gewählt. Durch diese Anordnung wird im Innern des Polygons ein homogenes elektrisches Feld erzeugt. Dies ist die Voraussetzung dafür, daß bei der Elektrophorese alle Proben im Agarosegel die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit und Laufrichtung besitzen (Chu et al., 1986). Eine schematische Darstellung der CHEF-Pulsfeldgelelektrophorese ist in Abbildung 1 dargestellt. Wird ein elektrisches Feld A nach B umgepolt, muß sich die DNA im Agarosegel umorientieren und an die veränderte Feldrichtung anpassen. Für diese Umorientierung benötigen große DNA-Fragmente mehr Zeit als kleine Fragmente und wandern dementsprechend im Gel in einem festgelegten Zeitabschnitt eine kürzere Strecke (Lognonne, 1993).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung einer CHEF-Pulsfeld Gelelektrophorese (nach Primrose, 1998)

Während in einer konventionellen Agarosegelelektrophorese DNA bis maximal 20 Kb fraktioniert werden kann (Smith und Cantor, 1987), stellt in der Pulsfeldgelelektrophorese das rhythmisch wechselnde Spannungsfeld einen zusätzlichen Parameter dar, der die Auftrennung von DNA über 50 Kb ermöglicht. Je nach Fragmentgröße, die fraktioniert werden soll, muß ein unterschiedlich langes Pulsintervall von wenigen Sekunden für kleine Fragmente bis zu mehreren Minuten für sehr große DNA-Fragmente gewählt werden. Die Auflösung ist optimal, wenn das Pulsintervall mit der zur Umorientierung benötigten Zeit übereinstimmt (Dunham et al, 1987).

Ein Pulsfeldgel läßt sich in vier Bereiche gliedern: der erste Bereich im untersten Teil des Geles besitzt ein sehr gutes Auftrennvermögen. Die Laufstrecke der DNA-Moleküle besitzt dort eine lineare Beziehung zu ihrem Molekulargewicht. Darüber befindet sich der sehr kleine zweite Bereich mit einem reduzierten Auflösungsvermögen. Der sich anschließende dritte Bereich entspricht wieder den im ersten Bereich beschriebenen Bedingungen. In obersten Teil des Geles befindet sich der vierte Bereich mit nur sehr geringem Auflösungsvermögen (Vollrath und Davis 1987). Die Ursachen für diese unterschiedliche Zonierung im Gel sind noch immer unbekannt.



**Abb. 2:** Auftrennung von chromosomaler DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* in einer Pulsfeldgelelektrophorese. Die Zonengrenzen im Agarosegel sind durch schwarze Balken markiert (Abbildung in Anlehnung an Vollrath und Davis 1987).

### **1.3.2 Präparation hochmolekularer DNA**

Zur Herstellung von Megarestriktionsfragmenten ist die Präparation ungescherter, hochmolekularer DNA notwendig. Das Problem bei einer solchen Präparation ist die enorme Größe der intakten DNA-Moleküle. Bei der Genomgröße und dem Chromosomensatz der Rebe ist je Chromosom mit einer durchschnittlichen DNA-Länge von 20-25 Mb zu rechnen. Mit herkömmlichen DNA-Präparationstechniken ist die Isolierung intakter chromosomaler DNA nicht möglich (Smith und Cantor, 1987). Die widerstandsfähige Zellwand der Pflanzenzelle stellt dabei ein besonderes Problem dar. Hochmolekulare DNA zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNasen. Daher müssen Vorkehrungen getroffen werden, um eine unnötige Kontamination mit DNasen zu vermeiden und vorhandene DNasen durch EDTA zu inaktivieren. Eine Fragmentierung der DNA durch Scherkräfte ist unbedingt zu vermeiden. Diese Gefahr ist besonders groß bei Pipettierschritten und Alkoholpräzipitation in wässriger Lösung. Um die Gefahrenpotentiale zu minimieren, erfolgt die Präparation hochmolekularer DNA in einer Agarosematrix. Bevor die Zelle jedoch in Agarose eingebettet werden kann, muß die Zellwand entfernt werden (Zhang et al., 1995). Bei Pflanzen wird daher üblicherweise von Protoplasten ausgegangen (Wu und Tanksley, 1993; van Daelen et al., 1989; Cheung und Gale, 1990; Lahaye et al., 1996; Siedler und Graner, 1991), die in Agarose eingebettet und bei einer hohen EDTA-Konzentration lysiert werden. Die Restriktion der eingebetteten hochmolekularen DNA mit Megarestriktionsenzymen erfolgt ebenfalls in der Agarosematrix.

### **1.3.3 Ablauf der physikalischen Kartierung mit Megarestriktionsfragmenten („top-down“ Strategie)**

Der Erfolg einer Kartierung hängt im wesentlichen von der Wahl der Restriktionsenzyme und der Fragmentgröße ab (Maule, 1997). Gut geeignet sind Enzyme, die eine CpG Erkennungssequenz besitzen und methylierungssensitiv sind. Eine solche Nukleotidabfolge tritt besonders häufig in den regulativen 5'-Bereichen von codierenden Sequenzabschnitten auf (Maule, 1997; Poustka, 1990). Bei den verstreut im Genom vorkommenden CpG-Erkennungssequenzen ist häufig eine starke Methylierung festzustellen, die bei den geklusterten CpG-Dinukleotiden im Promotorbereich fehlt. Megarestriktionsenzyme, die methylierungssensitiv sind, schneiden daher bevorzugt in den 5'-Bereichen von Genen und produzieren umso größere Restriktionsfragmente, je länger ihre Erkennungssequenz ist (Maule, 1997). Die erhaltenen Fragmente werden anschließend in der

Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt und durch einen Southern Blot auf eine Membran transferiert.

Die Identifikation einer physikalischen Beziehung der Restriktionsfragmente untereinander geschieht über „jumping clones“ und „linking clones“ (Poustka und Lehrach, 1986; Poustka, 1990). Werden diese Klone als Sonde bei der Hybridisierung eingesetzt, können jeweils benachbarte Fragmente identifiziert und in einer Restriktionskarte angeordnet werden (Collins, 1988).

Bisher wurden mit dieser Methode sowohl die Genome von Mikroorganismen und Pilzen (Smith et al., 1987; Fan et al., 1988; Link und Olson, 1991; Syring, 1997) als auch die Genome von Pflanzen (Devos und Vercruysse-Dewitte, 1989; Ganai und Tanksley, 1989; van Daelen et al., 1989; Cheung und Gale, 1990; Lahaye et al., 1996) und das menschliche Genom (Burmeister et al., 1988) kartiert.

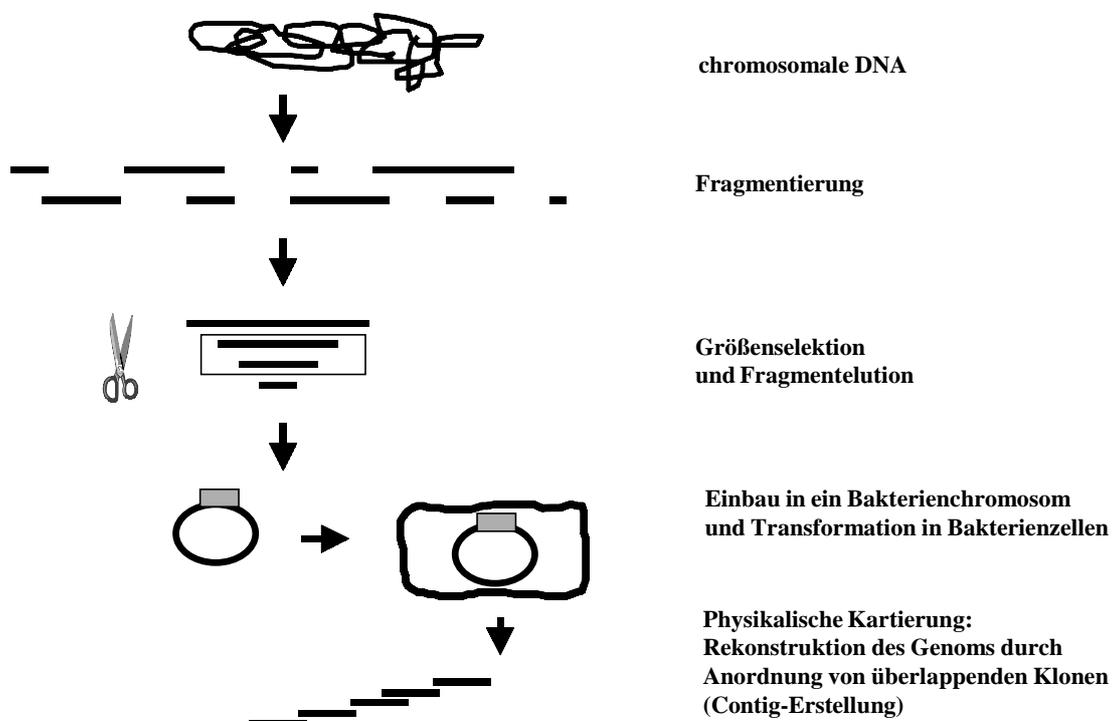
Die eigentliche Kartierung beginnt mit der Hybridisierung von Sonden an die Restriktionsfragmente. Als Sonde können sowohl molekulare Marker aus der genetischen Kartierung als auch „single copy“-Sequenzen aus genomischen oder cDNA Banken verwendet werden (Ho und Monaco, 1995). Um eine aussagekräftige Restriktionskarte zu erhalten, ist es notwendig, eine physikalische Beziehung zwischen benachbarten Markern herzustellen. Das erfordert eine mehrmalige Hybridisierung des selben Blotts mit mehreren unterschiedlichen Sonden. Hybridisieren zwei Sonden mit ein und demselben Restriktionsfragment auch bei der Verwendung von unterschiedlichen Restriktionsenzymen, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Kopplung der beiden Sequenzen geschlossen werden.

#### **1.4 Physikalische Kartierung mit genomischen Banken („bottom-up“ Strategie)**

Für die Erstellung einer physikalischen Genomkarte wird heute vorwiegend der Weg über eine genomische Bank aus BAC oder YAC-Klonen eingeschlagen (Cai et al., 1995; Leister et al., 1997; Yang et al., 1997; Mozo et al., 1998; Mullen et al., 1998; Rajyashiri, et al., 1998; Schmidt, 1998). Abbildung 3 zeigt den schematischen Ablauf zur Erstellung einer BAC-Bank und der Anordnung der Klone zu Contigs für die physikalische Kartierung.

Das Grundprinzip ist bei der Erstellung von BAC- oder YAC-Banken ähnlich. Nach der Präparation hochmolekularer DNA wird diese mit Restriktionsenzymen fragmentiert. Da die Herstellung von genomischen Banken sehr große Restriktionsprodukte erfordert, erfolgt nur eine unvollständige Restriktion der DNA. Die geschnittene DNA wird in einer Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente mit der erforderlichen Größe zur

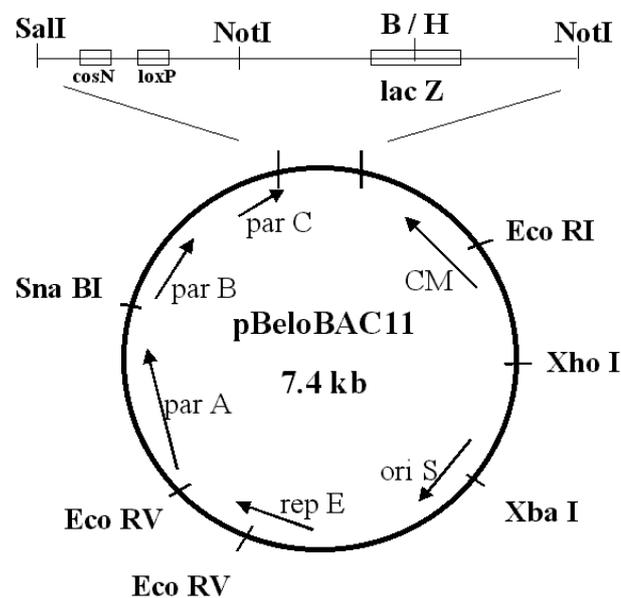
Ligation in einen Vektor aus dem Gel aufgereinigt (Burke et al., 1987; Shizuya et al., 1992; Frijters et al., 1997; Hamilton, 1997; Mozo et al., 1998). Das erforderliche Größenspektrum der Fragmente hängt davon ab, ob eine YAC-Bank oder eine BAC-Bank hergestellt werden soll. Während in einen YAC-Vektor bis zu 1 Mb große DNA-Stücke kloniert werden können, ist die Fragmentgröße bei BAC-Vektoren auf 300-350 Kb begrenzt (Frijters et al., 1997). Die rekombinanten Vektoren werden in Bakterien- oder Hefezellen transformiert und als Einzelklone bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Das Verfahren hat gegenüber der Verwendung von Megarestriktionsfragmenten den Vorteil, daß jedes einzelne DNA-Fragment separat identifiziert und analysiert werden kann.



**Abb. 3:** Schematischer Ablauf der Erstellung einer genomischen Bank mit „bacterial artificial chromosomes“ und die Anordnung der Klone zu Contigs für die physikalische Kartierung.

Für die in der vorliegenden Arbeit erstellte BAC-Bank wurde der Vektor pBeloBAC11 (Kim et al., 1996) verwendet. Das Plasmid liegt als „single copy“ in der Bakterienzelle vor und besitzt vier Regionen, die für die Funktionsweise und die Stabilität verantwortlich sind. *ParA*, *ParB* und *ParC* vom F-Faktor aus *E. coli* sind für die Stabilität und

die richtige Verteilung des Plasmids auf die Tochterzellen während der Zellteilung verantwortlich. Durch diese Sequenzen wird verhindert, daß zwei unterschiedliche BAC-Klone in einer einzelnen Zelle vermehrt werden (Willems and Skurray, 1987) was letztendlich zu einem instabilen Klon führen würde. *OriS* ist der Startpunkt für die DNA-Replikation und *RepE* kodiert ein Protein, das zusätzlich für die Regulation der Replikation und der Kopienzahl des Plasmids verantwortlich ist. Als Markergene stehen eine Chloramphenicol-Resistenz zur Verfügung sowie das *LacZ*-Gen, das die Identifikation von rekombinanten Plasmiden durch ein „blue-white-screening“ vereinfacht. Eine schematische Darstellung des Plasmids zeigt Abbildung 4.



**Abb. 4:** Der BAC-Vektor pBeloBAC11 (nach Kim et al., 1996)

Die Anzahl der für eine repräsentative Bank benötigten Klone hängt von drei Faktoren ab: der durchschnittlichen Insertgröße der Klone, der Genomgröße und der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Einzelgen in der genomischen Bank vorkommen soll.

Der mathematische Zusammenhang ergibt sich nach Clarke und Carbon (1976) aus der Formel:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln\left(1 - \left(\frac{f}{G}\right)\right)}$$

mit:  $N$  = Anzahl der Einzelklone

$P$  = Wahrscheinlichkeit, daß eine beliebige Einzelsequenz in der Bibliothek vorliegt

$f$  = durchschnittliche Kloninsertgröße

$G$  = Genomgröße

In Bezug auf das Genom der Weinrebe (Lodhi und Reisch, 1995) ist dabei in Abhängigkeit der durchschnittlichen Insertgröße [ $f$ ] und der gewählten Wahrscheinlichkeit [ $P$ ] von den in Tabelle 1 dargestellten Klonenzahlen auszugehen (Werte auf 100 gerundet):

	$f = 40\ 000$	$f = 50\ 000$	$f = 80\ 000$	$f = 100\ 000$
$P = 95\ %$	35 500	28 500	17 800	14 200
$P = 99\ %$	54 700	43 800	27 500	21 900

**Tab. 1:** Übersicht über die Anzahl der benötigten BAC-Klone für eine repräsentative genomische Bibliothek der Rebe bei einer durchschnittlichen Insertgröße  $f$  zwischen 40000 bp und 100000 bp und einer Zufallswahrscheinlichkeit  $P$  von 95 % und 99 %.

BAC-Banken haben einige grundlegende Vorteile gegenüber YAC-Banken. Häufig bei der Erstellung einer YAC-Bank auftretende Schwierigkeiten wie z.B. eine niedrige Transformationsrate (Bellis et al., 1991; Wada et al., 1990), instabile Klone (Neil et al., 1990; Dunford et al., 1993; Schmidt et al., 1994), Bildung von chimären Klonen (Green et al., 1991; Libert et al., 1993; Schmidt et al., 1994) sind bei BAC-Banken nur sehr selten zu beobachten (Frijters et al., 1997). Die Transformationsrate rekombinanter BACs in *E. coli* ist um den

Faktor 100 höher als bei der Transformation von YACs in Hefezellen (Shizuya et al., 1992; Woo et al., 1994; Wang et al., 1995). Hinzu kommt, daß das Wachstum von transformierten *E. coli*-Zellen auf künstlichem Nährmedium nur 1/5 der Zeit beansprucht wie das von Hefezellen. Für die Isolierung rekombinanter Plasmide aus *E. coli* können allgemein gebräuchliche und standardisierte Präparationstechniken z.B die alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) eingesetzt werden. Wird allerdings eine genomische Bank mit sehr großen Inserts benötigt, muß auch weiterhin auf YAC-Klone zurückgegriffen werden (Frijters et al., 1997).

Ein interessanter Aspekt ist die Verwendung von Klonierungsvektoren, die zusätzlich auch zur Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt werden können (Hamilton, 1997). Solche Plasmide wurden bereits erfolgreich an Tabak und Tomate getestet (Hamilton et al., 1996). Die Vektoren vereinen die Eigenschaften eines BAC-Vektors mit denen eines zur *Agrobacterium*-Transformation geeigneten Vektors und werden sowohl in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* repliziert. Damit konnte zum ersten Mal hochmolekulare DNA direkt in ein pflanzliches Genom transformiert werden. Die Wissenschaft erhofft sich dadurch einen Fortschritt auf dem Weg zur Identifikation von bisher unbekanntem Genen und einen erheblichen Zeitgewinn bei der Herstellung von transgenen Pflanzen (Hamilton et al., 1996; Foster und Twell, 1997).

### 1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe, die Grundlage für eine physikalische Kartierung des Genoms der Weinrebe zu schaffen.

Ausgehend von Protoplasten, sollte eine Methode zur Präparation und Restriktion hochmolekularer DNA aus der Rebe entwickelt und die Technik der Pulsfeldgelelektrophorese in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

Neben der Kartierung von Megarestriktionsfragmenten stand die Erstellung und Analyse einer genomischen BAC-Bank zur physikalischen Kartierung sowie zur Identifikation und Isolierung von Gensequenzen aus dem Genom der Rebe im Vordergrund.

Zur Vervollständigung der Arbeiten sollten im Rahmen des Projektes mit Hilfe verschiedener PCR-Techniken genspezifische Sonden zum Screening der BAC-Bank entwickelt werden. Von besonderem Interesse waren solche Gene der Rebe, deren Produkte mit Resistenzeigenschaften oder Widerstandsfähigkeit gegen Stressfaktoren in Verbindung gebracht werden können.

## 2. Material und Methoden

### A. Material

#### 2.1 Chemikalien, Enzyme und spezielles Labormaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und sonstige Hilfsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Chemikalien:

BASF (Ludwigshafen), Biomol (Hamburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)

Enzyme:

Boehringer Mannheim (Mannheim), Calbiochem (CA, USA), Gibco-BRL (Eggenstein), New Englands Biolabs (Schwalbach), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)

spezielles Labormaterial:

Amersham-Buchler (Braunschweig), Bio-Rad (CA, USA), Boehringer Mannheim (Mannheim), Calbiochem (CA, USA), Gibco-BRL (Eggenstein), Kleinfeld (Hannover), Machery & Nagel (Düren), Millipore (Eschborn), Perkin-Elmer (CA, USA), Qiagen (Hilden) Sigma (Deisenhofen)

#### 2.2 PCR-Primer und Primer für die DNA-Sequenzierung

Die für die Methoden der direkten PCR und der „Cycle Sequencing“-Reaktion verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert, entschützt, entsalzt und lyophilisiert geliefert. Die DNA Sequenzen dieser Primer sind im folgenden aufgeführt:

Universalprimer für die „Cycle Sequencing“-Reaktion und zur DIG Markierung von Sonden:

UP -32: 5'-AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'

RP -37: 5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAC AGC-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Alkoholdehydrogenase der Rebe (Accession U36586) und einer angehängten *Bam*HI (Alkdehyd 1) bzw. *Hind*III (Alkdehyd 2) Schnittstelle:

Alkdehyd 1: 5'-GGA TCC TGA AGC AGG AGG GTA TGT GA-3'

Alkdehyd 2: 5'-AAG CTT GGC ATT GAC ATT TCC AGT GC-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase der Rebe (Accession X75968):

UFGT 1: 5'-CGT TTA TAT GGT CCT AAG GG-3'

UFGT 2: 5'-TCA TTG CAT CCA AAC AGG TG-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Phenylalanin-Ammonium-Lyase der Rebe (Accession X75967):

PAL 1: 5'-AGA AGC CGA AGC AAG ATC GA-3'

PAL 2: 5'-TCG TTC AGG AAG AGC GTC TT-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil eines „Osmotin-like protein“ der Rebe (Accession Y10992):

OS 1: 5'-CAG CCA CCT TCA ACA TCC AA-3'

OS 2: 5'-CTG ATC GTC CTT AGG GTA GC-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Glutaminsynthetase der Rebe (Accession X94320):

Glutsynth 1: 5'-CCA CTG AGA AGG TGA ATT GTA-3'

Glutsynth 2: 5'-GAG ATG GGT GTG TCT TAT GGC T-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Glutamatdehydrogenase der Rebe (Accession X86924):

Gludehyd 1: 5'-GGA GAA GAG TCT TCT GAT AC-3'

Gludehyd 2: 5'-TAC CAC CTC TCT CAC CGA TG-3'

Sequenzspezifische Primer für eine Chitinase (Typ I) der Rebe (Accession Z54234) mit einer angehängten Kozak-Sequenz und einer *Nco* I Schnittstelle (Chitinase 1) bzw. einer *Xba* I Schnittstelle (Chitinase 2):

Chitinase 1: 5'-ACC ATG GGG TTG TGG GCA TTG GTA-3'

Chitinase 2: 5'-TCT AGA TTA GAT GGT GTC CAG CAG GA-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Chitinase (Typ I) der Rebe (Accession Z54234):

Chitin 1: 5'-GTT TGG TTG GTG TGG CAA CA-3'

Chitin 2: 5'-ATT ATG GCA GGA AGG CTT GG-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Glukanase der Rebe (Accession U68144):

Gluc 1: 5'-TAC ATC CCG GTT GGA AAC GA-3'

Gluc 2: 5'-CAT CCG CTT TCT GAA ACC AC-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Chalkonisomerase der Rebe (Accession X75963):

Chaliso 1: 5'-TCA GGT CGA GAA CGT CCT AT-3'

Chaliso 2: 5'-TTT CTC ATC CCC AGC CTC CT-3'

Sequenzspezifische Primer für den Teil einer Chalkonsynthase der Rebe (Accession X75969):

Chalsyn 1: 5'-TCA CCA ACA GTG AGC ACA TG-3'

Chalsyn 2: 5'-GCA AGT GTC CGT CGA TTG CT-3'

## 2.3 Bakterienstämme und Plasmide

### 2.3.1 *Escherichia coli*-Stämme

*E. coli* DH 5 $\alpha$

Hanahan; (1983)

*E. coli* DH 10 B

Grant et al.; (1990)

*E. coli* XL 1-Blue

Bullock et al.; (1987)

### 2.3.2 Plasmide

pBluescript SK(-)

Short et al.; (1988)

pBeloBAC11

Kim et al.; (1996)

## B. Methoden

### 2.4 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung der Laborstämme und Rekombinanten von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; nach Ausubel et al.; 1987). Zur Herstellung von Agarnährböden wurde zusätzlich 16 g/l Bacto-Agar zugegeben. Das Medium wurde autoklaviert, hitzeempfindliche Substanzen wurden erst nach Abkühlen des Mediums auf 40-50 °C sterilfiltriert zugegeben. Das Flüssigmedium wurde in sterilen Glasflaschen bei Raumtemperatur gelagert, das Agarmedium für Kulturnährböden wurde in sterile Plastik-Petrischalen gegossen, in Folie verpackt und bei 4 °C bis zu max. 3 Wochen gelagert. Das Wachstum der Bakterien auf den entsprechenden Nährböden erfolgte bei 37 °C.

### 2.5 Kultur und Vermehrung von *in vitro* Pflanzen

#### 2.5.1 Versuchspflanzen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden als Ausgangsmaterial zur Isolierung hochmolekularer DNA *in vitro* Pflanzen der pilzresistenten Sorten 'Regent' und 'Vidal blanc' sowie der anfälligen Sorten, 'Seyval blanc', 'Lemberger' und 'Riesling', verwendet. 'Regent' und 'Lemberger' stammen aus dem Sortiment des Instituts für Rebenzüchtung und wurden als Grünstecklinge in *in vitro* Kultur überführt, die Sorten 'Riesling', 'Seyval blanc' und 'Vidal blanc' stellte das Institut für Weinbau der Universität Hohenheim als *in vitro* Pflanzen zur Verfügung.

#### 2.5.2 Kulturmedien und Kulturbedingungen

Die Sorten 'Riesling', 'Seyval blanc' und 'Vidal blanc' wurden auf hormonfreiem LS-Medium (Linsmaier und Skoog, 1965) kultiviert, für 'Regent' und 'Lemberger' wurde hormonfreies MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit ½-facher Konzentration an Makroelementen verwendet. Nach dem Einwiegen und vollständigen Lösen der Substanzen

wurde der pH-Wert mit verdünnter KOH bzw. HCl auf 5,8 eingestellt, das Medium 1-2 cm hoch in 1l Weckgläser gegossen und autoklaviert. Die Standardkulturbedingungen waren 26 °C bei 10000 lux und einer Photoperiode von 16 h.

### **2.5.3 *In vitro* Kulturnahme von Grünstecklingen**

Zur Erstellung von pflanzlichen *in vitro* Kulturen der Rebe wurden junge Triebe von Gewächshaus- und Freilandpflanzen als Ausgangsmaterial verwendet. Nach dem Entfernen von Ranken und Blättern wurden die Grünstecklinge mit 70 %igem Methanol abgerieben und 30 min. unter rühren in NaOCl (ca. 12 % aktives Cl) mit 2 Tropfen Tween 20 desinfiziert. Die Stecklinge wurden anschließend dreimal gründlich mit sterilem bidest H<sub>2</sub>O. gewaschen, an den Enden steril nachgeschnitten und in 1l Weck-Gläser auf LS-Medium bei Standardbedingungen kultiviert. Nach etwa 8 Wochen wurden die neu gewachsenen Triebe in Einaugenstecklinge zerteilt und auf dem für die Rebsorte optimalen Medium weiterkultiviert.

## **2.6 Präparation von DNA**

### **2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Mini-Plasmidpräparation erfolgte in einer modifizierten Form nach Birnboim und Doly (1979).

- 1,5 ml einer Bakterienübernachtskultur (Sambrook et al., 1989) in ein steriles Eppendorfröhrchen geben und 2 min. in einer Tischzentrifuge bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM EDTA; 4 mg /ml Lysozym) resuspendieren und 5 min. bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Zusatz von 200 µl Lösung 2 (0,1 N NaOH; 1 % (w/v) SDS), vorsichtig mischen und 5 min. auf Eis inkubieren.
- Zusatz von 150 µl eisgekühlter Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 4,8) vorsichtig mischen und 5 min. auf Eis inkubieren.
- 10 min. in Tischzentrifuge bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorfgefäß überführen.

- 10 µl RNase-Stammlösung (10 mg/ml, DNase-frei) zugeben, 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben, kräftig mischen, zur Phasentrennung 10 min. in Tischzentrifuge bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren.
- Oberphase in frisches Eppendorfgefäß überführen, 2,5 Volumen eiskaltes absolutes Ethanol zugeben und 10 min. auf Eis stellen.
- 10 min. zentrifugieren in einer Tischzentrifuge bei Höchstgeschwindigkeit, Pellet in 70 %igem Ethanol waschen und trocknen lassen. Die DNA in 50 µl 1x TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA) lösen, 2 µl davon auf 1 %igem Agarosegel analysieren.

Eine derart präparierte Plasmid-DNA war für Restriktionsanalysen geeignet. Zur Sequenzierung wurden die Plasmide mit dem High Pure Plasmid Preparation-Kit (Boehringer Mannheim) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

Präparationen von „low-copy“-Plasmiden zur BAC-Klonierung (siehe 2.15.2) wurden aus 4 l Übernachtskulturen mit entsprechenden Qiagen-tip500 Säulen (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.6.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial**

Die Präparation genomischer DNA aus Blättern der Rebe erfolgte in Anlehnung an Thomas et al. (1993). Die Angaben beziehen sich auf 2 g Blattmaterial.

- Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsern und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Probe mit 25 ml Puffer A (250 mM NaCl; 200 mM Tris-Cl pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,1 % (w/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2,5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP) 40000) gründlich mischen (Vortex), anschließend bei 4 °C und 7500 rpm (Sorvall SS34) 10 min. zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, das Pellet mit den darin enthaltenen „Rohkernen“ in 5 ml Puffer B (500 mM NaCl; 200 mM Tris-Cl pH 8,0; 50 mM EDTA; 2,5 % (w/v) PVP 40000; 3 % (w/v) Sarkosyl; 20 % (v/v) absolutes Ethanol) vollständig resuspendieren und bei gelegentlichem Schwenken 30 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubieren.

- Gleiches Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zugeben und kurz aber kräftig mischen (Vortex).
- Zur Phasentrennung 10 min. bei 4 °C und 14500 rpm zentrifugieren, wässrige Oberphase anschließend mit weithalsiger Plastikpipette in frisches Zentrifugenröhrchen überführen.
- 0,5-faches Volumen eiskaltes Isopropanol zugeben, mischen und 10 min. auf Eis inkubieren.
- Die präzipitierte DNA 10 min. bei 4 °C und 14500 rpm pelletieren, Überstand dekantieren und Pellet trocknen lassen.
- Pellet in 600 µl 1x TE lösen, 3 µl RNase-Stammlösung (10 mg/ml, DNase-frei) zugeben und 15 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Lösung in ein Eppendorfgefäß transferieren, 0,5 Vol. 7,5 M eiskaltes Ammoniumacetat pH 8,0 zugeben und ausgefallene Proteine durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei Höchstgeschwindigkeit pelletieren.
- Überstand vorsichtig in frisches Eppendorfgefäß überführen, 0,5 Vol. eiskaltes Isopropanol zugeben und 30 min. auf Eis inkubieren.
- Präzipitierte DNA durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei Höchstgeschwindigkeit pelletieren und in 70 %igem Ethanol waschen.
- Pellet trocknen lassen und in 200 µl 1x TE lösen und bei 4 °C aufbewahren. 1 µl auf 0,8 %igem Agarosegel analysieren.

### **2.6.3 Präparation hochmolekularer DNA aus Protoplasten**

#### **2.6.3.1 Isolierung von Protoplasten aus der Rebe**

Die Isolierung von Protoplasten der Rebe erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Reustle (1989). Die Angaben beziehen sich auf 2,5 g Blattmaterial.

- Das verwendete Pflanzenmaterial zum Abbau von Assimilaten 48 h vor der Isolierung der Protoplasten in Dunkelheit kultivieren.
- Blätter entnehmen, mit scharfer, steriler Rasierklinge in Glaspetrischale mit etwas VKM-Saccharoselösung (0,55 M Saccharose; VKM-Salze in 1/10 Konzentration; in Anlehnung an Binding und Nehls, 1977) in kleine Stücke schneiden und zur Vorplasmolyse 10 min. in 30 ml VKM-Saccharoselösung inkubieren.

- Saccharoselösung abziehen und durch 15 ml Enzymlösung (0,2 % Cellulase *Aspergillus niger*; 0,2 % Cellulase *Penicillium funiculosum*; 0,5 % Cellulysin; 0,2 % Mazerozym R10; 0,5 % BSA; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM MES-KOH; 0,42 M Saccharose; VKM-Salze in 1/10 Konzentration) ersetzen.
- Inkubation 15-21 h (in Abhängigkeit vom Pflanzenmaterial) bei Dunkelheit unter leichtem Schütteln zum enzymatischen Abbau der Zellwand und der Mittellamelle.
- Abtrennung des groben Pflanzenmaterials von der Protoplastensuspension über eine Siebkombination (Maschenweite 50 und 100 µm).
- Dichtezentrifugation der Protoplastensuspension 10 min. bei 300 g (Hettich Universal 2S) zur Entfernung der Enzymlösung und zur Abtrennung von Zelltrümmern und Bruchstücken.
- Die flotierte Protoplasten mit Pasteurpipette vorsichtig abnehmen, in frisches Zentrifugenröhrchen geben und im Verhältnis 1:1 mit VKM-Saccharoselösung vermischen. Zentrifugationsschritt wiederholen.
- Die flotierte Protoplasten vorsichtig abnehmen, in frisches Zentrifugenröhrchen überführen und ein Teil Protoplastensuspension mit 10 Teilen CPW13-Waschlösung (Frearson et al. 1973) vermischen. Zentrifugation 5 min bei 80 g.
- Überstand verwerfen und Protoplasten in 200-300 µl CPW13-Waschlösung resuspendieren.
- Auszählen der Protoplastensuspension in einer Thoma-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Die Konzentration der Suspension sollte auf  $5 \times 10^7$  Protoplasten / ml Suspension eingestellt werden.

### 2.6.3.2 Aufreinigung hochmolekularer DNA aus Protoplasten

Um die hochmolekulare DNA vor den von außen einwirkenden Scherkräften zu schützen, müssen die Protoplasten in Agarose eingebettet werden. Die Präparation der DNA erfolgt innerhalb der Agarosematrix, indem die übrigen Bestandteile der Zelle auf chemisch-enzymatischem Wege entfernt werden. Gleichzeitig werden durch die hohe EDTA-Konzentration in der Pufferlösung DNA-abbauende Enzyme (DNasen) in ihrer Aktivität gehemmt. Die Präparationsmethode wurde für die Isolierung hochmolekularer DNA aus Protoplasten der Rebe angepaßt und optimiert.

- Protoplastensuspension auf 37 °C erwärmen und in gleichen Teilen mit 37 °C warmer 1,5 %iger InCert-Agarose (Biozym) vorsichtig vermischen.
- Das Gemisch in eisgekühlte Blöckchenformen pipettieren, mit Parafilm verschließen und bei 4 °C 30 min. erkalten lassen.
- Lyse der eingebetteten Protoplasten in 10-fachem Volumen Lysepuffer (10 mM Tris-Cl pH 9,3; 0,5 M EDTA; 1 % (w/v) N-laurylsarkosin; 1 mg/ml Proteinase K) über 48 h bei 50 °C. Die Zellstruktur wird aufgelöst, Proteine abgebaut und die DNA freigesetzt.
- Lysepuffer verwerfen und Agaroseblöckchen in 50-fachem Volumen Waschpuffer (20 mM Tris-Cl pH 8; 50 mM EDTA) aufnehmen. Inkubation 4x 1 h bei 50 °C.
- Blöckchen in frischen Waschpuffer überführen und bei 4 °C lagern. Ein Blöckchen auf 1 %igem Agarosegel in der Pulsfeldgelelektrophorese analysieren.

## **2.7 Auftrennung von DNA in einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Die Auftrennung von DNA-Molekülen mit einer Größe von über 25 Kb erfolgte in horizontalen 1 %igen LE-Agarose-Flachgelen mit 1x TAE in einer Pulsfeldgelelektrophorese (Biorad CHEF DR III). Die DNA war in Agaroseblöckchen eingebettet, die in das Gel eingegossen wurden.

- Die abgewogene Agarose in 1x TAE-Puffer aufkochen und nach abkühlen auf etwa 55 °C in das Gelbett gießen.
- Die Elektrophoreseapparatur mit etwa 2 l 1x TAE auffüllen, Umwälzpumpe und Kühlaggregat einschalten und Laufpuffer auf 11-14 °C vorkühlen lassen.
- Nach Erkalten der Agarose Agaroseblöckchen mit eingebetteter DNA vorsichtig in die Probetaschen geben, Probetaschen vollständig mit flüssiger 1 %iger low-melt Agarose auffüllen.
- Nach Erkalten der Agarose Gel in Elektrophoreseapparatur einsetzen und Programm starten.

Die Elektrophoresebedingungen wurden jeweils individuell an die aufzutrennende DNA angepaßt. Als Richtwert wurden für unterschiedliche Molekülgrößen zwei Basisprotokolle entwickelt, von denen ausgehend die individuelle Optimierung erfolgte. Die Auftrennung von DNA-Molekülen mit einer Größe zwischen 200 Kb und 2 Mb erfolgte bei 6 V/cm, einer gestaffelten Pulszeit von 60-120 s, einem Winkel von 120 ° über 24 h, die

Elektrophoresebedingungen für den Größenbereich zwischen 10 Kb und 500 Kb waren 3,5 V/cm, 1-60 s gestaffelte Pulszeit, 120 ° Winkel, 36 h. Als Größenmarker wurden Hefechromosomen bekannter Größe aus *Saccharomyces cerevisiae* oder  $\lambda$ -Konkatemere verwendet.

## **2.8 Restriktion von DNA mit Endonukleasen**

### **2.8.1 Restriktion von genomischer DNA und Plasmid-DNA in wässriger Lösung**

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm oder visuell bestimmt und pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA fünf Einheiten des Enzyms eingesetzt. Als Restriktionspuffer wurden die vom jeweiligen Hersteller mitgelieferten 10-fach Stammlösungen verwendet. Ansätze mit Plasmid-DNA wurden bei der jeweils angegebenen optimalen Temperatur 2-3 h im Wasserbad oder Thermoblock inkubiert, die Restriktion von genomischer DNA erfolgte über Nacht im Wärmeschrank. Danach wurden die Ansätze mit 1/9 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt, die DNA 15-20 min. auf Eis präzipitiert und 10 min. in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm pelletiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde die DNA in 500  $\mu\text{l}$  70 %igem Ethanol gewaschen, das Pellet bei Raumtemperatur leicht getrocknet und in geeigneter Menge TE-Puffer oder 10 mM Tris-Cl pH 8,0 gelöst.

### **2.8.2 Restriktion von hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken mit**

#### **Megarestriktionsenzymen**

Zur Vorbereitung der Restriktion von hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken sind zusätzliche Wasch- und Inkubationsschritte erforderlich, um Reste der Proteinase K aus der DNA-Präparation zu inaktivieren, damit die Aktivität der Restriktionsenzyme nicht beeinträchtigt wird. Außerdem muß die EDTA-Konzentration im Agaroseblock stark reduziert werden und ein Ionenaustausch gegen die Salzkomponenten des jeweiligen Restriktionspuffers erfolgen.

- Inkubation der Agaroseblöcke 2x 90 min. in Waschpuffer mit 1 mM PMSF bei 50 °C.
- Blöckchen in frischen Waschpuffer überführen, Inkubation 2x 90 min. bei 50 °C.
- Blöckchen in 0,1x Waschpuffer überführen, Inkubation 2x 90 min. bei 50 °C.

- Agaroseblöckchen jeweils separat in einem Eppendorfgefäß mit erforderlichem 1x Restriktionspuffer 1 h auf Eis inkubieren.
- Puffer abziehen, 300 µl frischem 1x Restriktionspuffer mit 20-40 U Enzym zugeben und 1 h auf Eis stellen.
- Inkubation mindestens 4-5 h (oder über Nacht) im Wärmeschrank bei erforderlicher Temperatur.
- Reaktion abstoppen durch Zugabe von 40 µl 0,5 M EDTA pH 8, 30 min. auf Eis inkubieren.
- Enzymlösung abziehen, Agaroseblöckchen in 200 µl TE-Puffer aufnehmen.

Die Agaroseblöckchen wurden sofort in das Agarosegel eingebettet und die Elektrophorese gestartet.

### **2.8.3 Partielle Restriktion von hochmolekularer DNA in Agaroseblöckchen**

Die partielle Restriktion hochmolekularer DNA in Agaroseblöckchen erfolgte ebenfalls nach der in 2.8.2 beschriebenen Methode. Zusätzlich wurden jedoch die optimale Enzymmenge (30-50 U) und Inkubationszeit (1-4 h) für jede einzelne Präparation an hochmolekularer DNA in Vorversuchen ausgetestet. Als Restriktionsenzym wurde *HindIII* verwendet und die Proben bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit durch Zugabe von 200 µl 250 mM EDTA abgestoppt.

### **2.8.4 Partielle Restriktion von hochmolekularer DNA in wässriger Lösung**

Neben der in 2.8.3 beschriebenen Methode wurde die partielle Restriktion von hochmolekularer DNA auch in wässriger Lösung durchgeführt. Dazu wurde die DNA mit Hilfe der Elektroelution (siehe 2.9.1) aus den Agaroseblöckchen eluiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Centricon Konzentratoren (Millipore) aufkonzentriert und auf einen Wert von 60 µg/ml eingestellt. Die Restriktion mit *HindIII* erfolgte wie in 2.8.1 beschrieben mit folgenden Veränderungen: um die für die BAC-Klonierung erforderliche Fragmentgröße von 300-500 Kb zu erhalten, wurde die optimale Enzymmenge (1-10 U) und Inkubationszeit (0,5-3 min.) für jede DNA-Präparation vorher experimentell ermittelt. Die Reaktion wurde bei

60 °C im Wasserbad abgestoppt und die Restriktionsfragmente in einem präparativen Pulsfeldgel mit 1 %iger low-melt Agarose in 1x TAE aufgetrennt.

**Anmerkung:**

Eine genaue Arbeitsanleitung zur Restriktion hochmolekularer DNA kann hier nicht angegeben werden, da die optimale Enzymmenge und die Inkubationszeiten je nach Enzymhersteller, Enzymaliquot und Alter des Enzyms variieren. Um reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen, sollte eine größere Enzymmenge für alle Versuche verwendet werden. Außerdem sollten die Experimente innerhalb eines kurzen Zeitrahmens durchgeführt werden.

**2.9 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen****2.9.1 Elektroelution**

Die Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten wurde nicht nur zu analytischen sondern auch zu präparativen Zwecken in Agarosegelen durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte in Anlehnung an Sambrook et al. (1989) durch Elektroelution in 1x TE in einem Dialyseschlauch.

- Dialyseschläuche (Porenweite 0,24 nm) von etwa 20 cm Länge 10 min. kochen in 1 l 2 %igem NaHCO<sub>3</sub> mit 1 mM EDTA pH 8,0. Dabei ständig rühren.
- Vorsichtig spülen in sterilem bidest. Wasser
- 10 min. kochen in 1 mM EDTA pH 8,0.
- Schlauchstücke abkühlen lassen und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahren. Ständig mit 1 mM EDTA-Lösung pH 8,0 bedeckt halten.
- Vor Benützung Schläuche dreimal innen und außen mit 1x TE spülen.
- Agarosegel mit Ethidiumbromid färben und DNA mit scharfem Skalpell unter UV-Licht ausschneiden.
- Gelstück in mit 1x TE vollständig gefüllten Dialyseschlauch geben und soviel Puffer abschütten, daß Agarosestück gerade noch mit Puffer bedeckt ist.
- Schlauch mit zwei Klemmen fest verschließen.
- Gelstück an einer Seite des Schlauches parallel ausrichten und möglichst waagrecht in die mit 1x TAE gefüllte Elektrophoreseapparatur geben. Elektroelution 45 min. bei 120 V.

- Elektrisches Feld 30 s umpolen, damit sich an dem Dialyseschlauch haftende DNA löst.
- TE-Puffer vollständig in ein steriles Gefäß abschütten und DNA-Reste mit wenig 1x TE aus dem Schlauch spülen.
- Volumen bestimmen und gleiches Volumen Phenol-Chloroform zusetzen, auf dem Vortex gut mischen und zur Phasentrennung 5 min. bei 10000 g zentrifugieren.
- Wässrige Oberphase abziehen und in frisches Zentrifugenröhrchen überführen.
- 1/9 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2,5 Volumen absolutes Ethanol hinzufügen, mischen, DNA 30 min. auf Eis präzipitieren.
- 10 min. bei 10000 g zentrifugieren, Überstand dekantieren, Pellet in 70 %igem Ethanol waschen und anschließend bei Raumtemperatur leicht trocknen lassen.
- Pellet in 20 µl TE oder 10 mM Tris-Cl pH 8,0 lösen.

### **2.9.2 Elution mit dem Qiaex-Purification Kit**

Alternativ wurde die Aufreinigung mit dem Qiaex-Purification Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Diese Methode kam vorzugsweise immer dann zur Anwendung, wenn nur sehr wenig DNA zur Verfügung stand und bei der Aufreinigung möglichst wenig Verluste auftreten sollten.

Die Präparation wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.10 PCR mit spezifischen Primern**

Die spezifische PCR wurde zur Herstellung von homologen Gensonden aus 'Regent' zur Southern-Hybridisierung (siehe 2.14) auf Mega-Restriktionsfragmente und zu einem ersten Screening der genomischen BAC-Bank nach spezifischen Gensequenzen angewendet. Ausgehend von Sequenzdaten bekannter Gene (Alkoholdehydrogenase, Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase, Phenylalanin-Ammonium-Lyase, Glukanase, Osmotin, Glutaminsynthetase, Glutamatdehydrogenase, Chitinase, Chalkonsynthetase, Chalkonisomerase) wurden mittels Sequenzvergleichs (Alignment) konservierte DNA-Bereiche innerhalb der Gene ermittelt. Für diese Sequenzabschnitte wurden spezifische Primer entwickelt und in einer PCR mit genomischer DNA aus vier verschiedenen Rebsorten, 'Riesling', 'Vidal blanc', 'Regent' und 'Lemberger' eingesetzt. Um bei der Reaktion einen möglichst homogenen Versuchsansatz zu gewährleisten, wurden alle Reaktionskomponenten einer Versuchsreihe mit Ausnahme der DNA zu einem sogenannten „Mastermix“ zusammengegeben und dann auf die verschiedenen

Reaktionsgefäße verteilt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. In Abhängigkeit der verwendeten Primerpaare kamen verschiedene Temperaturprogramme zum Einsatz.

Die Annealingtemperatur wurde nach der Formel

$$T_A = T_S - 5 \text{ °C}$$

$T_A$ : berechnete Annealingtemperatur

$T_S$ : Schmelztemperatur des Oligonukleotids

berechnet und in Vorversuchen jeweils individuell angepasst. Zur Herstellung von Amplifikationsprodukten, die in Plasmide ligiert werden sollten (siehe 2.11), wurde eine High-Fidelity *Taq*-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) verwendet, die aus einer Mischung einer thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase und *Pfu*-DNA-Polymerasen (Barnes, 1994) besteht.

Reaktionsansatz:

- 50-100 ng DNA
- 5 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 8,3; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl)
- je 100 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- 100 pmol Primer
- 3 U High-Fidelity *Taq*-DNA Polymerase
- mit bidest. Wasser auf 50 µl auffüllen

Temperaturprogramm:

4 min. 94 °C  
30 Zyklen  
1 min. 94 °C  
1,5 min. Primerannealing  
1,5 min. 72 °C  
7 min. 72 °C

Nach Beendigung des Programms wurden 5 µl des Ansatzes auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

## **2.11 Klonierung von PCR-Amplifikationsprodukten in *E. coli***

### **2.11.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide**

Die Ligation der PCR-Amplifikationsprodukte in ein Vektorplasmid erfolgte als blunt-end Ligation. Als Vektor wurde das Plasmid pBluescript SK(-) verwendet, das mit *EcoRV* oder *Sma I* linearisiert worden war.

- 50 ng linearisierte und gereinigte Plasmid-DNA mit 200 ng PCR-Produkt mischen
- Zugabe von 1,5 µl 10x Ligationspuffer (660 mM Tris-Cl pH 7,5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM Dithioerythrit; 10 mM ATP) und 1-2 U Ligase , Volumen mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 15 µl ergänzen.
- Inkubation über Nacht (14-15 h) bei 16 °C im Kühlwasserbad.
- Sofort transformieren oder bei -20 °C aufbewahren.

### **2.11.2 Herstellung von transformationskompetenten Bakterienzellen aus *E. coli***

Die Herstellung kompetenter Bakerienzellen erfolgte in Anlehnung an Hanahan (1983). Als Ausgangsmaterial wurden die *E. coli* - Stämme DH5α und XL1-Blue verwendet.

- Zur Vorkultur 3 ml LB-Medium (Ausubel et al.; 1987) mit einer Einzelkolonie animpfen und bei 220 rpm im Inkubator bei 37 °C über Nacht wachsen lassen.
- 50 ml SOB-Medium (20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>) in sterilem 300 ml Erlenmeyerkolben mit 500 µl Vorkultur animpfen und im Inkubator bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,45-0,55 wachsen lassen.
- Kultur 5 min. auf Eis abkühlen.

Alle weiteren Schritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchführen.

- 30 ml Kultur in eisgekühlte Zentrifugenröhrchen geben, 10 min. zentrifugieren bei 4 °C, 3000 rpm (Sorvall SS34)

- Überstand verwerfen, Pellets in 15 ml eiskaltem FSB-Puffer (100 mM RbCl; 45 mM MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O; 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 3 mM HexaminCoCl<sub>3</sub>; 10 mM K-Acetat pH 7,5; 10 % (w/v) Glycerin; pH 6,4 mit HCl) resuspendieren, 10 min. auf Eis stellen.
- 10 min. zentrifugieren bei 4 °C, 3000 rpm
- Überstand verwerfen, Pellets in 3 ml eiskaltem TBII-Puffer (10 mM RbCl; 15 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 10 mM MOPS pH 6,8; 15 % (w/v) Glycerin) resuspendieren und 10 min. auf Eis halten.
- In Portionen von 200 µl aliquotieren und sofort transformieren oder in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70 °C lagern.

### 2.11.3 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

- 200 µl Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis auftauen lassen.
- 10 µl des Ligationsansatzes zugeben, vorsichtig mischen und 30 min. auf Eis inkubieren
- Hitzeschock im Wasserbad 1,5 min. bei 42 °C.
- Transformationsansatz in 1 ml SOC-Medium (SOB-Medium mit 20 mM Glucose) aufnehmen, 1 h bei 37 °C und 250 rpm wachsen lassen.
- Jeweils 200 µl auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml IPTG, 40 µg/ml X-Gal ausplattieren und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen.

### 2.12 DNA-Sequenzierung mit dem Abi Prism 310 Genetic Analyzer

Die Sequenzreaktionen wurden mit dem ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) anhand des nachfolgend beschriebenen Arbeitsprotokolls in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt:

Reaktionsansatz:                    250 ng doppelsträngige DNA  
    je 10 pmol Universal-Sequenzierprimer (UP-32, RP-37)  
    2 µl Reaktionsmix aus dem Kit (enthält Puffer, Nukleotide,  
    *Taq*-DNA-Polymerase)  
    mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 10 µl Gesamtvolumen ergänzen

Temperaturprogramm: 25 Zyklen, bestehend aus  
30 s 96 °C  
15 s 57 °C  
4 min 60 °C

Durch Ethanol-fällung überschüssige Nukleotide entfernen.

- Den „cycle sequencing“-Produkten 90 µl bidest. H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Na-Acetat pH 4,6 und 250 µl absolutes Ethanol zugeben, sofort 15 min in Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
- Überstand entfernen und 250 µl 70 %iges Ethanol zugeben, 5 min in Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
- Überstand vollständig entfernen (eventuell zweimal zentrifugieren) und Pellet leicht trocknen lassen.
- Pellet in 25 µl TSR-Puffer (Perkin-Elmer) lösen, DNA 2 min. bei 90 °C denaturieren und sofort analysieren.

Die Sequenzierung mit dem ABI Prism 310-Sequenziersystem erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## **2.13 Auswertung der Sequenzdaten**

Für die Auswertung der Sequenzdaten per Computer stand das Software-Paket 'DNasis for Windows' (Hitachi, Japan) zur Verfügung. Der Datenbankabgleich mit bereits bekannten Sequenzen erfolgte über das Internet mit Hilfe des BLAST-Systems (Altschul et al.; 1990).

## **2.14 Southern Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG) markierten Sonden**

### **2.14.1 DNA-Transfer von Agarosegelen auf eine Nylonmembran**

Die Übertragung der DNA vom Gel auf die Membran wurde mittels eines Kapillarblots nach Southern (1975) unter hohen Salzkonzentrationen durchgeführt. Als Matrix zur Immobilisierung der DNA wurden Nylonmembranen verwendet. Der hier verwendete Membrantyp Hybond N (Amersham-Buchler) ist ungeladen bei pH 6,5 und hat eine Porengröße von 1,2 µm.

- Agarosegel 2x 20 min. in Depurinierungslösung (0,25 M HCl) inkubieren, gelegentlich schwenken.
- Kurz wässern in bidest. H<sub>2</sub>O
- Agarosegel 1 h in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) unter gelegentlichem Schwenken inkubieren.
- Gel kurz wässern in bidest. H<sub>2</sub>O.
- Agarosegel 2x 20 min. in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris Cl pH 7,2) schwenken.
- Transfer der DNA in einem Kapillarblot über Nacht in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7) auf eine Nylonmembran.
- Nach dem Transfer Membran 10 min. in 2x SSC waschen
- Fixierung der DNA auf der Membran durch Hitze 2 h bei 80 °C.
- Membran in Haushaltsfolie einschweißen und trocken aufbewahren.

#### **2.14.2 Herstellung von „colony lifts“ zur Kolonie-Hybridisierung**

Für die Herstellung von Colony lifts wurde der gleiche Membrantyp wie unter 2.14.1 beschrieben verwendet, allerdings in der Form runder Filter mit 82 mm Durchmesser.

- Bakterienkolonien auf Agarplatten 30 min. bei 4 °C vorkühlen.
- In einer flachen Schale jeweils 2 Lagen Whatman 3MM Papier mit Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung und 2x SSC tränken.
- Membranen vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen auf die Bakterienkolonien setzen. Wenn die Membran aufgelegt wurde, darf sie nicht mehr bewegt werden, da der Transfer sofort beginnt. Membranen 5 min. einwirken lassen und Orientierung des Filters auf der Agarplatte zum späteren Auffinden positiver Klone markieren.
- Filter vorsichtig von der Platte abziehen und mit der Kolonienseite nach oben 5 min. auf dem mit Denaturierungslösung getränkten Papier inkubieren.
- Auf frischem Whatmanpapier kurz abtrocknen lassen.
- Inkubation 15 min. auf mit Neutralisierungslösung getränkten Papier.
- Membran auf frischem Whatmanpapier kurz abtrocknen lassen.
- Inkubation 10 min. auf mit 2x SSC getränkten Papier.
- Zur Fixierung der transferierten DNA die Membranen mindestens 2 h bei 80 °C backen.

- Filter auf eine Aluminiumfolie legen und auf jeden Filter 1 ml eine Proteinase K Lösung (2 mg/ml) pipettieren. 1 h bei 37 °C inkubieren.
- Filter zwischen zwei Lagen gut mit bidest. H<sub>2</sub>O getränktem Whatman Papier legen und Reste des Bakterienrasens durch mehrmaliges Abziehen des oberen Filterpapiers entfernen. Den Vorgang, falls notwendig, mehrmals wiederholen.

Die Membranen können anschließend sofort zur Hybridisierung eingesetzt werden.

### **2.14.3 „Random primed“ DIG-Markierung von DNA**

Die Markierung der DNA wurde in Anlehnung an das vom Hersteller vorgegebene Protokoll durchgeführt:

- 300 ng DNA in 15 µl bidest. H<sub>2</sub>O lösen, 10 min. in kochendem Wasser denaturieren und sofort in Eiswasser abkühlen.
- 2 µl 10x Hexanukleotidmix und 2 µl 10x dNTP-Gemisch (1 mMol dATP, dCTP, dGTP; 0,65 mMol dTTP; 0,35 mMol DIG dUTP; pH 6,5) zugeben.
- Zugabe von 1 µl (zwei Einheiten) Klenow-DNA Polymerase, Reaktionsansatz gut mischen und über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8.
- Präzipitation der DNA durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl und 75 µl abs. Ethanol, Inkubation 1,5 h auf Eis.
- Zentrifugation der DNA 10 min. in Tischzentrifuge, Pellet in 70 %igem Ethanol waschen und bei Raumtemperatur trocknen lassen.
- Pellet lösen in 50 µl TE-Puffer.

### **2.14.4 DIG-Markierung von DNA mit Hilfe der PCR**

Die Markierung der DNA erfolgt in einer PCR-Reaktion. Dazu muß das DNA-Fragment kloniert in einem Plasmid vorliegen und von bekannten Primersequenzen flankiert werden. In der vorliegenden Arbeit lagen die DNA-Fragmente in pBluescript ligiert vor und wurden von bekannten „Universalprimersequenzen“ auf dem Plasmid flankiert.

## Reaktionsansatz:

- 10 pg rekombinante Plasmid-DNA
- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 10 µl dNTP-Gemisch
- je 100 pMol Primer UP-32 und RP-37
- 2,5 U High-Fidelity *Taq*-DNA-Polymerase
- mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 50 µl auffüllen

## Temperaturprogramm:

2 min. 95 °C

10 Zyklen

10 s 95 °C

30 s 50 °C

2 min. 72 °C

20 Zyklen

10 s 95 °C

30 s 50 °C

2 min. 72 °C mit 20 s time implement

7 min 72 °C

### 2.14.5 Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Die auf den Nylonmembranen fixierte spezifische DNA wurde mit DIG markierten Sonden nachgewiesen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungskapazitäten wurde die Membran zuerst mit Hybridisierungspuffer prähybridisiert und erst danach die Sonde in frischem Hybridisierungspuffer dazugegeben. Als Hybridisierungspuffer wurde gebrauchsfertiges DIG-Easy Hyb der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Für die Hybridisierung von rechteckigen Membranen stand ein spezieller Hybridisierungsofen zur Verfügung, Hybridisierungen mit 82 mm Rundfiltern wurden in einem runden Tuppergefäß mit Deckel in einem Schüttelwasserbad durchgeführt.

---

Die Mengenangaben beziehen sich auf eine Membrangröße von 100 cm<sup>2</sup>.

- Prähybridisierung der Membran mit 20 ml DIG-Easy Hyb 3 h bei 42 °C.
- 200 ng markierte Sonde denaturieren (100 °C im Wasserbad, auf Eis abkühlen) und zu 10 ml DIG-Easy Hyb hinzufügen (Hybridisierungslösung).
- Hybridisierung 15 h bei 42 °C.
- Membran 2x 5 min. in 100 ml Waschlösung 1 (2x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS) bei Raumtemperatur waschen.
- Membran 2x 15 min. in 100 ml vorgewärmter Waschlösung 2 (0,1x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS) bei 68 °C waschen.

Die Membran wurde anschließend zur Detektion der markierten DNA-Sonde weiterbehandelt.

#### **2.14.6 Immunologische Detektion DIG-markierter DNA durch Lumineszenz**

Die mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden wurden über eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen.

Die Mengenangaben beziehen sich auf eine Membrangröße von 100 cm<sup>2</sup>.

- Membran 1-2 min. in 100 ml Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % Tween 20; pH 7,5) spülen.
- Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen Membran mindestens 30 min. in 100 ml Blocking-Puffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 1 % (w/v) Blocking Reagenz; pH 7,5) schwenken.
- Inkubation der Membran 30 min. in 50 ml einer 1:20000 Verdünnung einer Anti-Digoxigenin-AP Konjugat Lösung in Blocking-Puffer.
- Membran 2x 15 min. in 100 ml Waschpuffer waschen.
- Membran äquilibrieren 5 min. in 100 ml Detektionspuffer (0,1 M Tris-Cl pH 9,5; 0,1 M NaCl)
- Membran in Haushaltsfolie einschweißen und 5 ml einer 1:200 Verdünnung einer CDP-Star™-Lösung in Detektionspuffer zugeben. Inkubation 5 min. bei Raumtemperatur.
- Detektionslösung abschütten und Membran in frische Folie einschweißen.
- Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm. Expositionsdauer je nach Signalstärke 15 min - 3 h.

## 2.15 Erstellung einer genomischen BAC-Bank

Die genomische BAC-Bank der Sorte 'Vidal blanc' wurde mit dem pBeloBAC11-Vektorsystem (Kim et al.; 1996; in der Literatur häufig auch als pBeloBACII bezeichnet) erstellt. Die Klonierung erfolgte in die *Hind*III-Schnittstelle der im *lacZ*-Gen lokalisierten „polycloning-site“. Das Plasmid pBeloBAC11 und der zur Transformation verwendete *E. coli*-Stamm DH10B wurden uns freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm; zur Verfügung gestellt.

Um partiell geschnittene DNA mit einer möglichst einheitlichen Größe zwischen 200 und 500 Kb zu erhalten, wurde dieser Größenbereich nach der Größenfraktionierung der Restriktionsfragmente in einer PF-Elektrophorese (1 %iges Agarosegel über 16 h bei 6 V/cm, 180 s pulse time, 120 °) aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Abtrennung niedermolekularer DNA wurde eine zweite Größenfraktionierung der DNA in der PF-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde das ausgeschnittene Agarosestück in ein 1 %iges low-melt Agarosegel eingebettet und in einer weiteren PF-Elektrophorese über 15 h bei 4,4 V/cm, 5 s pulse time und 120 ° aufgetrennt. Die höhermolekulare DNA reichert sich in der Kompressionszone des Gels an und kann sehr einfach und vollständig aus dem Gel ausgeschnitten werden.

### 2.15.1 Extraktion partiell geschnittener hochmolekularer DNA aus PFGE-Agarosegelen

Die für die BAC-Bank benötigte partiell *Hind*III geschnittene, gröbenselektierte DNA wurde sowohl über Elektroelution als auch durch enzymatischen Abbau der Agarose isoliert. Da die Extraktion sehr schonend ablaufen muß, wurde das in 2.9.1 beschriebene Protokoll entsprechend angepasst.

- Vorbereitung der Dialyseschläuche wie in 2.9.1 beschrieben
- Gelstück an einer Seite des mit 1x TAE gefüllten Schlauches parallel ausrichten und möglichst waagrecht in die mit 1x TAE gefüllte Elektrophoreseapparatur geben. Elektroelution 3,5 h bei 4 V/cm.
- Elektrisches Feld 30 s umpolen, damit sich die an dem Schlauch haftende DNA löst.
- TAE-Puffer vollständig in ein steriles Gefäß abschütten und DNA Reste mit 1x TAE aus dem Schlauch spülen.
- Eluat mit abgeschnittener Pipettenspitze in einen Centricon Konzentrator (Millipore) überführen.

- Die Entsalzung und Aufkonzentration der Probe erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

Der enzymatische Abbau der Agarose wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Agarosestück in Teile mit je 100 mg schneiden und in TE-Puffer mit 1x Polyaminen (0,75 mM Spermidin; 0,3 mM Spermin) 5 h bei 4 °C äquilibrieren.
- Puffer entfernen und die Agarose 10 min. mit entsprechender Menge an Inkubationspuffer bei 68 °C schmelzen.
- Die Probe auf 45 °C abkühlen lassen, 5 U Agarase zugeben und 1,5 h bei 45 °C inkubieren.
- Dialyse der DNA auf Millipore-Filter mit einer Porengröße von 0,025 µm gegen 0,5x TE über 4 h bei 4°C.

### **2.15.2 Vorbereitung des BAC-Vektorplasmids pBeloBAC11**

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mit dem Qiagen 500 Plasmid Maxi-Präparationskit aus 4 l Übernachtskultur in vier getrennten Ansätzen nach Angaben des Herstellers jedoch mit doppelten Puffervolumina durchgeführt. Die gesamte Plasmid-DNA wurde zum Schluß gemeinsam in einem Volumen absolutem Isopropanol präzipitiert und das Pellet in 175 µl bidest. H<sub>2</sub>O gelöst. Reste von verunreinigender bakterieller genomischer DNA wurden mit Plasmid-Safe DNase (Biozym) entfernt. Das Enzym hydrolysiert selektiv doppelsträngige lineare DNA in Anwesenheit von ATP, wohingegen Plasmid DNA in zirkulärer oder Supercoil-Form nicht abgebaut wird. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls entsprechend den Angaben des Herstellers.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die DNA mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Isopropanol präzipitiert.

Die Restriktion des Plasmids mit *Hind*III erfolgte mit 50 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 37 °C über Nacht. Nach einer Isopropanolpräzipitation wurden die freien 5'-Enden mit einer thermolabilen HK (heat killed) Phosphatase (Biozym) nach den Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die Plasmid-DNA mit Ethanol präzipitiert und auf eine Konzentration von 20 ng/µl eingestellt.

### 2.15.3 Ligation hochmolekularer DNA in pBeloBAC11

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. 10 µg gröbselektierte DNA aus 'Vidal blanc' wurden mit 200 ng dephosphorylierter Plasmid-DNA mit 50 U Ligase bei 16 °C über 36 h ligiert. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz auf einem Millipore-Filter (0,025 µm Porendurchmesser) gegen 0,5x TE bei 4 °C 3 h dialysiert.

### 2.15.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen zur BAC-Elektrotransformation

Zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Elektroporation wurde der *E. coli* Stamm DH10B verwendet. Die Pulszellen zur Elektroporation wurden nach folgender Anleitung im Labor hergestellt:

- Aus frisch gewachsener DH10B-Einzelkolonie eine Übernachtskultur in SOB-Medium herstellen
- 500 ml SOB in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 0,5 ml der Übernachtskultur beimpfen und bei 37 °C und 220 rpm bis zu  $OD_{550} = 0,8$  wachsen lassen. Zellen dann ständig auf Eis halten.
- Zellen in einem Sorvall GSA Rotor 10 min. bei 3500 rpm, 4 °C pelletieren, Überstand verwerfen.
- Zellen in 500 ml sterilem eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendieren.
- Zellen 10 min. bei 3500 rpm pelletieren, Überstand vorsichtig abgießen.
- Zellen wie oben in 500 ml 10 %igem Glycerin resuspendieren.
- Zellen 10 min. bei 3500 rpm pelletieren, Überstand vorsichtig abgießen.
- Zellen in 20 ml Überstand resuspendieren und in 30 ml Zentrifugenröhrchen überführen. Mit 10 %igem Glycerin auffüllen.
- Zellen 10 min. bei 5500 rpm pelletieren, Überstand verwerfen.
- Zellen in 2 ml 10 %igem Glycerin resuspendieren und in 50 µl Portionen aliquotieren.
- Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff gefrieren und bei -70 °C lagern.

### 2.15.5 BAC-Transformation durch Elektroporation

Die Transformation der BACs erfolgte über Elektroporation nach folgender Anleitung:

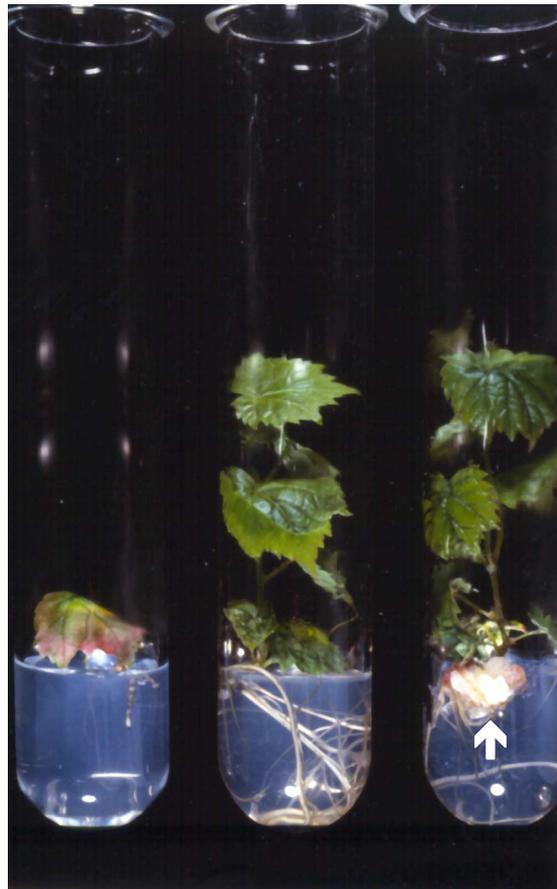
- 50 µl Pulszellen auf Eis auftauen lassen, 2 µl Ligationsansatz hinzufügen und gut vermischen.
- Transformationsansatz in eine eisgekühlte, sterile Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführen.
- Elektroporation mit einem Spannungsimpuls von 2,5 KV und einer Impulslänge von 12,5 ms.
- Elektroporierte Zellen in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium geben und 1 h bei 37 °C und 220 rpm wachsen lassen.
- Je 150 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit 12,5 µg / ml Chloramphenicol und jeweils 40 µg/ml IPTG und X-Gal ausplattieren, bei 37 °C über Nacht wachsen lassen.

Rekombinante Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf eine LB-Agarplatte mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol und jeweils 40 µg/ml IPTG und X-Gal in ein 100er Raster gepickt und anschließend zur Langzeitlagerung bei -70 °C in „freezing medium“ (LB-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol, 36 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 13,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,7 mM Na-Citrat; 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>; 6,8 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4,4 % (v/v) Glycerin) in 96er Mikrotiterplatten überführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl und Anzucht des Pflanzenmaterials

Zu Beginn der Arbeiten im Sommer 1996 zeigte sich, daß für eine erfolgreiche Präparation von Protoplasten die Wüchsigkeit des Pflanzenmaterials einen entscheidenden Einfluß hatte. Besonders deutlich war der Einfluß der Wüchsigkeit bei der Präparation von Protoplasten aus den Sorten 'Regent' und 'Lemberger' in weniger ausgeprägter Form bei 'Riesling', 'Vidal blanc' und 'Seyval blanc'. Die vorhandenen Pflanzen wuchsen in der *in vitro* Kultur nur unbefriedigend, die Blattspreiten waren teilweise verkümmert und zeigten nekrosenartige Symptome, die Bewurzelungsfähigkeit der Stecklinge war stark eingeschränkt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der *in vitro* Kultivierung von Wildarten gemacht (Harst, M.; persönliche Mitteilung). Hier konnte ein Wechsel vom LS-Vollmedium hin zu MS-Medium mit ½-facher Konzentration an Makronährstoffen, jedoch bei gleicher Konzentration an Mikronährstoffen, das Wachstumsverhalten entscheidend verbessern. Die Zugabe von 0,5 mg/l Indolelessigsäure induzierte ein früheres Wurzelwachstum, allerdings bewirkte der Wuchsstoff gleichzeitig eine verstärkte Bildung von Kalluswucherungen im Übergangsbereich von Wurzel zum Sproß, wodurch das Wachstum der Pflanze negativ beeinflusst wurde. Optimales Wachstum von 'Regent' und 'Lemberger' wurde auf MS-Medium mit ½-facher Konzentration an Makronährstoffen ohne weitere Hormonzugabe erreicht. Nach 5-7 Wochen hatten die Pflanzen ausreichend junge Blattmasse gebildet und wurden zur Protoplastierung abgeerntet. Diese Mediumvariante wurde auch von der Abteilung *in vitro*-Kultur zur schnellen *in vitro* Vermehrung von 'Regent'-Pflanzgut übernommen.

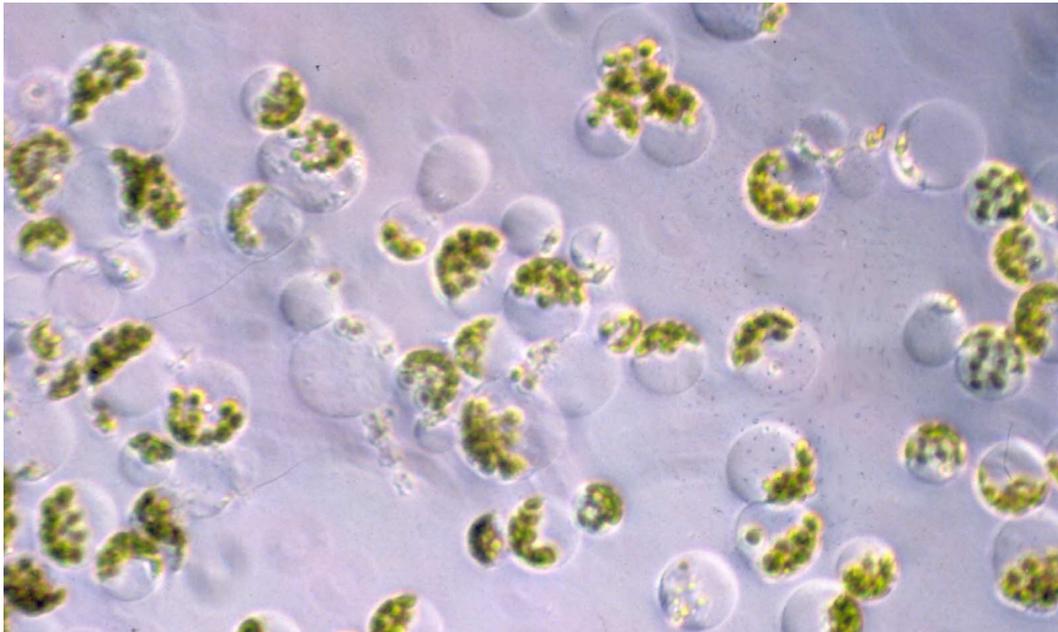


**Abb. 5:** *In vitro* Pflanzen der Sorte 'Regent' auf unterschiedlichen Nährmedien nach 4-wöchiger Kultivierung. Pflanzen von links nach rechts auf LS-Medium, MS-Medium mit ½-facher Konzentration an Makronährstoffen, MS-Medium mit ½-facher Konzentration an Makronährstoffen jedoch zusätzlich 0,5 mg/l Indolessigsäure. Die letzte Variante zeigt eine starke Kalluswucherung zwischen Wurzel und Sproß.

### 3.2 Isolierung von Protoplasten

Die Grundlage für eine erfolgreiche Protoplastenaufarbeitung wird durch die Wahl des Pflanzenmaterials gelegt. Bei den verwendeten Sorten konnten zum Teil erhebliche Unterschiede bei der Ausbeute an Protoplasten beobachtet werden. Im Vergleich der pilzanfälligen Sorten konnte unter optimalen Bedingungen bei 'Riesling' eine hohe Ausbeute von  $5 \times 10^7$  Zellen / g Blattmaterial erzielt werden, während bei Präparation von 'Lemberger' die Zelldichte einen Wert von höchstens  $6 \times 10^6$  erreichte. Besonders deutlich zeigte sich der Sortenunterschied bei den pilztoleranten Sorten 'Regent' und 'Vidal blanc'. Bei 'Vidal blanc'

war die Aufarbeitung völlig unproblematisch und es wurden Ausbeuten von bis zu  $6 \times 10^7$  Zellen erreicht. Bei 'Regent' war keine Isolierung von Protoplasten möglich, nur bei drei Präparationen konnten sehr wenige Zellen isoliert werden, die aber zur Präparation einer größeren Menge DNA nicht ausreichten.

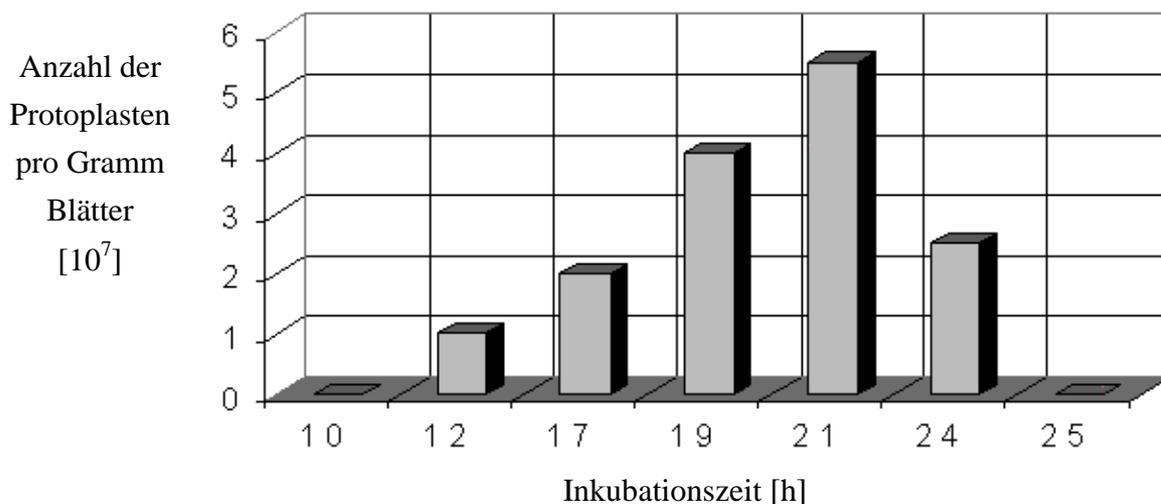


**Abb. 6:** Blattprotoplasten der Sorte 'Vidal blanc', 300-fache Vergrößerung

Alle verwendeten Pflanzen zeigten bei der Präparation von Protoplasten trotz der Anzucht unter *in vitro* Bedingungen eine ausgeprägte Saisonalität. Pflanzen, die im Herbst und Winter angezogen worden waren, eigneten sich weniger gut zur Isolierung von Protoplasten. Gegenüber den in den Monaten April bis August angezogen *in vitro* Pflanzen war die Ausbeute an Protoplasten hier stark reduziert.

Für die Isolierung von Protoplasten aus der Rebe lag ein Reinigungsprotokoll nach Reustle (1989) vor. Die Aufarbeitung nach diesem Protokoll zeigte aber, daß die Ausbeute an Protoplasten zu gering war, um hochmolekulare DNA in ausreichender Menge daraus präparieren zu können. Dies galt besonders für die pilztolerante Sorte 'Vidal blanc', bei der die Ausbeute zunächst im Bereich von  $3 \times 10^5$  Zellen/g Blätter lag. Bei den anfälligen Vergleichssorten 'Riesling' und 'Lemberger' lag der Wert bei  $2 \times 10^6$ . Für die Einbettung der

Protoplasten in Agarose ist aber eine Zelldichte von  $5 \times 10^7$  pro ml Suspension erforderlich (van Daelen et al., 1989), um den für die weiteren Untersuchungen benötigten ausreichend großen und einheitlichen DNA-Pool zu bekommen. Wichtige Einflußfaktoren, die die Ausbeute und den Erfolg einer Protoplastenaufarbeitung bedingen, sind die Enzymkonzentration und die Inkubationszeit. Beide müssen jeweils individuell an das verwendete Pflanzenmaterial angepasst werden. Ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Parametern (Reustle, 1989) wurde jeweils bei einer konstanten Enzymkonzentration (1-fache und  $\frac{1}{2}$ -fache Konzentration) die Inkubationszeit variiert. Diagramm 1 zeigt das Optimum für die hier vorgestellte Sorte 'Vidal blanc' mit einer Enzymkonzentration von 0,2 % Cellulase *Aspergillus niger*; 0,2 % Cellulase *Penicillium funiculosum*; 0,5 % Cellulysin; 0,2 % Mazerozym R10 bei einer Inkubationszeit von 18 h. Bei kürzeren Inkubationszeiten war die Ausbeute sehr stark reduziert und auch bei einer Zeitspanne von mehr als 22 h nahm die Zahl der isolierten Protoplasten rapide ab. Bei einer Inkubationszeit von unter 12 h bzw. über 24 h war anschließend keine Aufarbeitung möglich.



**Diagramm 1:** Anzahl der Protoplasten aus der Sorte 'Vidal blanc' in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Blattmaterials in der Enzymlösung.

Eine Reduzierung der Enzymkonzentration auf die Hälfte der bei Reustle (1989) angegebenen Werte konnte bei gleichzeitiger Verlängerung der Inkubationszeit die Ausbeute an Protoplasten wesentlich verbessern. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden mit der Sorte 'Vidal blanc' ermittelt und konnten bei den Sorten 'Riesling', 'Seyval blanc' und 'Lemberger'

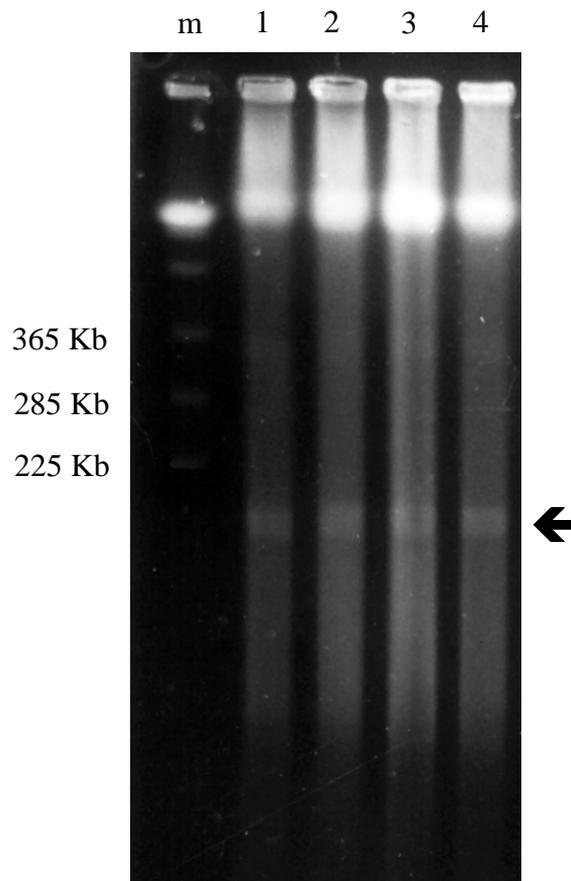
bestätigt werden, nicht jedoch bei 'Regent'. In welchem Umfang die Versuchsparameter auf andere Sorten übertragbar sind, wurde hier nicht untersucht.

### **3.3 Präparation hochmolekularer DNA und Auftrennung in einer Pulsfeldgelelektrophorese**

Hochmolekulare DNA wurde aus Protoplasten isoliert, die in Agarose eingebettet und anschließend lysiert wurden. Bei einer angenommenen DNA-Menge von 0,9-1 pg pro diploidem Genom (Lodhi et al. 1995) und 3 Millionen Protoplasten pro Agaroseblock ergibt sich eine DNA-Menge von etwa 3 µg pro Block.

Anfangs war ein Lysepuffer mit 0,25 M EDTA verwendet worden. Die so präparierte hochmolekulare DNA war jedoch während der Aufarbeitung stark degradiert worden und zeigte bei ihrer Auftrennung in der Pulsfeldgelelektrophorese (PF-Elektrophorese) eine große Zahl unterschiedlich langer DNA-Bruchstücke im Bereich von 50–1100 Kb. Durch die Erhöhung des EDTA-Gehaltes auf 0,5 M und die Zugabe von 10 mM Tris-Puffer konnte die Qualität der DNA hinsichtlich ihrer Größe entscheidend verbessert werden. Der überwiegende Anteil der DNA war mindestens 2,2 Mb groß (Größe des längsten Chromosoms aus *S. cerevisiae* als Größenmarker) und ergab bei der PF-Elektrophorese eine kräftige Bande im Größenbereich von 2,2 Mb in der Kompressionszone des Gels. In dieser Zone reichern sich solche DNA-Moleküle an, die wegen ihrer Größe nicht weiter aufgetrennt werden können. Nur ein geringer Teil der DNA war degradiert. Zur Auftrennung der DNA in der PF-Elektrophorese kamen verschiedene Elektrophoreseprotokolle zum Einsatz, die je nach Länge der DNA-Moleküle optimiert wurden. Die jeweiligen Elektrophoreseparameter sind in den Untertiteln der Abbildungen erläutert.

In allen Experimenten, in denen ungeschnittene hochmolekulare DNA aufgetrennt wurde, konnte eine schwache Doppelbande beobachtet werden, die unterhalb des kleinsten Hefechromosoms in einem Größenbereich von etwa 200 Kb lag (Abbildung 7). Große Moleküle ringförmiger DNA (in Supercoil-Form und entspannter Form) lassen sich ebenfalls in der PF-Elektrophorese auftrennen. Allerdings ist ihre Auftrennungsgeschwindigkeit wesentlich geringer als lineare Moleküle mit identischer Größe (Levene und Zimm, 1987; Simske und Scherer, 1989). Aufgrund dieser Kenntnis und der Größe der beobachteten DNA wurde angenommen, daß diese Doppelbande aus Chloroplasten-DNA besteht. Die Vermutung konnte durch die Ergebnisse der Southern-Hybridisierung (siehe 3.5) bestätigt werden.

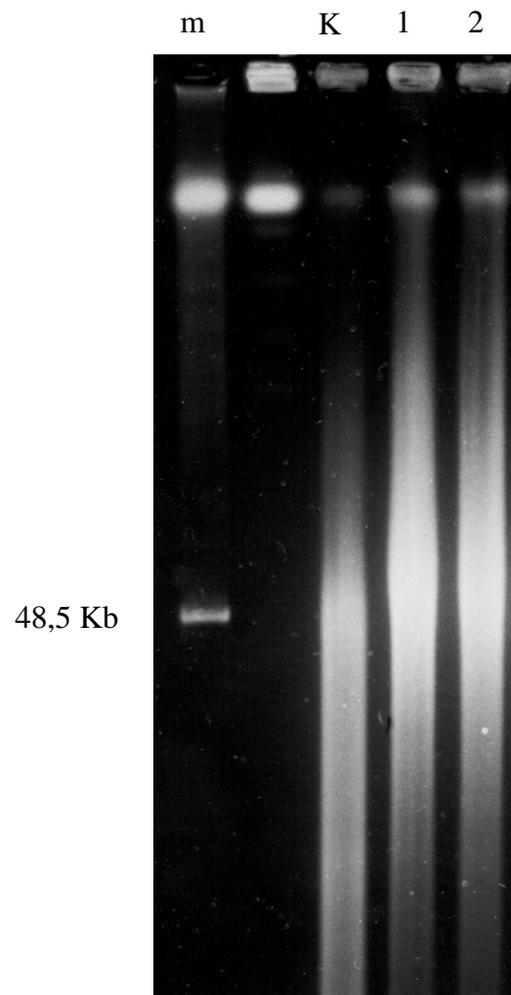


**Abb. 7:** Auftrennung ungeschnittener hochmolekularer DNA der Sorte 'Riesling' in einer Pulsfeldgelelektrophorese (Spur 1-2) und 'Vidal' (Spur 3+4). Der Pfeil markiert die charakteristische Doppelbande. Größenmarker (m): Chromosomen von *S. cerevisiae*. Elektrophoresebedingungen: 1 %iges Agarosegel in 1x TAE, 3,5 V/cm, Pulszeit 1-60 s, Winkel 120 °, 36 h Laufzeit.

### 3.4 *In situ* Restriktion hochmolekularer DNA in Agaroseblöckchen

Um zu überprüfen, ob eine vollständige *in situ* Restriktion der eingebetteten hochmolekularen DNA möglich ist, wurde zunächst ein Reaktionsansatz mit dem Enzym *EcoRI* durchgeführt, dessen Erkennungssequenz im Genom der Rebe häufig vorkommt (Büscher, 1995). Als Positivkontrolle diente eine Probe mit genomischer DNA, die nach der Methode von Thomas et al. (1993) präpariert und ebenfalls mit *EcoRI* geschnitten worden war. Für beide Versuchsansätze wurden 20 U Enzym verwendet, die Inkubation erfolgte jeweils bei 37 °C über 4 h. Die geschnittene DNA wurde in der PF-Elektrophorese aufgetrennt. Bei beiden Proben liegt der größte Teil der DNA in Fragmenten von etwa 50 Kb vor. Ein kleiner Teil der *EcoRI*-Fragmente aus hochmolekularer DNA zeigt sich als schwache

Bande mit über 400 Kb in der Kompressionszone des Gels. Dabei handelt es sich um geringe Reste ungeschnittener DNA. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, daß die Methode der *in situ* Restriktion und jene, bei der die DNA in flüssiger Phase vorliegt, identische Resultate liefern und die präparierte hochmolekulare DNA von guter Qualität ist. Die Ergebnisse der PF-Elektrophorese sind in Abbildung 8 dargestellt.



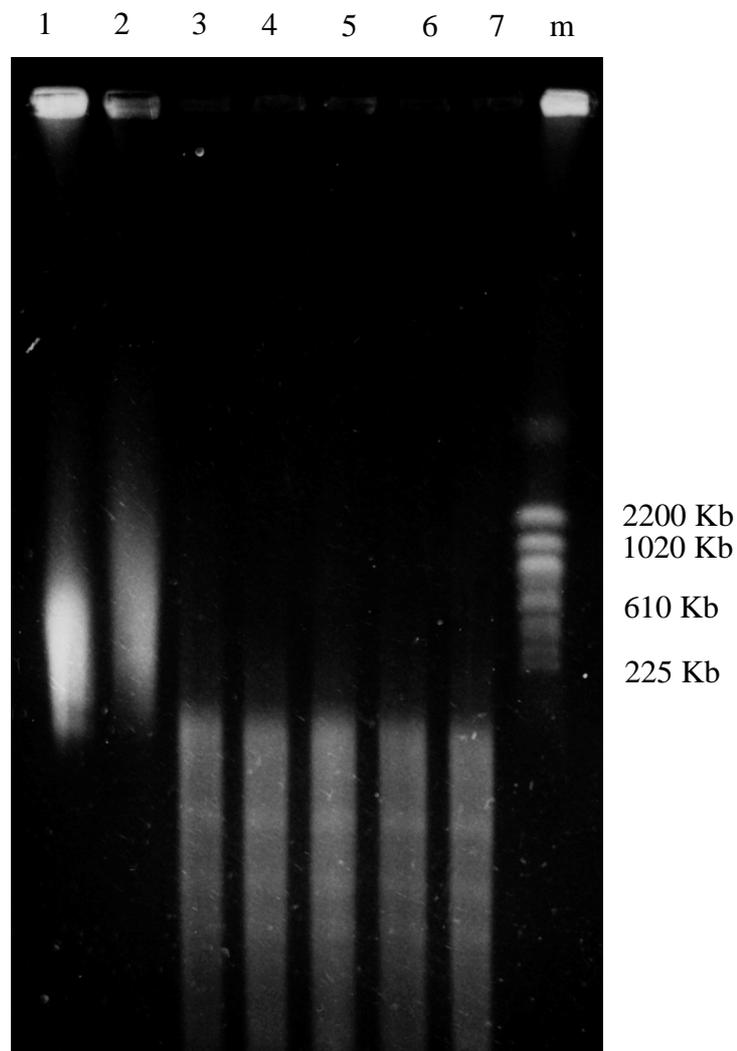
**Abb. 8:** Auftrennung *EcoRI* geschnittener hochmolekularer DNA aus 'Riesling' (Spur 1 + 2). Kontrolle (K): *EcoRI* geschnittene DNA aus 'Riesling' präpariert nach Thomas et al. (1993). Größenmarker (m):  $\lambda$ -DNA. Elektrophoreseparameter wie in Abbildung 7 beschrieben.

Als Vorbereitung für die *in situ* Restriktion waren verschiedene Reinigungs- und Waschschriffe zur Vorbehandlung der Agaroseblöckchen notwendig, um zuverlässige und reproduzierbare Restriktionsergebnisse zu erhalten. Zuerst mußten Reste der Proteinase K aus

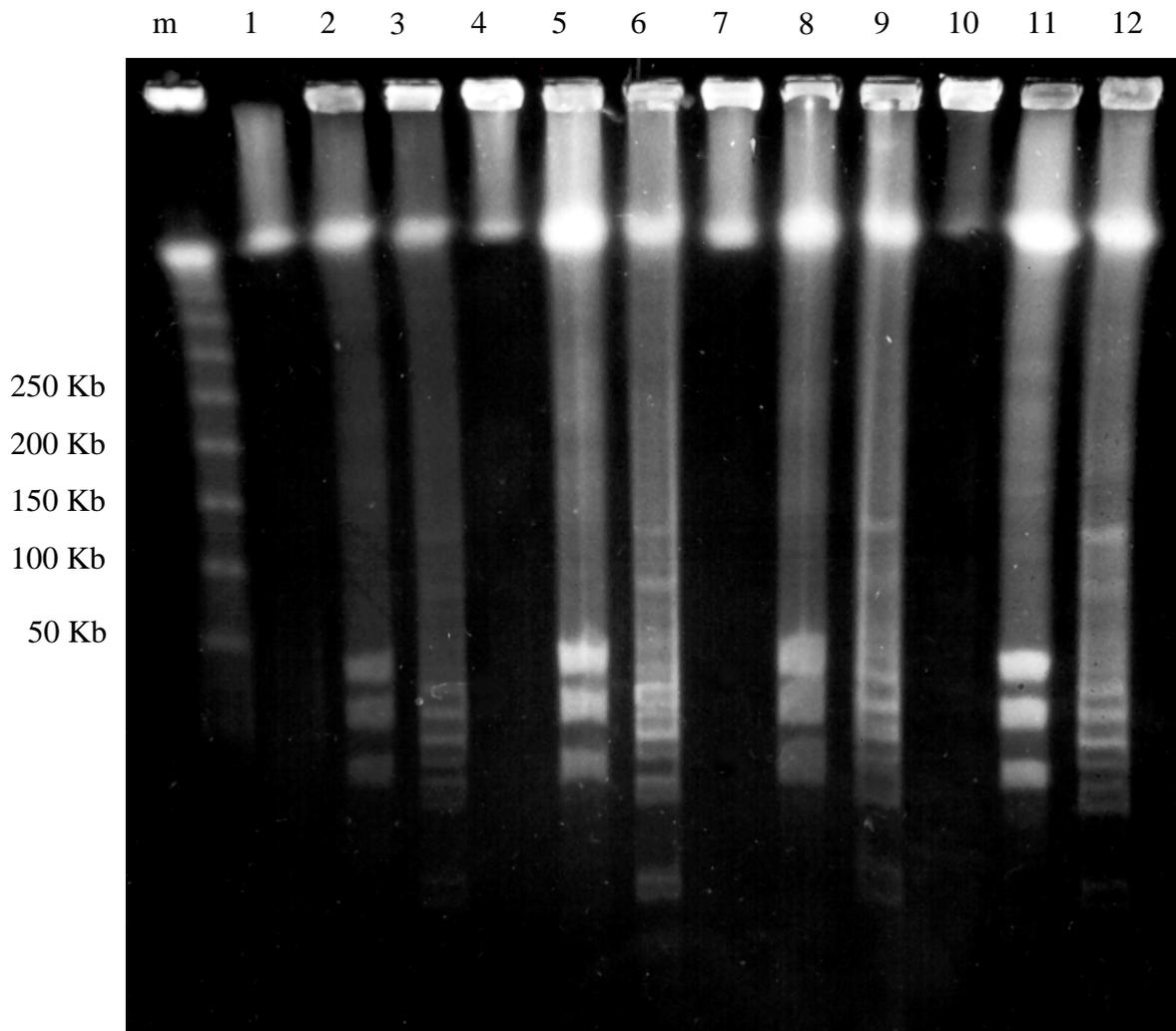
dem Lysepuffer durch Inkubation der Blöckchen in 1 mM PMSF inaktiviert werden. Im Gegensatz zu den bei Guidet und Langridge (1992) beschriebenen Ergebnissen haben die Experimente gleich zu Beginn der Arbeiten gezeigt, daß ohne diesen Inaktivierungsschritt keine *in situ* Restriktion der DNA möglich ist, weil die Restriktionsendonukleasen durch die Proteinase K abgebaut wurden (Abbildung 9).

Hohe EDTA-Konzentrationen in der Agarose können sich ebenfalls nachteilig auf die Restriktionsbedingungen auswirken. Gerade wenn unmittelbar nach der Lyse der Protoplasten die Restriktion der DNA erfolgte, war die Spaltung oft unvollständig. Im Hinblick auf eine möglichst optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde ein Waschschrift in 0,1x TE-Puffer vorgenommen, um die EDTA-Konzentration in der Agarose zu reduzieren (Abbildung 9). Ebenfalls positiv auf die Restriktion der DNA hat sich eine Reinigung der Agaroseblöckchen von niedermolekularer DNA ausgewirkt (Abbildung 10). Dazu wurden die Proben mit 0,5 %iger Agarose in ein 1 %iges Agarosegel eingebettet und eine Pulsfeldgelelektrophorese 1,5 h in 0,5x TBE bei 6 V/cm, 60 s switch-time und einem 120°-Winkel durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Blöckchen wieder aus dem Gel entnommen, 30 min. in 0,1x TE-Puffer gewaschen und anschließend in einem geeigneten Restriktionspuffer äquilibriert.

Nachdem eine zuverlässige und reproduzierbare Methode zur *in situ* Restriktion von hochmolekularer *Vitis*-DNA zur Verfügung stand, wurden in den nachfolgenden Versuchen eine Reihe von selten schneidenden Megarestriktionsenzymen getestet, von denen bekannt ist, daß sie zur Herstellung von großen DNA-Fragmenten geeignet sind (Barlow und Lehrach, 1987; Smith und Cantor, 1987; Levine und Czech, 1989; Boehringer Mannheim, 1993). Die Enzyme besitzen entweder eine 8 bp große Erkennungssequenz (*Not* I) oder eine 6 bp große Erkennungssequenz mit einer Methylierungssensitivität an Adenosin oder Cytosin (Tabelle 2). Bei allen verwendeten Enzymen (Tabelle 2) konnte nach der PF-Elektrophorese eine Fülle von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten (sog. „DNA-Schmier“) beobachtet werden, der sich im Größenbereich von 20 Kb bis zur Kompressionszone des Gels (etwa 400 Kb) erstreckte. Besonders auffallend war, daß 10 der verwendeten 17 Megarestriktionsenzyme ein jeweils charakteristisches Bandenmuster im Agarosegel produzierten (Tabelle 2 und Abbildung 10). Je nach Enzym waren die Banden mehr oder weniger stark ausgeprägt und enthielten DNA-Fragmente zwischen ca. 10 Kb und 180 Kb Größe. Die Muster waren bei allen in den Versuchen verwendeten Rebsorten identisch und in jedem Fall mehrfach reproduzierbar. Eine Übersicht der getesteten Megarestriktionsenzyme ist in Tabelle 2 dargestellt.

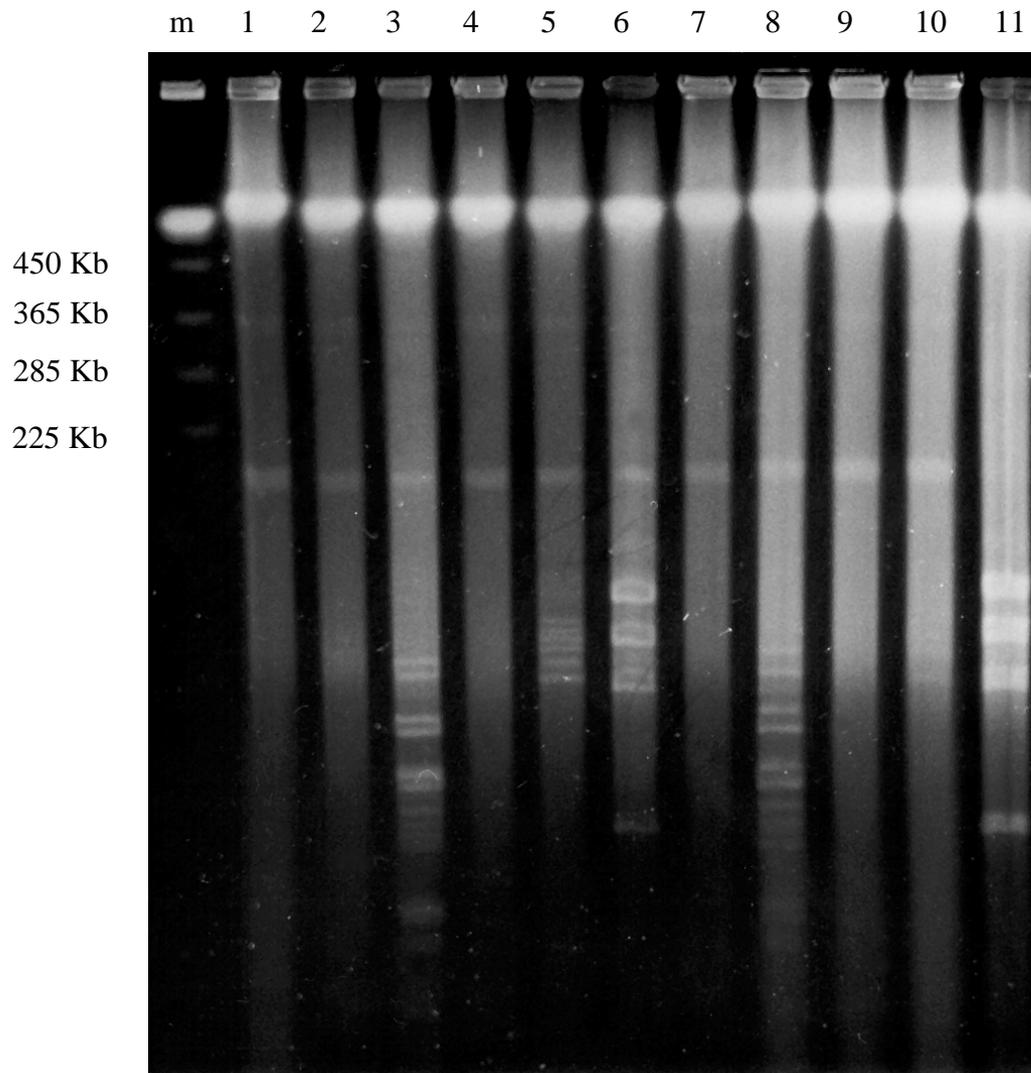


**Abb. 9:** Einfluß von PMSF oder hohen EDTA-Konzentrationen auf die Restriktion hochmolekularer DNA. Hochmolekulare DNA aus 'Riesling' geschnitten mit 60 U *EcoRI* über Nacht ohne PMSF-Behandlung (Spur 1), ohne Waschschrift in 0,1x TE (Spur 2). Die DNA in den Spuren 3-7 wurde vor der Restriktion mit PMSF behandelt und in 0,1x TE gewaschen. Restriktion mit *EcoRI* (Spur 3+4), *HindIII* (Spur 5+6) und *BamHI* (Spur 7). Größenmarker (m): Chromosomen von *S. cerevisiae*. Elektrophoresebedingungen: 1 %iges Agarosegel in 0,5x TBE, 6 V/cm, Pulszeit 180 s, Winkel 120 °, Laufzeit 16 h.



**Abb. 10a:** Enzymspezifische Bandenmuster nach der Größenfraktionierung der Restriktionsprodukte in der Pulsfeldgelelektrophorese.

Ungeschnittene hochmolekulare DNA aus 'Vidal blanc' (Spur 1+4) und 'Riesling' (Spur 7+10). 'Vidal blanc' geschnitten mit *Bss*HII (Spur 2+5) und *Mlu* I (Spur 3+6). 'Riesling' geschnitten mit *Bss*HII (Spur 8+11) und *Mlu* I (Spur 9+12). Die verwendete DNA wurde vor der Auftrennung bzw. Restriktion durch einen kurzen Pulsfeldelektrophoreseschritt von niedermolekularer DNA aufgereinigt. Größenmarker (m):  $\lambda$ -Konkatemere. Elektrophoreseparameter: 1 %iges Agarosegel in 1x TAE, 3,5 V/cm, Pulszeit 1-60 s, Winkel 120 °, Laufzeit 36 h.



**Abb. 10b:** Enzymspezifische Bandenmuster nach der Größenfraktionierung der Restriktionsprodukte in der Pulsfeldgelelektrophorese.

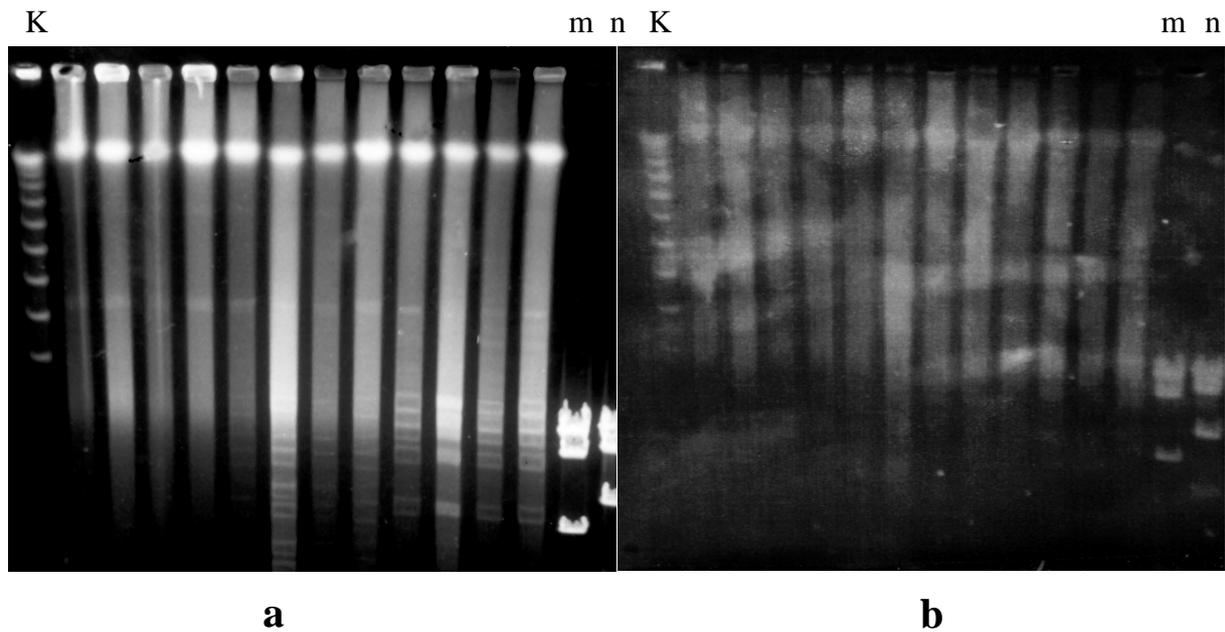
Ungeschnittene hochmolekulare DNA aus 'Vidal blanc' (Spur 1+7), 'Vidal blanc' geschnitten mit *Pvu* I (Spur 2), *Nru* I (Spur 3+8), *Not* I (Spur 4+9), *Rsr* II (Spur 5+10), *Bss*HIII (Spur 6+11). Größenmarker (m): Chromosomen von *S. cerevisiae*. Elektrophoreseparameter: 1 %iges Agarosegel in 1x TAE, 3,5 V/cm, Pulszeit 1-60 s, Winkel 120 °, Laufzeit 36 h.

Enzym	Erkennungssequenz 5'... 3'	Methylierungs- Empfindlichkeit	differenzierbares Bandenmuster
<i>Xho</i> I	C*/TC*GA*G	+	-
<i>Ksp</i> I	C*C*GC/GG	+	+
<i>Pst</i> I	C*TGCA*/G	+	+
<i>Sal</i> I	G/TC*GA*C°	+	+
<i>Sma</i> I	C*C°C*/GGG	+	+
<i>Bam</i> HI	G/GA°TC*C°	+	-
<i>Asp</i> 718	G/GTA°C°C*	+	-
<i>Kpn</i> I	GGTA°C°/C°	-	+
<i>Dpn</i> I	GA <sup>m</sup> /TC	m	-
<i>Mlu</i> I	A°/C*GCGT	+	+
<i>Cla</i> I	A*T/C*GA*T	+	-
<i>Pvu</i> I	CGA°T/C*G	+	-
<i>Nru</i> I	TC*G/C°GA*	+	+
<i>Not</i> I	GC/GGC*C*GC°	+	+
<i>Rsr</i> II	C*G*/G( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )C*C*G	+	+
<i>Bss</i> HII	G/C*GC*GC	+	+

**Tab. 2:** Verzeichnis der getesteten Restriktionsenzyme zur Herstellung von Megarestriktionsfragmenten. Die Enzyme sind jeweils mit ihrer Erkennungssequenz und ihrer Methylierungssensitivität angegeben. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten im einzelnen: \*= methylierungsempfindlich; m = Methylierung zum Schnitt erforderlich; ° = neutrales Verhalten; - = nicht vorhanden; + = vorhanden.

### 3.5 Southern-Blotting von Pulsfeldgelen und nichtradioaktive Hybridisierung

Der Southern-Transfer von hochmolekularer DNA der Rebe auf eine Membran erfordert in jedem Fall eine intensive Depurinierung der Nukleinsäuren, da die DNA aufgrund ihrer Größe sonst nicht transferierbar ist. Üblicherweise wird dazu UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm verwendet, das Einzelstrangbrüche im DNA-Molekül bewirkt. Eine solche UV-Quelle stand am Institut nicht zur Verfügung, daher wurde alternativ eine Depurinierung der DNA mit HCl vorgenommen. Die Versuche haben gezeigt, daß eine mindestens 40 minütige Behandlung mit 0,25 M HCl erforderlich ist, damit zumindest ein Teil der DNA auf die Membran transferiert werden kann. Die sich anschließende Denaturierung wurde von ursprünglich 30 min. auf 1 h ausgedehnt. Der Transfer der DNA wurde mit 20x SSC oder 10x SSC über 48-72 h durchgeführt, wobei keine Unterschiede bezüglich des verwendeten Puffers festgestellt werden konnten. Trotz der intensiven Vorbehandlung gestaltete sich der Southern-Transfer der DNA auf die Membran schwierig. Insgesamt wurden nur etwa 40-50 % der ursprünglich im Gel vorhandenen DNA auf die Membran übertragen (Abbildung 11). Die restliche DNA konnte auch in einem Southern-Transfer von über einer Woche Zeitdauer nicht aus dem Gel herausgelöst werden. Dabei war es unerheblich, ob es sich um ungeschnittene bzw. geschnittene hochmolekulare DNA oder um  $\lambda$ -DNA Fragmente des Größenmarkers handelte. Zwar reichte die Menge der auf die Membran übertragene DNA für Hybridisierungsexperimente aus, sie müßte aber insbesondere für Untersuchungen mit „single-copy“-Sonden weiter optimiert werden. Besonders die lange Inkubationszeit des Gels in 0,25 M HCl führte bei der späteren Detektion zu diffusen Banden und unscharfen Hybridisierungssignalen.

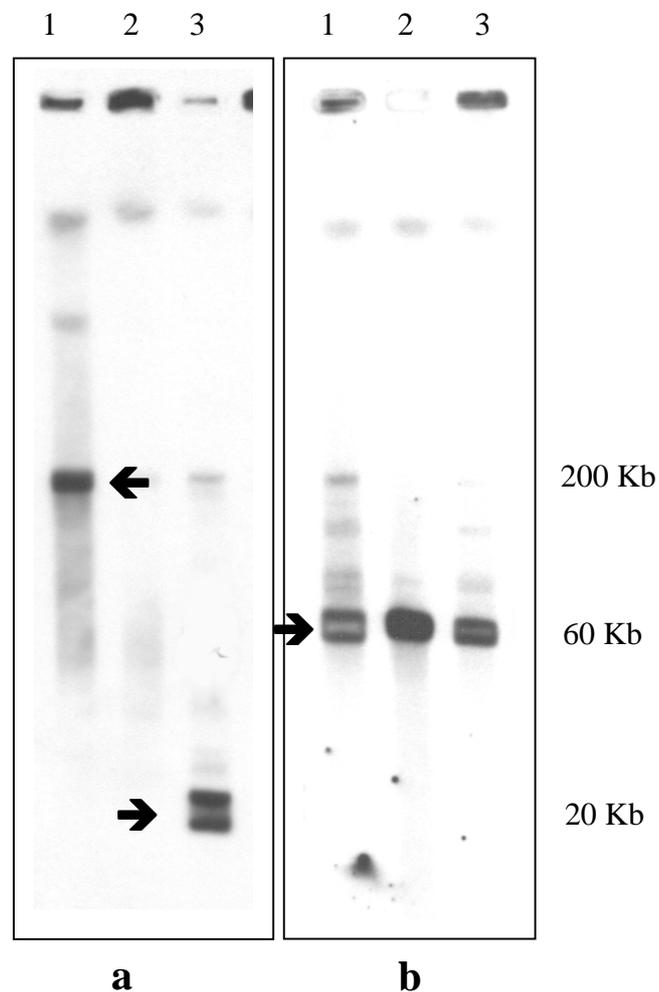


**Abb. 11:** Pulsfeldgel mit Restriktionsfragmenten und Größenmarker vor dem Southern Blot (a) und nach 3 Tagen im Kapillarblot mit 20x SSC (b). 50 % der DNA blieb im Gel zurück und wurde nicht transferiert. Größenmarker:  $\lambda$ -Konkatemere (K),  $\lambda_x$  *Bsu* 36I (m) und  $\lambda_x$  *Bsa* I (n).

Als Sonden zur Hybridisierung an die Megarestriktionsfragmente wurden ein für Chloroplasten-DNA spezifisches 2900 bp großes PCR-Produkt verwendet (CP2900), das mit Hilfe von spezifischen Primern (Demasure et al.; 1995) amplifiziert wurde. Zur Identifikation von repetitiven DNA-Sequenzen diente ein DNA-Fragment einer genomischen *Pst* I-Bank (N4/30) aus Riesling (Hoos, 1988). Mit dieser Sonde wurde eine Größenabschätzung der erhaltenen Megarestriktionsfragmente vorgenommen.

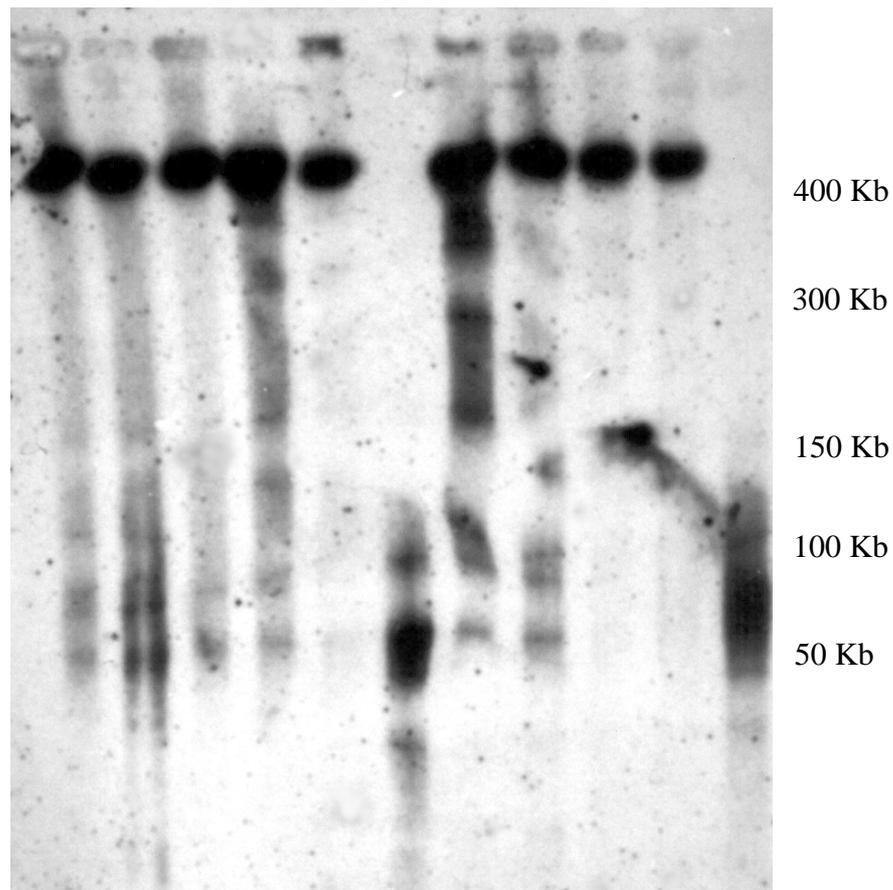
Die Hybridisierung mit der Sonde CP2900 an ungeschnittene hochmolekulare DNA der Rebsorte 'Riesling' ergab ein eindeutiges Signal im Bereich der oben beschriebenen Doppelbande mit einer Größe von etwa 200 Kb im Agarosegel (Abbildung 12). Anhand der Ergebnisse aus der PF-Elektrophorese wurde bereits vermutet, daß es sich bei dieser Bande um Chloroplasten-DNA handeln könnte. Diese Hypothese konnte durch die Southern-Hybridisierung bestätigt werden. Bei der Hybridisierung mit der selben Sonde an geschnittene hochmolekulare DNA konnten anstatt der 200 Kb Doppelbande jeweils scharf gegeneinander abgetrennte Doppelbanden im niedermolekularen Bereich des Gels detektiert werden, die aus der 200 Kb-Doppelbande entstanden sind. Bei der Restriktion der DNA mit *Sal* I waren die identifizierten Chloroplasten-DNA Fragmente ca. 20 Kb groß, bei mit *Mlu* I geschnittener

DNA konnte eine Doppelbande von ca. 55-60 Kb Größe detektiert werden. Identische Ergebnisse waren neben 'Riesling' auch bei den Sorten 'Vidal blanc' und 'Seyval blanc' zu beobachten (Abbildung 12).



**Abb. 12:** Hybridisierung mit der für Chloroplasten-DNA spezifischen Sonde CP 2900 an ungeschnittene hochmolekulare DNA aus 'Riesling' (Teil a, Spur 1), an *Bam*HI geschnittene hochmolekulare DNA aus 'Riesling' (Teil a, Spur 2) an *Sal* I geschnittene hochmolekulare DNA aus 'Riesling' (Teil a, Spur 3) und an *Mlu* I geschnittene hochmolekulare DNA aus 'Riesling' (Teil b, Spur 1), 'Vidal blanc' (Teil b, Spur 2) und 'Seyval blanc' (Teil b, Spur 3). Die detektierte Chloroplasten-DNA im Bereich von ca. 200 Kb bei ungeschnittener hochmolekularer DNA und im Bereich von 55-60 Kb bzw. 20 Kb für mit *Mlu* I und *Sal* I geschnittene hochmolekulare DNA sind mit einem Pfeil markiert.

Eine Vielzahl an überwiegend diffusen Signalen war das Ergebnis der Hybridisierung mit der Sonde N4/30 an geschnittene hochmolekulare DNA. Dennoch waren einzelne Banden deutlich zu erkennen. Die Fragmentverteilung erstreckte sich von 50 Kb bis zur Kompressionszone des Gels bei etwa 400 Kb. Fragmente mit einer Größe von mehr als 400 Kb konnten bei keinem der durchgeführten Versuche detektiert werden (Abbildung 13).



**Abb. 13:** Hybridisierung mit der Sonde N4/30 an geschnittene hochmolekulare DNA der Sorte 'Vidal blanc'. Die Größenverteilung der durch die repetitive Sonde detektierten Restriktionsfragmente erstreckte sich von 50 Kb bis zur Kompressionszone des Gels bei etwa 400 Kb.

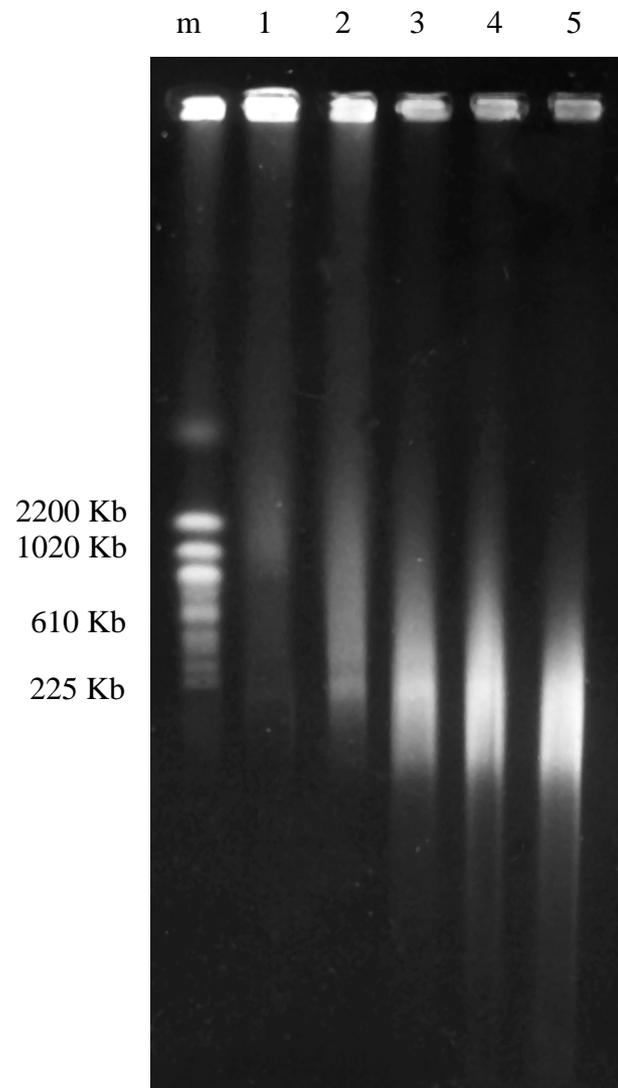
Die Identifikation von differenzierbaren Einzelbanden nach der Hybridisierung mit der Sonde N4/30 läßt erkennen, daß repetitive Sequenzen im Genom der Rebe eher gekoppelt vorliegen müssen. Die Ergebnisse der Hybridisierung zeigen weiter, daß hochmolekulare DNA, die mit der in vorliegender Arbeit entwickelten Präparationsmethode isoliert wurde, bei der Restriktion mit unterschiedlichen Enzymen reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse liefert. Allerdings muß mit Verunreinigungen von Chloroplasten-DNA gerechnet werden. Die Anwesenheit von Plastiden-DNA hat sich jedoch weder bei der Restriktion noch bei der Hybridisierung als störend erwiesen.

### 3.6 Erstellung einer genomischen BAC-Bank für die Rebsorte 'Vidal blanc'

Für den Aufbau der genomischen Bank wurde mit der *in situ* Restriktion unvollständig *Hind*III geschnittene hochmolekulare DNA aus 'Vidal blanc' verwendet, die in den ebenfalls mit *Hind*III linearisierten und dephosphorylierten BAC-Vektor pBeloBAC11 ligiert wurde. Vergleichend dazu erfolgten jedoch auch Restriktionsversuche in flüssiger Phase, bei der die DNA zuvor über Elektroelution von der Agarose getrennt worden war. Die Untersuchungen wurden sowohl als Zeitgradient mit einer bestimmten Enzymmenge als auch mit variabler Enzymmenge über eine festgesetzte Zeitdauer durchgeführt. Die Restriktion von etwa 3 µg in Agarose eingebetteter DNA mit 50 U Enzym über 2 h bei 37 °C lieferte DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 1 Mb und weniger als 225 Kb, wobei die meisten DNA-Stücke eine Länge von etwa 200 bis 600 Kb hatten (Abbildung 14).

Eine ähnliche Verteilung der Fragmentlängen wurde in flüssiger Phase mit 10 U Enzym und einer Inkubationszeit von 30 s erzielt. Für die *in situ* Restriktion sind bei der Verwendung von *Hind*III wesentlich mehr Enzym und eine erheblich längere Inkubationszeit erforderlich. Einen negativen Einfluß der Restriktion in flüssiger Phase auf die Qualität der geschnittenen DNA konnte aufgrund der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht festgestellt werden.

Neben der partiellen Restriktion mit *Hind*III wurde auch überprüft, inwieweit eine Restriktion der DNA mit dem Enzym *Eco*RI in Verbindung mit *Eco*RI-Methylase zur Herstellung von großen DNA-Fragmenten aus 'Vidal blanc' geeignet ist. Die Versuche haben jedoch gezeigt, daß die Restriktion mit *Eco*RI in Verbindung mit *Eco*RI-Methylase nur schwer reproduzierbar ist. Daher wurde eine partielle Restriktion mit *Eco*RI nicht weiter verfolgt.



**Abb. 14:** Auftrennung unvollständig *Hind*III geschnittener hochmolekularer DNA aus 'Vidal blanc'. Aufgetragen sind ungeschnittene hochmolekulare DNA (Spur 1), Restriktionen mit 1 Einheit Enzym (Spur 2), 10 Einheiten (Spur 3), 60 Einheiten (Spur 4), 100 Einheiten (Spur 5). Größenmarker (m): Chromosomen von *S. cerevisiae*. Elektrophoresebedingungen: 1 %iges Agarosegel in 0,5x TBE, 6 V/cm, Pulszeit 180 s, Winkel 120 °, Laufzeit 16 h.

Nach der Größenfraktionierung in einer PF-Elektrophorese wurde die DNA entweder durch enzymatischen Abbau der Agarose mit Agarase oder durch Elektroelution aus der Agarose extrahiert. Wurde der Weg über einen enzymatischen Agaroseabbau gewählt, war eine anschließende Ligation der DNA-Fragmente in pBeloBAC11 nicht möglich. Auch nach mehrmaliger Wiederholung des Experimentes mit jeweils unterschiedlichen DNA-Proben konnten keine rekombinanten Klone identifiziert werden. Die Elektroelution ergab eindeutig die qualitativ hochwertigere und für die BAC-Klonierung besser geeignete DNA. Um eine Fragmentierung der DNA zu vermeiden, wurde die Anreicherung aus dem Eluat mit Hilfe von Centricon Konzentratoren durchgeführt. Dabei ist keine Präzipitation der DNA erforderlich, die DNA bleibt ständig in Lösung und kann mit abgeschnittenen Pipettenspitzen schonend transferiert werden. Aufgrund der durchgeführten Experimente und im Hinblick auf eine erfolgreiche Ligation hat sich die Elektroelution als die besser geeignete Technik erwiesen.

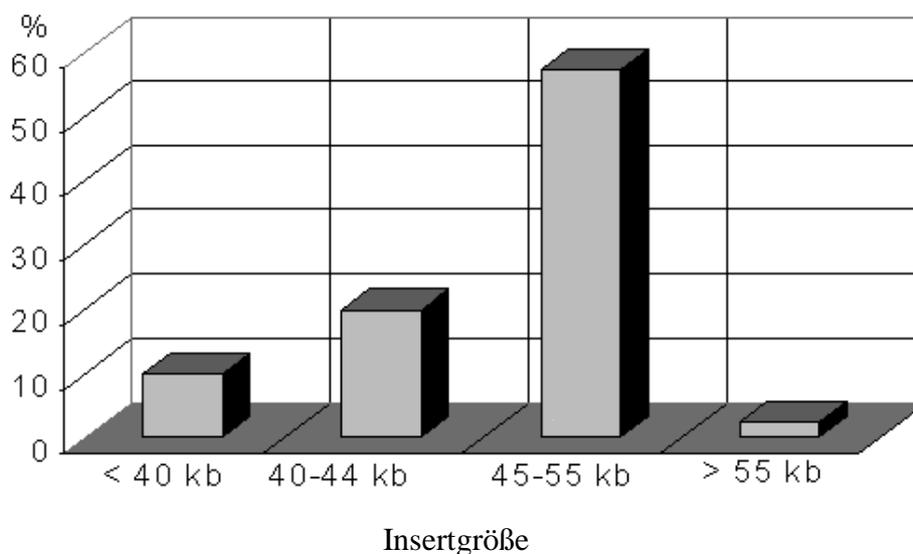
Zur Optimierung der Elektroporationsbedingungen wurde mit einem 150 Kb großen BAC-Klon aus *Arabidopsis thaliana*, der uns freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, zur Verfügung gestellt wurde, eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Elektroporationsparametern durchgeführt. Ausgewertet wurde die Anzahl an transformierten Bakterienzellen je ausplattierter Petrischale als Mittelwert von 6 Wiederholungen in Abhängigkeit von der Zeitdauer des elektrischen Impulses [ms] und der angelegten Spannung [KV/mm]. Die Elektroporation in elektrokompetente Zellen von *E. coli* DH10B ergab bei 1,25 KV eine höhere Zahl an transformierten Zellen als bei 1,5 KV. Der beste Wert mit 25 Kolonien pro Schale ergab sich bei einer Spannung von 1,25 KV und einer Impulszeit von 12,5 ms. Die Einzelwerte sind in Tabelle 3 dargestellt.

<b>Impulszeit</b>	<b>Spannung 1,25 KV</b>	<b>Spannung 1,5 KV</b>
maximal (ca. 17 ms)	1	keine Messung
15 ms	9	5
12,5 ms	<b>25</b>	7
7,5 ms	2	keine Messung

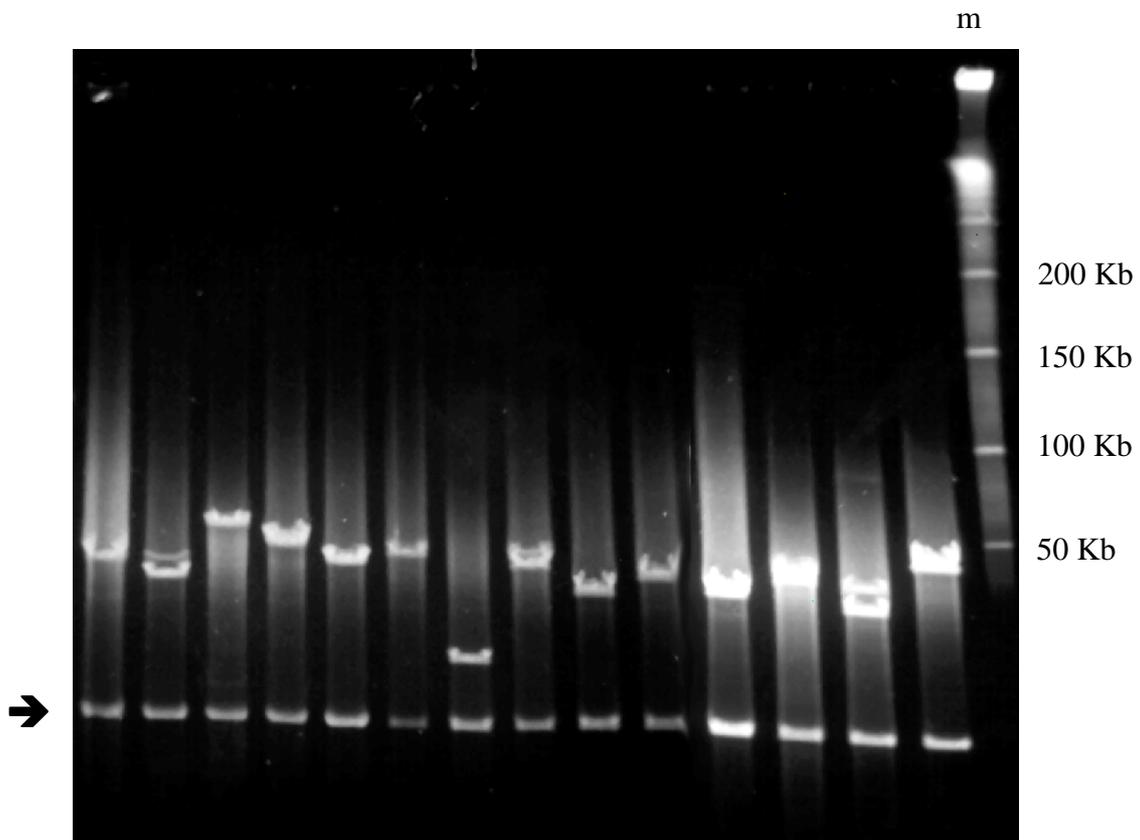
**Tab. 3:** Elektroporation eines 150 Kb BAC-Klones in *E. coli* DH10B. Dargestellt ist die Anzahl der transformierten Zellen als Mittelwert aus sechs Wiederholungen in Abhängigkeit von elektrischer Spannung und Impulszeit.

Sehr wichtig für eine erfolgreiche Transformation der rekombinanten BAC-Plasmide ist eine niedrige Ionenkonzentration im Ligationsansatz, da die Elektroporation auf einen erhöhten Salzgehalt empfindlich reagiert. Bei der Verwendung von nicht entsalztem Ligationsansatz kam es immer zu einem unkontrollierten Stromfluß in der Küvette. Die Probe erhitze sich dabei stark und verdampfte. Um dies zu vermeiden, wurde der komplette Ligationsansatz 3 h bei 4 °C auf einem Dialysefilter gegen 0,5x TE-Puffer dialysiert.

Die in dieser Arbeit vorgestellte noch unvollständige genomische BAC-Bank wurde aus einem Ligationsansatz erstellt. 10 µg DNA wurden mit 200 ng Vektor in einem Gesamtvolumen von 100 µl ligiert. Nach der Transformation von 2 µl des Ligationsansatzes konnten 600 rekombinante Klone identifiziert werden. Die Klone wurden in 96er Mikrotiterplatten mit speziellem Nährmedium zur Langzeitkonservierung überimpft und bei -70 °C gelagert. Zur Überprüfung der Größe der eingebauten DNA-Fragmente wurden 45 Einzelklone zufällig ausgesucht, ihre Plasmid-DNA präpariert und die DNA mit dem Restriktionsenzym *Not* I, das auf dem Vektor jeweils links und rechts der „polycloning site“ eine Erkennungssequenz besitzt, geschnitten. Nach der Auftrennung der Restriktionsfragmente in einer PF-Elektrophorese konnte die Insertgröße der BAC-Klone festgestellt werden (Abbildung 15). Die durchschnittliche Insertgröße betrug 49 Kb, der Median der Stichprobe liegt bei 45 Kb. Der kleinste Klon hatte ein eingebautes Fragment von 24 Kb Größe, der größte von ca. 95 Kb. Diagramm 2 zeigt die Verteilung der Insertgrößen der getesteten Klone.



**Diagramm 2:** Verteilung der Insertgrößen von 45 zufällig ausgewählten BAC-Klonen. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 49 Kb, der Median liegt bei 45 Kb.



**Abb. 15:** Auftrennung *Not* I geschnittener BAC-Klone zur Identifikation der BAC-Inserts. Die Banden mit linearisierter Vektor-DNA sind durch einen Pfeil markiert. Größenmarker (m):  $\lambda$ -Konkatemere.

Hochgerechnet auf das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes sind somit nach der Transformation des kompletten Ansatzes etwa 30000 rekombinante BAC-Klone zu erwarten. Bei einer Genomgröße in der Gattung *Vitis* von etwa 475 Mb ( $4,75 \times 10^8$  bp) besteht diese genomische Bibliothek rechnerisch aus 3 Genomäquivalenten und enthält mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) jede beliebige „single-copy“-Sequenz (Lodhi et al. 1995; Clarke und Carbon, 1976).

### 3.7 Entwicklung genspezifischer Sonden

Zum Durchsuchen der BAC-Bank nach kodierenden Sequenzen und zur Identifikation von überlappenden Klonen (Contigs) wurden genspezifische Sonden hergestellt. Solche homologen Sonden, die direkt aus dem Genom der Rebe stammen, haben den Vorteil, daß sie unter stringenteren Bedingungen als heterologe Sonden hybridisiert werden können und ein besser abgesichertes Ergebnis liefern.

Von besonderem Interesse waren solche Gene der Rebe, deren Produkte mit Resistenzeigenschaften oder Widerstandfähigkeit gegen Stressfaktoren in Verbindung gebracht werden können. Zusätzlich wurden Gene aus dem Zucker-, Stickstoff- und Phenylpropanstoffwechsel bei Pflanzen ausgewählt (Tabelle 4). Die Amplifikation der Gensequenzen erfolgte mit spezifischen Primern. Mit Hilfe der NCBI-Datenbank wurde für jedes Gen ein Vergleich von bekannten Sequenzen aus unterschiedlichen pflanzlichen Genomen durchgeführt. Dadurch konnten konservierte Bereiche innerhalb der kodierenden Sequenzen identifiziert werden, für die entsprechende Oligoprimer synthetisiert wurden. Damit waren die Voraussetzungen gegeben, eine Genisolation mit Hilfe der PCR anzustreben (Gash et al. 1992). Damit die Ergebnisse eventuell parallel in den Kartierungsstudien der Kreuzungspopulation 'Regent' x 'Lemberger' eingesetzt werden können (Zyprian et al., 1999), wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen aus der Sorte 'Regent' amplifiziert.

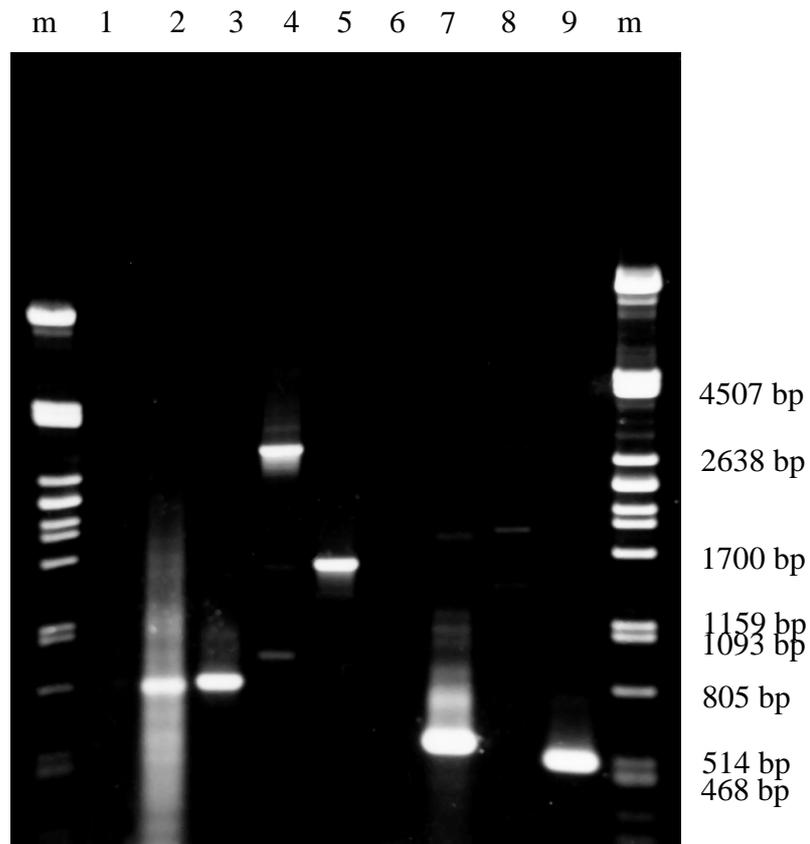
Bezeichnung des Gens	Literaturangabe für <i>Vitis</i>
Chitinase (Typ I)	Busam et al. (1997)
Chalkonsynthase	Sparvoli et al. (1994)
Chalkonisomerase	Sparvoli et al. (1994)
Glukanase	Kraeva et al. (1996)
Osmotin	Loulakakis (1997)
Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)	Sparvoli et al. (1994)
Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase (UFGT)	Sparvoli et al. (1994)
Glutaminsynthetase	Loulakakis et al. (1996)
Glutamatdehydrogenase	Syntichaki et al., (1996)
Alkoholdehydrogenase	Sarni-Manchado et al. (1995)

**Tab. 4:** Gensequenzen der Rebe, für die spezifische PCR-Primer entwickelt wurden.

Mit Kontrollversuchen wurden die geeigneten Hybridisierungstemperaturen ermittelt. Als Substrat für die PCR dient nach der Methode von Thomas (1993) isolierte genomische DNA von 'Regent'. Eine spezifische PCR-Reaktion ergab außer für PAL, Glukanase und Chalkonisomerase für alle anderen Gensequenzen ein einzelnes Amplifikationsprodukt, das sich in Bezug auf die Basenpaarlänge bei der Alkoholdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase erheblich von den aufgrund der Primerabstände erwarteten Werten unterschied (Tabelle 5). In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der PCR-Versuche dargestellt.

<b>Bezeichnung des Gens</b>	<b>tatsächliche Größe des Amplifikationsproduktes</b>	<b>erwartete Größe des Amplifikationsproduktes</b>
Chitinase (Typ I)	820 bp	950 bp
Chalkonsynthase	825 bp	650 bp
Chalkonisomerase	-	640 bp
Glukanase	-	420 bp
Osmotin	557 bp	550 bp
PAL	mehrere PCR-Produkte	670 bp
UFGT	499 bp	500 bp
Glutaminsynthetase	1000 bp	1040 bp
Glutamatdehydrogenase	1480 bp	620 bp
Alkoholdehydrogenase	1100 bp	670 bp

**Tab. 5:** Aufgrund der Primerabstände erwartete Größe und tatsächlich ermittelte Größe der Amplifikationsprodukte mit den spezifischen Primern.



**Abb. 16:** Auftrennung der genspezifischen PCR-Produkte im Agarosegel. Aufgetragen wurden: Glukanase (Spur 1), Chitinase (Spur 2), Chalkonsynthase (Spur 3), klonierte Glutaminsynthetase (Spur 4, schwache Bande), Glutamatdehydrogenase (Spur 5), Chalkonisomerase (Spur 6), Osmotin (Spur 7), PAL (Spur 8), UFGT (Spur 9). Größenmarker (m):  $\lambda$ -DNA x *Pst* I.

Die Amplifikationsprodukte wurden kloniert und sequenziert. Die kleineren Amplifikate aus „Osmotin“ und „UFGT“ wurden komplett durchsequenziert, die übrigen PCR-Produkte wurden von beiden Enden ansequenziert. Ein Datenbankabgleich der Sequenzdaten diente zur Überprüfung und zur Absicherung der Ergebnisse. Die Resultate bestätigen, daß alle amplifizierten DNA-Sequenzen einen Abschnitt des jeweiligen Gens enthalten. Die Sequenzdaten und ein Auszug aus den Ergebnissen des Datenbankabgleichs sind der besseren Übersicht wegen im Anhang der Arbeit wiedergegeben.

### 3.8 Screening der BAC-Bank

Mit den klonierten partiellen Gensequenzen standen Sonden zur Verfügung, die zum Durchsuchen der BAC-Bank nach solchen Klonen genutzt werden konnten, welche einen großen Teil oder möglicherweise sogar das vollständige Gen enthalten. Dafür wurden exemplarisch 800 verschiedene Einzelklone auf Rasterplatten geimpft, über Nacht bebrütet und die herangewachsenen Bakterienkolonien in einem sogenannten „colony-lifting“ auf eine Hybridisieremembran geblottet. Da die hochmolekulare DNA zur Herstellung der genomischen Bank aus Blattprotoplasten präpariert worden war, ist zu erwarten, daß ein Teil der BAC-Klone DNA aus Chloroplasten enthält. Um abschätzen zu können, wie hoch dieser Anteil ist, wurde mit der Chloroplasten-DNA spezifischen Sonde CP2900 an die Einzelklone hybridisiert. Die Lokalisierung von Genen, welche eine erhöhte Stressresistenz oder Widerstandsfähigkeit gegen Pathogenbefall bewirken, ist von besonderem Interesse für die Rebenzüchtung. Mit den entsprechenden Sonden wurde die BAC-Bank unter diesem Gesichtspunkt durchsucht.

Die ersten Ergebnisse der Koloniehybridisierung zeigten Hinweise, daß unter den 800 getesteten BAC-Klonen mindestens acht Klone sind, die ein Insert aus dem Chloroplastengenom besitzen. Die Ergebnisse wurden durch eine PCR-Reaktion mit für Chloroplasten-DNA spezifischen Primern überprüft. Ein Klon enthält eine Sequenz, die zu dem Gen für Osmotin eine hohe Ähnlichkeit aufweist. Auch dieses Ergebnis konnte durch weitere Hybridisierungsexperimente bestätigt werden (Zyprian, 2000; persönliche Mitteilung). Die übrigen Sonden konnten noch keinem bestimmten Klon zugeordnet werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Präparation hochmolekularer DNA aus der Rebe

Die Qualität der hochmolekularen DNA hängt im wesentlichen von der Wahl des Ausgangsmaterials und der Präparationsmethode ab. Bei der Rebe erfordert der hohe Gehalt an Polyphenolen häufig zusätzliche Reinigungsschritte. Das Problem ist auch von anderen Holzpflanzen her bekannt und kann durch die sorgfältige Auswahl des Ausgangsmaterials oder durch spezielle Inkubationspuffer gelöst werden (Vinatzer et al.; 1998).

In der Literatur sind mehrere unterschiedliche Präparationsmethoden beschrieben. So wird hochmolekulare DNA aus Protoplasten (van Daelen et al., 1989; Devos et al., 1989; Cheung und Gale, 1990; Lahaye et al., 1996), isolierten Zellkernen (Zhang et al., 1995) oder sogar aus komplettem, fein zermörsertem Pflanzenmaterial präpariert (Guidet und Langride, 1992). Sehr weit verbreitet ist die Präparation der DNA aus Protoplasten, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Die Bedingungen müssen jeweils individuell an die Versuchssorte angepasst werden. Das Hauptaugenmerk ist jedoch auf die Anzucht des Ausgangsmaterials und die Isolierung von lebensfähigen Protoplasten zu richten. Pflanzen aus der *in vitro* Kultur sind dazu am besten geeignet, weil sie unter standardisierten Umweltbedingungen herangezogen werden können. Die Blätter sind klein und zart, so daß zur Protoplastierung relativ geringe Enzymmengen und kurze Inkubationszeiten ausreichen, was sich später auf die Lebensfähigkeit der Protoplasten positiv auswirkt. Auch sehr junge, im Gewächshaus angezogene Pflanzen können zur Isolierung von Protoplasten verwendet werden (Ganal, 1996). Der Arbeits- und Zeitaufwand zur Bereitstellung des Pflanzenmaterials ist wesentlich geringer als bei der *in vitro* Kultur. Allerdings sind die Pflanzen meistens weniger homogen und benötigen zur Protoplastierung eine höhere Enzymkonzentration und eine längere Inkubationszeit der Enzyme. Unabhängig von der Wahl des Ausgangsmaterials sollte bei der Herstellung von Protoplasten auf einen möglichst niedrigen Kohlenhydratgehalt in der Zelle geachtet werden. Große Mengen an Kohlenhydraten können die Protoplasten bei der Aufreinigung während der Dichtezentrifugation zerstören und behindern später die Restriktion der hochmolekularen DNA (Ganal, 1996). Sie sind überwiegend in älteren Blättern anzutreffen, können jedoch reduziert werden, indem man die Pflanzen vor der Präparation der Protoplasten 48 h bei völliger Dunkelheit kultiviert. Eine Präparation von Protoplasten aus embryonalem Gewebe, das bei völliger Dunkelheit angezogen wurde, ist bei der Rebe ebenfalls möglich (Reustle et al., 1995). Aufgrund nachgewiesener somaklonaler Variation in der Zell- und Gewebekultur der Rebe (Schneider et al., 1996) ist diese Methode

---

allerdings wegen möglicher Mutationen in der DNA für die Herstellung einer physikalischen Karte ungeeignet (Hatano et al., 1992). Werden alle diese Punkte sorgfältig beachtet, kann aus Blattprotoplasten der Rebe zuverlässig hochmolekulare DNA von guter Qualität isoliert werden.

Oftmals ist es für eine Pflanzenart jedoch nicht möglich, zur DNA-Präparation Protoplasten in ausreichender Menge zu isolieren, so daß auf eine alternative Technik zurückgegriffen werden muß. Zhang et al. (1995) haben eine Methode beschrieben, bei der nicht Protoplasten, sondern isolierte Zellkerne in Agaroseblöckchen eingebettet und lysiert werden. Die Technik ist verglichen mit der Protoplastenmethode einfacher in ihrer Handhabung, die Ausbeute an DNA höher und der Anteil an Plastiden- oder mitochondrialer DNA gering. Allerdings haben Bouchez und Camilleri (1998) festgestellt, daß die daraus präparierte DNA stärker geschert ist als diejenige aus Protoplasten und sich mit Restriktionsenzymen weniger gut schneiden läßt. Für die Klonierung von großen DNA-Fragmenten, z.B. zur Herstellung von BAC oder YAC-Banken, empfehlen die Autoren - falls möglich - die Verwendung von DNA aus Protoplasten. In der vorliegenden Arbeit wurde auf ein von Reustle (1989) beschriebenes Protokoll zurückgegriffen, das an die Bedürfnisse zur Präparation hochmolekularer DNA angepasst wurde. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt, gibt es jedoch auch bei der Rebe Sorten, von denen nur in geringem Umfang oder überhaupt keine Protoplasten isoliert werden konnten und deshalb eine alternative Präparationsmethode zur Gewinnung von hochmolekularer DNA in Erwägung gezogen werden muß. Als Beispiel ist die pilzwiderstandsfähige Sorte 'Regent' zu nennen. Bei dieser Sorte konnten nur sehr wenige Protoplasten isoliert werden, die zur Präparation einer größeren Menge DNA nicht ausreichten. Die Ursachen, warum sich aus 'Regent' kaum Protoplasten isolieren lassen, sind unbekannt. Ein Zusammenhang mit der Pilzwiderstandsfähigkeit und der Signaltransduktion in der Zelle, wie er in den Arbeiten von Nürnberger et al. (1994, 1995) und Somssich (1997) beschrieben wird, ist jedoch denkbar. So kann durch die Einlagerung von Lignin und anderen phenolischen Substanzen in die Zellwand die Protoplastierung erschwert oder sogar ganz blockiert werden.

Die eingangs erwähnte Methode zur Präparation hochmolekularer DNA, bei der das feingemörserte Blattmaterial komplett in Agarose eingebettet und lysiert wird, hat in der Praxis keine Bedeutung erlangt. Im Gegensatz zu tierischen Zellen, die komplett in Agarose eingebettet werden können, wirkt sich bei Pflanzen die Anwesenheit von Zellwandbruchstücken negativ auf die Ausbeute und die Qualität der präparierten DNA aus (Bouchez et al., 1998).

## 4.2 Restriktion, Pulsfeldgelelektrophorese und Southern-Hybridisierung von hochmolekularer DNA

Die physikalische Kartierung von Megarestriktionsfragmenten erfordert den Einsatz von selten schneidenden Restriktionsenzymen, die in pflanzlichen Genomen zur Herstellung von langen DNA-Fragmenten geeignet sind. Nach der Auftrennung der Megarestriktionsfragmente in der Pulsfeldgelelektrophorese konnte bei der Mehrzahl der Proben ein enzymspezifisches Bandenmuster im mittel- und höhermolekularen Bereich identifiziert werden, das bei allen getesteten Rebsorten eine identische Fragmentgrößenverteilung zeigte. Hatano et al. (1995) berichten bei Reis ebenfalls von einem ähnlichen Bandenmuster in Pulsfeldgelen, allerdings waren bei diesen Arbeiten deutliche Polymorphismen zwischen den untersuchten Reissorten zu erkennen, die zur Sortenidentifikation herangezogen werden konnten. Im Vergleich zu Reis scheint es im Genom der Rebe deutlich weniger genetische Variation zwischen den einzelnen Sorten zu geben.

Allen getesteten Restriktionsenzymen war gemeinsam, daß nach der Restriktion zahlreiche mehr oder weniger stark ausgeprägte niedermolekulare DNA-Fragmente im Pulsfeldgel zu sehen waren. Wie in Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen werden konnte, bestehen diese Banden zum Teil aus geschnittener Chloroplasten-DNA. Das Auftreten dieser niedermolekularen DNA-Fragmente ist ein sicherer Hinweis für eine erfolgreiche und vollständige Restriktion der hochmolekularen DNA (Ganal, 1996).

Sehr häufig sind nach der Pulsfeldgelelektrophorese von ungeschnittener DNA Reste oder sogar die komplette DNA in den Geltaschen verblieben. Manche Autoren sehen darin die gute Qualität ihrer hochmolekularen DNA bestätigt (van Daelen et al., 1989; Zhang et al., 1995). Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche haben jedoch gezeigt, daß sich auch ungeschnittene hochmolekulare DNA in einer Pulsfeldgelelektrophorese auftrennen läßt. Die DNA wandert dabei zumindest bis zur Kompressionszone im oberen Teil des Gels und verharrt dort, während die Bruchstücke weiter ins Gel einlaufen und einen „Schmier“ bilden. Sowohl bei der Auftrennung ungeschnittener hochmolekularer DNA als auch ihrer Restriktionsfragmente waren zwar DNA-Reste in den Geltaschen zurückgeblieben, was jedoch nicht als besonderes Qualitätskriterium gewertet wurde. Dieser Effekt trat hauptsächlich bei DNA auf, die aus Protoplasten von älteren Blättern isoliert worden war. Solche Präparationen enthalten meist noch eine größere Menge an Kohlenhydraten, die mit der DNA interagierten und die Nukleinsäuremoleküle dadurch möglicherweise immobilisieren. Die in den Geltaschen verbliebenen Reste von ungeschnittener DNA sind bei der Auftrennung von geschnittener DNA

jedoch tolerierbar, da dieser DNA kein negativer Einfluß auf Restriktionsfragmente nachgewiesen werden konnte (Ganal, 1996).

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 beschrieben, besitzen die meisten der zur Herstellung von Megarestriktionsfragmenten verwendeten Enzyme entweder eine acht Basenpaare große Erkennungssequenz wie z.B. *Sfi* I oder *Not* I oder eine solche mit sechs Basenpaaren, die aus einer wiederholten Abfolge der Basen Cytosin und Guanin (CpG) bestehen. Mit solchen sogenannten „Tandemrepeats“ konnten von pflanzlichen Genomen erfolgreich sehr große DNA-Fragmente hergestellt werden (Guzman et al., 1988; Ganal und Tanksley, 1989; Cheung und Gale, 1990; Siedler und Graner, 1991). Bei der Rebe unterscheiden sich die mit diesen Enzymen erhaltenen Restriktionsprodukte jedoch wesentlich von denen aus anderen pflanzlichen oder tierischen Genomen. Mit einer maximalen Fragmentlänge von 400 Kb bei der Rebe ist von einer wesentlich geringeren durchschnittlichen Größe der Megarestriktionsprodukte (etwa 200 Kb) auszugehen. Dies könnte auf einen hohen G+C-Gehalt und eine niedrige Cytosin-Methylierung der Reben-DNA zurückzuführen sein, wie sie auch bei Reis-DNA von Hatano et al. (1992) und Wu und Tanksley (1993) festgestellt wurden und eine ähnliche Verteilung der Fragmentgrößen zu beobachten war. Reis besitzt in Übereinstimmung mit der Rebe eine Genomgröße zwischen 450 und 500 Mb (Arumuganathan und Earle, 1991) und einen relativ hohen G+C-Gehalt von 42 % (Messeguer et al., 1991). In Verbindung mit der geringen Genomgröße der Rebe von 475 Mb (Lodhi und Reisch, 1995) und einem hohen G+C-Anteil der DNA könnte die geringe Größe der Megarestriktionsfragmente erklärt werden. Ein Vergleich der Ergebnisse von Reis und Tomate, der von Wu und Tanksley (1993) durchgeführt wurde, untermauert diese Vermutung. Danach ergibt sich bereits bei der Verwendung eines Restriktionsenzym mit einer acht Basenpaare großen Erkennungssequenz nur unter der Berücksichtigung des jeweiligen G+C-Gehaltes bei Reis eine durchschnittliche Fragmentgröße von 220 Kb, bei der Tomate jedoch von über 900 Kb. Diese Ergebnisse stehen hinsichtlich des G+C-Gehaltes und der Methylierungsintensität der Reben-DNA teilweise im Widerspruch zu den von Büscher (1995) beschriebenen Daten, wo ebenfalls ein hoher G+C-Gehalt im Genom der Rebe festgestellt wurde, jedoch zusätzlich eine relativ intensive Cytosinmethylierung vermutet wird.

Beim Vergleich von genetischen und physikalischen Abständen im Genom der Rebe kann von einer Relation 1:300 ( $1 \text{ cM} \approx 300 \text{ Kb}$ ) ausgegangen werden (Lodhi und Reisch, 1995). Da aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse nur eine durchschnittliche Fragmentgröße von 200 Kb zu erwarten ist, ist der überwiegende Anteil der

Restriktionsprodukte zu klein, um den Abstand von nur einem cM zu überbrücken. Die bisher für die Rebe zur Verfügung stehenden genetischen Karten sind immer noch sehr lückenhaft und die kleinsten genetischen Abstände zwischen zwei Markern betragen durchschnittlich 6,1 cM (Lodhi et al., 1995). Solange noch keine "dichten" genetischen Karten der Rebe verfügbar sind wird es daher sehr schwer sein, mit Hilfe von Megarestriktionsfragmenten und der Pulsfeldgelelektrophorese eine zuverlässige physikalische Karte herzustellen. Zum aktuellen Zeitpunkt ist daher die Erstellung einer physikalischen Karte aus BAC-Klonen der Kartierung von Megarestriktionsfragmenten vorzuziehen.

Ein Problem, das bis zum Abschluß der Experimente nicht endgültig gelöst werden konnte, war der unbefriedigende Transfer der DNA aus Pulsfeldgelen auf eine Membran. Die Schwierigkeiten beim Southern-Blot traten unabhängig davon auf, ob es sich um hochmolekulare DNA, Restriktionsfragmente oder lediglich um einen Größenstandard aus  $\lambda$ -DNA handelte. Eine Verlängerung der Depurinierungs- und Denaturierungsschritte im Vergleich zu konventionellen Agarosegelen konnte nur bedingt Abhilfe schaffen. Das Problem ist den meisten Anwendern der Pulsfeldgelelektrophorese gegenwärtig und wird in der Literatur mehrmals beschrieben (Ishihara und Shikita, 1990; Lee et al., 1991; Luro und Laigret, 1995; Leach und Glaser, 1998). Über die Ursachen für das ungewöhnliche Verhalten der DNA in Pulsfeldgelen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Möglicherweise sind die DNA-Moleküle durch das pulsierende elektrische Feld in der Gelmatrix an einzelne Agarosemoleküle gebunden und werden dadurch teilweise immobilisiert. Hinweise dafür sind bei Gemmill (1991) zu finden. Damit ließe sich auch erklären, warum  $\lambda$ -DNA, die sich aus konventionellen Agarosegelen völlig problemlos transferieren läßt, in Pulsfeldgelen immobilisiert wird. Ishihara und Shikita (1990) haben sich schon früh mit dem Problem beschäftigt, weil besonders die Analyse von „single-copy“-Genen durch einen unvollständigen Southern-Blot beeinträchtigt wird. Ohne vorherige Fragmentierung der DNA durch UV-Licht oder Depurinierung ist überhaupt kein DNA-Transfer möglich. Anstatt eines Kapillarblots wird von den Autoren der Einsatz eines Elektroblots vorgeschlagen. Damit ist es möglich, gleichzeitig sowohl niedermolekulare DNA als auch hochmolekulare DNA innerhalb weniger Minuten und mit sehr hoher Effizienz auf eine Membran zu blotten. Es muß allerdings beachtet werden, daß für diesen Zweck eine positiv geladene Nylonmembran verwendet wird, da andere Membrantypen unter den im Elektroblot herrschenden Bedingungen für DNA Moleküle durchlässig sind.

Leach und Glaser (1998) konnten in ihrer Arbeit nachweisen, daß die Art und Weise, wie die DNA vor dem Transfer behandelt wurde, durch Säuredepurinierung oder Exposition

im UV-Licht, einen direkten Einfluß auf die Hybridisierungsergebnisse hat. Ihre Versuche haben gezeigt, daß die Intensität von schwächeren Hybridisierungssignalen durch den Einsatz der Säuredepurinierung vermindert wird. Die Vorbehandlung des Agarosegels mit UV-Licht lieferte in ihren Experimenten zuverlässigere Ergebnisse.

Eine weitere Alternative zur Southern-Hybridisierung ist die Hybridisierung direkt im Agarosegel mit  $^{32}\text{P}$  markierten Sonden (Purello und Balzas, 1983; Leach und Glaser, 1998). Mehrfachhybridisierungen auf das gleiche Gel mit unterschiedlichen Sonden sind bei dieser Vorgehensweise jedoch nicht möglich.

### 4.3 Erstellung einer genomischen BAC-Bank

Der Aufbau einer genomischen BAC-Bank erfordert die Verfügbarkeit von hochmolekularer DNA und geeignete Verfahren zur Restriktion und Auftrennung großer DNA-Fragmente. Mit der Präparation von DNA aus Protoplasten und der *in situ* Restriktion von Nukleinsäuren in Agaroseblöckchen wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Rebe die dafür notwendigen Voraussetzungen geschaffen und eine partielle BAC-Bank erstellt.

Die zur Verfügung stehenden BAC-Vektoren sind zur Klonierung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von 300-400 Kb geeignet (Frijters et al., 1997). Entsprechend dieser Vorgabe wurden die partiell geschnittenen DNA-Fragmente aus dem Pulsfeldagarosegel isoliert. Für die erfolgreiche Klonierung von großen DNA-Fragmenten ist es essentiell, daß die Enden der Restriktionsfragmente möglichst unversehrt sind. Eine Beschädigung tritt häufig beim Schmelzen und enzymatischen Abbau der Agarose auf und verringert die Ligationseffizienz (Strong et al., 1997). Das Problem wurde durch Elektroelution der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel gelöst. Dafür sollte jedoch eine niedrige Voltzahl gewählt werden, da die langen DNA-Fragmente sonst Schaden nehmen könnten. Aufgrund der Erfahrungen mit hochmolekularer DNA beim Southern-Transfer wurde die Elution auf mindestens 3,5 h ausgedehnt, um auch große DNA-Fragmente vollständig extrahieren zu können. Dennoch blieben DNA-Reste im Agarosegel zurück.

Die durchschnittliche Fragmentgröße einer BAC-Bank hängt von der Größenverteilung der isolierten DNA-Fragmente ab. Zur Berechnung der durchschnittlichen Insertgröße für die partielle BAC-Bank der Rebe wurden nur solche Klone berücksichtigt, deren Insertgröße eindeutig identifiziert werden konnte. Bei einigen BAC-Klonen waren nach der *Not* I Restriktion neben dem Vektorplasmid weitere Banden bis zu einer Größe von 120 Kb im Agarosegel zu beobachten. Ihre Intensität war jedoch schwächer als vergleichbare Banden anderer Klone. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine unvollständige

Restriktion (Birren et al. 1999), die das Ergebnis der Verrechnung verzerren würde. Solche Klone wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Sind in der Probe viele kleine Restriktionsprodukte vorhanden, ligieren diese bevorzugt mit dem Vektor. Das ist der Fall, wenn der Größenbereich im Agarosegel, aus dem die DNA isoliert wurde, zu niedrig angesetzt wurde. Es ist auch eine gekoppelte Wanderung (Komigration) von kleinen und großen DNA-Fragmenten möglich (Frijters et al., 1997; Vinatzer et al., 1998; Birren et al., 1999). Zur Abtrennung der kleinen DNA-Stücke wird eine zweite präparative Elektrophorese durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Comigration der niedermolekularen Bestandteile von der DNA-Konzentration im Agarosegel abhängt. Proben mit niedriger DNA-Konzentration haben weniger kleine Fragmente, die an große DNA-Stücke gekoppelt aufgetrennt werden, so daß möglicherweise nur eine präparative Größenfraktionierung der DNA ausreicht. Verwendet man zur zweiten Auftrennung der DNA jedoch Gele, bei denen alle DNA-Fragmente, die einen bestimmten Größenbereich überschreiten, aus dem Gel ausgeschnitten werden, werden die niedermolekularen Bestandteile nicht zuverlässig entfernt. Außerdem variiert die tatsächliche Größe der DNA im Agarosegel oft erheblich von der anhand des Größenmarkers abgeschätzten Länge der DNA-Fragmente. Daher sollte zur Sicherheit vor der Ligation die präparierte DNA in einem analytischen Gel auf ihre Fragmentgrößenverteilung untersucht werden (Birren et al., 1999).

Die bei der BAC-Klonierung bisher erreichte maximale Fragmentgröße von 350 Kb (Woo et al., 1994; Zhang et al., 1996) ist nur als temporärer Maximalwert zu sehen. Theoretisch ist *E.coli* mit einer Genomgröße von 4,6 Mb als Wirtszelle in der Lage, BAC-Klone bis über 1 Mb zu replizieren (Zhang und Wing, 1997). Möglicherweise ist der limitierende Faktor die Elektroporation von *E. coli* Zellen. Bisher wurden alle publizierten BAC-Banken durch Elektroporation der rekombinanten Plasmide in *E. coli* hergestellt. Daher ist es durchaus denkbar, daß mit Hilfe der  $\text{CaCl}_2$ -Transformation oder der biolistischen Transformation BAC-Banken mit Inserts >350 Kb hergestellt werden können (Woo et al., 1994; Tao und Zhang, 1998).

Die Auswahl an geeigneten Vektorplasmiden zur BAC-Klonierung ist gering. Aktuell stehen dafür nur der in dieser Arbeit verwendete pBeloBAC11 (Kim et al., 1996), die daraus abgeleiteten Derivate pECBAC1 (Frijters et al., 1997) und pBeloBACkan (Mozo et al., 1998) sowie der binäre Vektor BIBAC2 (Hamilton et al., 1996) zur Verfügung. Alle Plasmide haben gemeinsam, daß sie lediglich als „single copy“ in der Wirtszelle vorliegen. Diese Eigenschaft wird als Ursache für ihre gute Stabilität in der Bakterienzelle angesehen (Shizuya, 1992; Kim

et al., 1996). Neuere Arbeiten von Tao und Zhang (1998) mit „low-copy“-Plasmiden (z.B. pGEM11) stellen diese Vorstellung in Frage und haben gezeigt, daß viele herkömmliche Vektorplasmide zur BAC-Klonierung geeignet sind und bis zu einer Größe von 1,2 Mb in *E. coli* repliziert werden können. Die erfolgreiche Transformation und Replikation von großen rekombinanten Plasmiden ist auf Grund der Ergebnisse der Arbeiten von Tao und Zhang (1998) nicht auf die „single copy“-Plasmide zurückzuführen, sondern beruht auf Verbesserungen im Transformationssystem. Möglicherweise spielt auch die Beziehung zwischen dem Plasmid und dem verwendeten Bakterienstamm eine wichtige Rolle. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um das Zusammenspiel zwischen Vektorplasmid, Kopienzahl des Plasmids in der Zelle, Insertgröße, Klonstabilität und Bakterienstamm besser zu verstehen.

#### **4.4 Entwicklung genspezifischer Sonden und Screening der partiellen BAC-Bank**

Zum Durchsuchen der BAC-Klone wurden homologe, genspezifischen DNA-Sonden aus 'Regent' hergestellt. Aus dieser pilzresistenten Neuzüchtung wurden bisher noch keine Gensequenzen isoliert. Daher war es besonders interessant, Teile von Genen, die mit der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht werden oder die für wichtige Enzyme im pflanzlichen Stoffwechselsystem kodieren, zu isolieren. Aus der Analyse von anderen pflanzlichen Genomen ist bekannt, daß viele Resistenzgene nicht gleichmäßig über das Genom verteilt sind, sondern an bestimmten Stellen gehäuft auftreten (Staskawicz et al., 1995). Durch die Hybridisierung mit einer Sequenz aus einem daran beteiligten Gen können der oder die in Frage kommenden Bereiche eingegrenzt werden. Für die Rebe stehen bisher noch keine genomischen Banken zur Verfügung, die zur Isolierung von Gensequenzen verwendet werden konnten. Aus verschiedenen cDNA-Banken der Rebe war es jedoch möglich, Klone zu isolieren, die Gene aus dem Stoffwechselsystem oder an Pathogen- und Stressresistenz beteiligte Gene enthalten (Sparvoli et al., 1994; Syntichaki et al., 1996; Loulakakis et al., 1996; Busam et al., 1997). Die Sequenzinformation aus diesen Arbeiten diente als Grundlage für die Entwicklung spezifischer Primer zur Amplifikation von Teilsequenzen der Gene in 'Regent'. Beim Design der Oligonukleotide mußte jedoch berücksichtigt werden, daß aufgrund des hohen Anteils an nichtkodierender DNA möglicherweise mit größeren Introns zu rechnen ist, die mit der PCR nicht überbrückt werden können. Aus diesem Grund wurden Primerpaare in konservierten Sequenzabschnitten mit maximal 1000 bp Abstand zueinander ausgewählt.

---

Die Methode eignet sich auch zur Identifikation von Gensequenzen, von denen bisher noch keine Informationen aus dem Genom der Rebe vorliegen. So war es möglich, mit Hilfe von Sequenzdaten aus der Zuckerrübe spezifische Primer herzustellen, mit denen partielle Gensequenzen für Enzyme aus dem Zuckerstoffwechsel der Rebe amplifiziert wurden (Zyprian et al., unveröffentlichte Daten).

Die PCR-Reaktion wurde neben 'Regent' auch bei 'Vidal blanc' und den nichtresistenten Sorten 'Riesling' und 'Lemberger' durchgeführt. Bei allen Sorten konnten die entsprechenden Amplifikationsprodukte identifiziert werden. Die Versuche haben gezeigt, daß auch bei anfälligen Rebsorten für Resistenzeigenschaften kodierende Gene vorhanden sind. Möglicherweise werden sie jedoch durch andere Promotoren gesteuert. Hinweise dafür sind bei Kortekamp et al. (1998) zu finden. In ihren Versuchen konnten sie zeigen, daß sowohl pilzanfällige als auch pilzwiderstandsfähige Rebsorten über Mechanismen verfügen, die im Rahmen der Pathogenabwehr bei allen Rebsorten aktiviert werden. Der wesentliche Unterschied zwischen den Rebsorten war jedoch, daß bei den widerstandsfähigen Sorten die Abwehrmechanismen zeitlich schneller erfolgen, was auf eine unterschiedliche Art der Genregulation hinweist.

Bei ersten Hybridisierungsexperimenten mit den entwickelten spezifischen Sonden konnten acht BAC-Klone identifiziert werden, die als Insert DNA aus dem Genom von Chloroplasten besitzen und ein Klon, der ein für Osmotin kodierendes Gen enthält. Insgesamt ist die Zahl der verfügbaren und überprüften Klone jedoch zu gering, um bereits statistisch abgesicherte Aussagen machen zu können. Die relativ geringe Anzahl an Klonen mit Chloroplasten-DNA läßt vermuten, daß die partielle BAC-Bank vorwiegend aus nuklearer DNA besteht. Besonders bei der Verwendung von Protoplasten als Ausgangsmaterial zur Isolierung hochmolekularer DNA wurden in bis zu 14 % der BAC-Klone Inserts aus Plastiden-DNA festgestellt (Woo et al., 1994). Der Anteil solcher Klone war gering, wenn Protoplasten aus jungem Pflanzenmaterial (Lapitan et al., 1997) oder aus Wurzelgewebe isoliert worden waren (Mozo et al., 1998). Die Versuche stehen erst am Anfang und weiterführende Experimente müssen unbedingt mit einer größeren Zahl an Klonen durchgeführt werden, um statistisch abgesicherte Ergebnisse zu erhalten. Für das Auffinden von Genen mit niedriger Kopienzahl ist eine Überprüfung der vollständigen BAC-Bank erforderlich.

#### 4.5 Anwendung der genomischen BAC-Bank zur physikalischen Kartierung

Zur Identifikation von überlappenden BAC-Klonen stehen mehrere unterschiedliche Techniken zur Auswahl.

Die Erstellung von Contigs kann durch einen Vergleich von Restriktionsschnittstellen der einzelnen BAC-Klone, dem sog. BAC-Fingerprinting, erfolgen (Coulson et al., 1986; Olson et al., 1986; Kohara et al., 1987). Idealerweise deckt ein Contig ein komplettes Chromosom ab. Jeder Klon wird dabei mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten, seine Restriktionsprodukte in einem hochauflösenden Agarosegel aufgetrennt und die entstandenen Fingerprints miteinander verglichen. Eine Übereinstimmung im entstandenen Bandenmuster deutet auf einen überlappenden Sequenzabschnitt hin. Für die Herstellung von Fingerprints sollte möglichst das gleiche Restriktionsenzym verwendet werden, das auch bei der partiellen Restriktion der hochmolekularen DNA zur BAC-Klonierung zum Einsatz kam. Damit ist gewährleistet, daß das jeweilige Insert aus dem Vektor komplett ausgeschnitten wird und alle Restriktionsfragmente entweder DNA vom Vektor oder die des Inserts enthalten. Mit anderen Restriktionsenzymen entstehen häufig Fragmente, die gleichzeitig Insert-DNA und Vektor-DNA enthalten. Dabei können unterschiedliche Fragmentgrößen auftreten, obwohl zwei Klone denselben DNA-Abschnitt besitzen, der jedoch nicht als überlappende Bereich identifiziert werden kann (Birren et al., 1999).

Die Ansequenzierung der Insert-DNA in den BAC-Klonen und ein Vergleich der Randsequenzen ist eine weitere Möglichkeit zur Identifikation überlappender Klone (Sterky et al., 1998; Kelley et al., 1999). Die Sequenzierung von BAC-DNA ist jedoch aufwendiger als die Sequenzanalyse von einfachen Plasmiden, da es bei BACs wegen der niedrigen Kopienzahl in der Bakterienzelle schwieriger ist, ausreichend DNA in der für die Sequenzierung erforderlichen Qualität zu bekommen (Birren et al., 1999). Die von Sterky et al. (1998) beschriebene direkte Sequenzierung ermöglicht dagegen eine Analyse ohne aufwendige Reinigung der DNA.

Die physikalische Kartierung von großen Genomen wird häufig mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt (Hanson et al., 1995; Pedersen et al., 1995; Gómez et al., 1997; Lapitan et al., 1997). Die FISH sollte jedoch nur zur Abschätzung von physikalischen Abständen >10 Mb verwendet werden und erlaubt keine Feinkartierung. Sie bietet daher die Möglichkeit, einen groben Überblick über die Zuordnung ausgewählter BAC-Klone zu bestimmten Regionen eines Chromosoms zu gewinnen (Pedersen et al., 1995). Ein hoher Gehalt an repetitiven Sequenzen im Genom überdeckt bei der Detektion besonders

die Fluoreszenzsignale von Genen mit niedriger Kopienzahl und muß daher bei der FISH-Hybridisierung blockiert werden (Lapitan et al., 1997).

Die Effizienz der physikalischen Kartierung wird durch begleitende genetische Kartierungsstudien unterstützt. So können durch Southern-Hybridisierung mit molekularen Markern aus der genetischen Karte als Sonde überlappende Klone identifiziert und gleichzeitig eine Integration von genetischer und physikalischer Karte erreicht werden (Hong, 1997; Primrose, 1998). Dazu ist aber eine sehr umfangreiche und "dichte" genetische Karte erforderlich. Auf dieser Grundlage wurden z.B. physikalische Karten für *Arabidopsis thaliana* (Schmidt, 1998) und Reis (Zhang und Wing, 1997) erstellt. Da das Verhältnis von genetischem zu physikalischem Abstand von der im Genom nicht überall einheitlichen Rekombinationswahrscheinlichkeit abhängt, sollte im Fall der Rebe der genetische Abstand zweier molekularer Marker weniger als 0,5 cM betragen. Zur Zeit beträgt der kleinste Abstand zwischen zwei Markern bei der sich im Aufbau befindlichen genetischen Karte von 'Regent' und 'Lemberger' 2 cM (Zyprian et al., 1999).

#### 4.6 Perspektiven

Unabhängig davon, welche physikalische Kartierungsmethode zum Einsatz kommt, verlangt die Anordnung der Klone zu Contigs die Verarbeitung von großen Datenmengen. Zur Verrechnung der Daten wurden spezielle Algorithmen entwickelt (Zhang, P. et al., 1994). Überraschenderweise sind bis heute nur wenige Arbeiten automatisiert. Während einige Schritte, z.B. die Isolierung hochmolekularer DNA nur schwer automatisiert werden können, lassen sich die Herstellung von Hybridisierungsbibliotheken und die Southern-Hybridisierung leichter maschinell durchführen.

Für ein automatisiertes Screening von umfangreichen genomischen Banken eignet sich besonders das von Hoheisel (1994) beschriebene Oligofingerprinting in Verbindung mit der DNA-Chip Technologie (Lemieux et al., 1998). Dabei werden Oligonukleotide auf jeden einzelnen Klon der Bank hybridisiert und wie bei der Restriktionskartierung ein genetischer Fingerabdruck der BAC-Klone erstellt. Zur Festlegung der Reihenfolge der Klone werden die Hybridisierungsdaten aller Klone miteinander im Computer verrechnet.

Genomische BAC-Banken bestehen aus mehreren zehntausend Einzelklonen. Um das gesamte genetische Material effizient charakterisieren und bearbeiten zu können, werden alle BAC-Klone einer Bank in auf eine Membran in ein Mikroraster übertragen und ihre Plasmid-DNA auf der Oberfläche fixiert. Solche Microarrays bestehen aus bis zu 80 Klonen pro  $\text{cm}^2$  (Scholler et al., 1998) und werden mit speziellen Robotersystemen hergestellt. Nach der

Hybridisierung muß wegen der hohen Probandichte die Detektion der Sonden mit einem hochauflösenden Lesegerät erfolgen. Bei mit  $^{33}\text{P}$  radioaktiv markierten Sonden wird dafür ein Phosphor-Imager verwendet, bei der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen können bis zu vier unterschiedliche Farbsignale mit einer Spezialkamera erfasst werden (Sinclair, 1999).

Mit den damit erstellten physikalischen Karten wird es in Zukunft möglich sein, relativ einfach und schnell biologisch oder züchterisch bedeutsame Gene der Rebe zu isolieren. Vielversprechend sind dabei die Methoden der positionsgestützten Klonierung (positional cloning) und der Klonierung auf der Basis einer genetischen Karte (map based cloning) (Young, 1990; Martin et al., 1993; Zhang, Y. et al., 1994; Grant et al., 1995; Kilian et al., 1997), die bereits erfolgreich bei Pflanzen zur Isolierung von Resistenzgenen eingesetzt wurden. Gerade bei Pflanzen mit einem kleinen Genom, zu denen auch die Rebe gehört, konnten damit große Fortschritte erzielt werden (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995; Song et al., 1995). Aus der genetischen Kartierung der Rebe liegen bereits Marker vor, die mit Resistenzmerkmalen gegen Grauschimmel, Echten und Falschen Mehltau der Weinrebe sowie Beerenreife und Beerengröße korrelieren (Zyprian et al., 1999). Die Marker dienen als Orientierungshilfen in der physikalischen Karte und sind wichtige Markierungspunkte bei der Integration von physikalischer und genetischer Karte. Zur Identifikation der entsprechenden Gene können sie als Sonde zum Screening der BAC-Bank eingesetzt werden und markieren Klone, die den jeweils komplementären Sequenzabschnitt besitzen. Positiv wirkt sich dabei die Kopplung von Resistenzgenen aus (Staskawicz et al., 1995), weil dadurch in einem Arbeitsschritt möglicherweise vollständige Genfamilien oder sogar unterschiedliche Resistenzgene erfasst werden könnten.

Aufgrund der immer noch weiten Abstände in der genetischen Karte sind bei der positionsgestützten Klonierung im Genom der Rebe viele Einzelschritte beim „chromosome walking“ erforderlich. Für die Zukunft ist es vorrangiges Ziel, möglichst viele eng gekoppelte molekulare Marker zu entwickeln, um den Aufwand zur Isolierung eines Gens gering zu halten. Eine BAC-Bank mit großen Inserts kann ebenfalls einen Beitrag zur Reduzierung des Arbeitsaufwandes leisten. Allerdings wirkt sich dabei der hohe Anteil an repetitiven und nicht codierenden Sequenzen der Rebe negativ aus und erschwert die Suche nach DNA-Sequenzen mit geringer Kopienzahl (Pedersen et al., 1995). Die Genisolierung über eine positionsgestützte Klonierung ist bei der Rebe zwar prinzipiell möglich, jedoch unter den aktuellen Ausgangsbedingungen eine zeitintensive und schwierige Aufgabe.

Neben der Isolierung von Resistenzgenen wird in Zukunft die Identifikation von Promotoren an Bedeutung gewinnen. Die Verfügbarkeit einer genomischen Bank leistet dazu

einen wichtigen Beitrag, da in einer Bank, die aus cDNA aufgebaut wurde, keine regulatorischen Sequenzen enthalten sind (Old und Primrose, 1994). Die Isolierung von Promotoren, die dafür verantwortlich sind, daß eine schnelle Pilzabwehrreaktion erfolgt, könnte somit eine neue Basis für die Aktivierung bereits vorhandener Resistenzmechanismen in pilzanfälligen Rebsorten bilden. Die Aktivierung von Genen z.B. über eine induzierbare Signaltransduktion in der Pflanzenzelle würde eine Alternative zur Übertragung von Resistenzgenen auf anfällige Rebsorten darstellen. Derzeit stehen noch keine geeigneten Promotoren aus der Rebe zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden jedoch erste partielle Sequenzen von möglichen Resistenzgenen aus der pilzwiderstandsfähigen Sorte 'Regent' isoliert und sequenziert. Mit Hilfe der genomischen BAC-Bank oder der inversen PCR können die vollständigen Gene mit den dazugehörenden Promotorsequenzen aus dem Genom der Rebe isoliert werden. Über die Methoden des „differential display“ und der „subtractive hybridization“ wird es in Zukunft möglich sein, neue, bisher unbekannte Gene, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind, zu erfassen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit vieler Resistenzgene (Kanazin et al., 1996) besteht eine realistische Chance, die Ergebnisse aus der Genomanalyse und Genisolierung bei anderen Pflanzen familienübergreifend für die Resistenzzüchtung der Weinrebe nutzbar zu machen und mit Hilfe des Gentransfers traditionelle Rebsorten zu verbessern oder neue resistente Sorten zu züchten. Nicht zuletzt wird jedoch die Akzeptanz der neuen Sorten durch die Winzerschaft und die Weinkonsumenten einen entscheidenden Einfluß darauf haben, ob das technisch Machbare auch züchterisch realisierbar sein wird. Angesichts der immer noch ablehnenden Haltung vieler Weintrinker gegenüber der Gentechnik muß die Wissenschaft daher in Zukunft verstärkt durch gezielte Information der Konsumenten über die Chancen aber auch die Risiken gentechnischer Verfahren im Weinbau und in der Rebenzüchtung zu einer objektiven Diskussion der Thematik in der Öffentlichkeit beitragen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur physikalischen Kartierung des Genoms der Weinrebe durchgeführt. Ausgehend von Blattprotoplasten wurde eine Methode zur Präparation hochmolekularer DNA aus der Rebe entwickelt, und die Technik der Pulsfeldgelelektrophorese etabliert. Die isolierte DNA war von hoher Qualität, mit Restriktionsenzymen schneidbar und konnte für Klonierungsexperimente zur Erstellung einer genomischen Bank eingesetzt werden.

Mit Hilfe von selten schneidenden Restriktionsenzymen wurden Megarestriktionsfragmente hergestellt, in Pulsfeldagarosegelen aufgetrennt und zur Charakterisierung auf eine Membran transferiert. Anhand der Southern-Hybridisierung mit einer Sonde für repetitive DNA-Sequenzen wurde ihre Größe bestimmt. Die DNA-Stücke waren maximal 400 Kb lang mit einer Durchschnittsgröße von 200 Kb. Bei einem Verhältnis zwischen genetischem und physikalischem Abstand von 300 Kb / cM deckt der Durchschnitt der Restriktionsprodukte lediglich einen Bereich von weniger als 1 cM ab und ist zu klein, um mit den heute verfügbaren molekularen Markern aus der genetischen Karte eine physikalische Kartierung vorzunehmen. Zum aktuellen Zeitpunkt ist daher die Erstellung einer physikalischen Karte aus BAC-Klonen der Kartierung von Megarestriktionsfragmenten vorzuziehen.

Für die Sorte 'Vidal blanc' wurde aus unvollständig *HindIII* geschnittener hochmolekularer DNA eine genomische BAC-Bank erstellt. Es wurden exemplarisch 800 Klone mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 49 kb isoliert. Der Median der getesteten Stichprobe lag bei 45 kb. Nach der Transformation des kompletten Ligationsansatzes sind ca. 30000 rekombinante BAC-Klone zu erwarten. Die daraus erstellte genomische Bibliothek besteht rechnerisch aus 3 Genomäquivalenten und enthält mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ( $\alpha = 0,05$ ) eine beliebige „single-copy“-Sequenz aus dem Genom der Rebe.

Zum Durchsuchen der partiellen BAC-Bank nach kodierenden Sequenzen und zur Identifikation von überlappenden Klonen wurden genspezifische Sonden aus der Sorte 'Regent' hergestellt. Von besonderem Interesse waren solche Gene der Rebe, deren Produkte mit Resistenzeigenschaften oder Widerstandsfähigkeit gegen Stressfaktoren in Verbindung gebracht werden können (Chitinase, Chalkonsynthase, Osmotin). Zusätzlich wurden Gene aus

dem Zucker-, Stickstoff- und Phenylpropanstoffwechsel bei Pflanzen (Glutaminsynthetase, Glutamatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase, Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase) ausgewählt. Die Amplifikation der Gensequenzen erfolgte mit Hilfe von spezifischen Primern. Die PCR-Produkte wurden kloniert und ihre DNA sequenziert. Der Datenbankabgleich der Sequenzdaten bestätigte, daß alle amplifizierten DNA-Sequenzen einen Abschnitt des jeweiligen Gens enthalten. Eine für Chloroplasten-DNA spezifische Sonde diente zur Identifikation von BAC-Klonen mit eingebauter Plastiden-DNA.

Erste Ergebnisse der Koloniehybridisierung mit 800 Einzelklonen zeigten Hinweise auf acht Klone mit einem Insert aus dem Chloroplastengenom. Die Ergebnisse wurden durch eine PCR-Reaktion mit für Chloroplasten-DNA spezifischen Primern überprüft. Ein Klon enthält eine Sequenz, die zu dem Gen für Osmotin eine hohe Ähnlichkeit aufweist.

## 6. Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W., Meyers, E.W.; Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Arumuganathan, K.; Earle, E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-219.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, J.A. (1987): *Current protocols in molecular biology*. Verlag Wiley & Sons, NY, USA.
- Barlow, D.P.; Lehrach, H. (1987): Genetics by gel electrophoresis: the impact of pulsed field gel electrophoresis on mammalian genetics. *Trends in Genetics* 3, 167-171.
- Barnes, W.M. (1994): PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2216-2220.
- Bellis, M.; Gerard, A.; Charlieu, J.P.; Marcais, B.; Brun, M.E.; Viegas-Pequignot, E.; Carter, D.A.; Roizes, G. (1991): Construction and characterization of a partial library of yeast artificial chromosome from human chromosome 21. *DNA Cell Biol.* 10, 301-310.
- Bent, A.F.; Kunkel, B.N.; Dahlbeck, D.; Brown, K.L.; Schmidt, R.L.; Giraudat, J.; Leung, J.L.; Staskawicz, B.J. (1994): RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265, 1856-1859.
- Binding, H.; Nehls, R. (1977): Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 101, 119-130.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979): A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7 (6), 1513-1523.
- Birren, B.; Manchino, V.; Shizuya, H. (1999): Bacterial artificial chromosomes. In: Birren, B. (ed): *Genome analysis: a laboratory manual*. Vol 3: Cloning systems. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, USA.
- Boehringer Mannheim (1993): *Guide to genome analysis and mapping*. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (aktuelle Anschrift: Roche Diagnostics, Mannheim).
- Böhm, A. (1995): Differenzierung von gleich großen, scheinbar identischen Amplifikationsprodukten aus verschiedenen Reben. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.

- 
- Böhm, A.; Zyprian, E. (1998): RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant retrotransposons. *Plant Cell Rep.* 17, 415-421.
- Bouchez, D.; Camilleri, C. (1998): High molecular weight DNA extraction from *Arabidopsis*. In: Martinez-Zapater, J. (ed) *Methods in Molecular Biology 82: Arabidopsis protocols*. Humana Press, UK.
- Bullock, W.O.; Fernandez, J.M.; Short, J.M. (1987): XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with betagalctosidase selection. *Biotech* 5, 376-378.
- Burke, D.T.; Carle, G.F.; Olson, M. (1987): Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812.
- Burmeister, M.; Monaco, A.P.; Gillard, E.F.; van Ommen, L.M.; Lehrach, H. (1988): A 10-megabase map of human Xp21, including the duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 2, 189-202.
- Busam, G.; Kassemeyer, H.; Matern, U. (1997): Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.* 115, 1029-1038.
- Büscher, N. (1995): Entwicklung molekularer Marker für die Weinrebe (*Vitis sp.*). Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Cai, L.; Taylor, J.F.; Wing, R.A.; Gallagher, D.S.; Woo, S.S.; Davis, S.K. (1995): Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 29, 413-425.
- Carle, G.F.; Frank, M.; Olson, M.V. (1986): Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232, 65-68.
- Cheung, W.Y.; Gale, M.D.E. (1990): The isolation of high molecular weight DNA from wheat, barley and rye for analysis by pulsed field gel electrophoresis. *Plant Mol. Biol.* 14, 881-888.
- Christoff, M. (1929): Cytological studies on some species of *Vitaceae*. *Bull. Soc. Bot. Bulgarie* 3, 279-283; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Chu, G.; Vollrath, D.; Davis, W. (1986): Separation of large DNA molecules by contour clamped homogeneous fields. *Science* 234, 1582-1585.

- 
- Clarke, L.; Carbon, J. (1976): A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-99.
- Collins, F.S. (1988): Chromosome jumping. In: Davies, K.E. (ed) *Genome analysis. A practical approach*. IRL-Press, UK.
- Coulson, A.; Suston, J.; Brenner, S.; Karn, J. (1986): Towards a physical map of the genome of the nematode *Caenorhaditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7821-7825.
- Danesh, D.; Penuela, S.; Mudge, J.; Denny, R.L.; Nordstrom, H.; Martinez, J.P.; Young, N.D. (1998): A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theor. Appl. Genet.* 96, 196-202.
- Demesure, B.; Sodzi, N.; Petit, R.J. (1995): A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4, 129-131.
- Devos, K.M.; Vercruyse-Dewitte, D. (1989): Preparation of plant DNA for separation by pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 10, 267-268.
- Dorsey, M.J. (1914): Pollen development in the grape with special reference to sterility. *Bull. Agric. Exp. Sta. Univ. Minn.* 144; zitiert nach Haas, U.J. (1996): *Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (Vitis sp.)*. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Dunford, R.; Vilageliu, L.; Moore, G. (1993): Stabilisation of a yeast artificial chromosome containing plant DNA using a recombinant deficient host. *Plant Mol. Biol.* 21, 1187-1189.
- Dunham, I.; Sargent, C.A.; Trowsdale, J.; Campbell, R.D. (1987): Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed field electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7237-7241.
- Fan, J.B.; Chikashige, Y.; Smith, C.L.; Niwa, O.; Yanagida, M.; Cantor, C.R. (1988): Construction of a *Not I* restriction map of the fission yeast *S. pombe* genome. *Nucl. Acids Res.* 17, 2801-2818.
- Flavell, R.B. (1980): The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 569-596.
- Flavell, R.B.; Dean, C.; Moore, G. (1993a): Exploiting plant genomes, small and large. In: Heslop-Harrison, J.S.; Flavell, R.B. (eds): *The chromosome*. BIOS Scientific Publishers, UK.

- 
- Flavell, R.B.; Gale, M.D.; O'Dell, M.; Lucas, H.; Murphy, G.; Moore, G. (1993b): Molecular organization of genes and repeats in the large cereal genomes and implications for isolation of genes by chromosomal walking. In: Chandley, A. and Sumner, A. (eds): Chromosomes today, Vol. 11. Chapman and Hall, London.
- Foster, G.D.; Twell, D. (1997): Plant gene isolation. John Wiley & Sons, UK.
- Frearson, E.; Power, J.B.; Cocking, E.C. (1973): The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Develop. Biol.* 33, 130-137.
- Frijters, A.C.J.; Zhang, Z.; van Damme, M.; Wang, G.L.; Ronald, P.C.; Michelmore, R.W. (1997): Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoRI* and *HindIII* fragments of lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 94, 390-399.
- Ganal, M. (1996): Isolation and analysis of high-molecular weight DNA from plants. In: Nonmammalian genomic analysis: a practical guide. Academic Press.
- Ganal, M.W.; Tanksley, S.D. (1989): Analysis of tomato DNA by pulsed field gel electrophoresis. *Plant Molecular Biology Rep.* 7 (1), 17-21.
- Ganal, M.W.; Young, N.D.; Tanksley, S.D. (1989): Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the *Tm-2a* region of chromosome 9 in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 215, 395-400.
- Gash, A.; Aoyama, T.; Foster, R.; Chua, N.-H. (1992): Gene isolation with the polymerase chain reaction. In: Koncz, C.; Chua, N.-H.; Schell, J. (eds): *Methods in Arabidopsis research*. World Scientific, UK.
- Gemmill, R.M. (1991): Pulsed field gel electrophoresis. In: *Advances in Electrophoresis 4*. VCH Weinheim.
- Gómez, M.L.; Islam-Faridi, M.N.; Woo, S.S.; Schertz, K.F.; Czeschin Jr, D.; Zwick, M.S.; Wing, R.A.; Stelly, D.M.; Price, H.J. (1997): FISH of a maize sh2-selected sorghum BAC chromosome of *Sorghum bicolor*. *Genome* 40, 475-478.
- Grant, M.R.; Godiard, L.; Straube, E.; Ashfield, T.; Lewald, J.; Sattler, A.; Innes, R.W.; Dangl, J.L. (1995): Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269, 843-846.
- Grant, S.G.; Jessee, J.; Bloom, F.; Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4645-4649.

- 
- Green, E.D.; Riethman, H.C.; Dutchik, J.E.; Olson, M.V. (1991): Detection and characterization of chimaeric yeast artificial chromosome clones. *Genomics* 11, 658-669.
- Guidet, F.; Langride, P. (1992): Megabase DNA preparation from plant tissue. *Methods in Enzymology* 216, 3-12.
- Guzman, P.; Ecker, R. (1988): Development of large DNA methods for plants: molecular cloning of large segments of Arabidopsis and carrot DNA into yeast. *Nucl. Acids Res.* 16 (23); 11091-11105.
- Haas, H.U.; Budahn, H.; Alleweldt, G. (1994): In situ hybridization in *Vitis vinifera* L. *Vitis* 33, 251-252.
- Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Hamilton, C.M. (1997): A binary BAC system for plant transformation with high molecular weight DNA. *Gene* 200, 107-116.
- Hamilton, C.M.; Frary, A.; Lewis, A.; Tanksley, S.D. (1996): Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9975-9979.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hanson, R.E.; Zwick, M.S.; Choi, S.; Islam-Faridi, M.N.; McKnight, T.D.; Wing, R.A.; Price, H.J.; Stelly, D.M. (1995): Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* 38, 646-651.
- Hatano, S.; Yamaguchi, I.; Tsutsumi, N.; Hirai, A. (1995): Polymorphism of nuclear DNA from various rice cultivars as detected by staining of gels after pulsed field gel electrophoresis. *Breeding Science* 45, 205-209.
- Hatano, S.; Yamaguchi, J.; Hirai, A. (1992): The preparation of high molecular weight DNA from rice and its analysis by pulsed field gel electrophoresis. *Plant Science* 83, 55-64.
- Ho, M.F.; Monaco, A.P. (1995): PFGE in physical mapping. In: Monaco, A. (ed) Pulsed field gel electrophoresis. A practical approach. IRL-Press, UK.
- Hoheisel, J.D. (1994): Application of hybridization techniques to genome mapping and sequencing. *Trends in Genetics* 10 (3), 79-83.

- 
- Hong, G. (1997): A rapid and accurate strategy for rice contig map construction by combination of fingerprinting and hybridization. *Plant Mol. Biol.* 35, 129-133.
- Hoos, G. (1988): Untersuchungen über den Metabolismus von Stilbenen an Zellkulturen von *Vitis*. Dissertation Universität Karlsruhe.
- Humphreys, M.W.; Pasakinskiene, I.; James, A.R.; Thomas, H. (1998): Physically mapping quantitative traits for stress-resistance in the forage grasses. *Journal of Experimental Botany* 49, 1611-1618.
- Ioannou, P.A.; Amemiya, C.T.; Garnes, J.; Kroisel, P.M.; Shizuya, H.; Chen, C.; Batzer, M.A.; de Jong, P.J. (1994): A new bacteriophage P1 derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics* 6, 84-89.
- Ishihara, H.; Shikita, M. (1990): Electroblotting of double-stranded DNA for hybridization experiments: DNA transfer is complete within 10 minutes after pulsed field gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 184, 207-212.
- Kanazin, V.; Marek, L.F.; Shoemaker, R.C. (1996): Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11746-11750.
- Kelley, J.M.; Field, C.E.; Craven, M.B.; Bocskai, D.; Kim, U.J.; Rounsley, S.D.; Adams, M.D. (1999): High throughput direct end-sequencing of BAC clones. *Nucl. Acids Res.* 27, 1539-1546.
- Kilian, A.; Chen, J.; Han, F.; Steffenson, B.; Kleinhofs, A. (1997): Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *Rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol. Biol.* 35, 187-195.
- Kim, U.J.; Birren, B.W.; Slepak, T.; Mancindo, V.; Boysen, C.; Kang, H.L.; Simon, M.I.; Shizuya, H. (1996): Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34, 213-218.
- Kobel, F. (1929): Die cytologischen und genetischen Voraussetzungen für die Immunitätszüchtung der Rebe. *Der Züchter* 1 (7), 197-202; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Kohara, Y.; Akiyama, K.; Isono, K. (1987): The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* 50, 495-508.

- 
- Kortekamp, A.; Wind, R.; Zyprian, E. (1998): Investigation of the interaction of *Plasmopara viticola* with susceptible and resistant grapevine cultivars. *J. of Plant Diseases and Protection* 105 (5), 475-488.
- Kraeva, E.; Deloire, A.; Romieu, C.; Terrier, N.; Sauvage, F.X.; Tesniere, C.M. (1996): Übermittelte DNA-Sequenz an die NCBI-Datenbank. (Accession No. U68144).
- Lahaye, T.; Rueger, B.; Toepsch, S.; Thalhammer, J.; Schulze-Lefert, P. (1996): Detection of single copy sequences with Digoxigenin labeled probes in a complex plant genome after separation on pulsed field gels. *BioTechniques* 21, 1067-1072.
- Lapitan, N.L.V.; Brown, S.E.; Kennard, W.; Stephens, J.L.; Knudson, D.L. (1997): FISH physical mapping with barley BAC clones. *Plant Journal* 11 (1), 149-156.
- Leach, T.J.; Glaser, R.L. (1998): Quantitative hybridization to genomic DNA fractionated by pulsed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids. Res.* 26 (20), 4787-4789.
- Lee, H.; Birren, B.; Lai, E. (1991): Ultraviolet nicking of large DNA molecules from pulsed field gels for Southern transfer and hybridization. *Analytical Biochemistry* 199, 29-34.
- Leister, D.; Berger, A.; Thelen, H.; Lehmann, W.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1997): Construction of a potato YAC library and identification of clones linked to the disease resistance loci *R1* and *Gro1*. *Theor. Appl. Genet.* 95, 954-960.
- Lemieux, B.; Aharoni, A.; Schena, M. (1998): Overview of DNA chip technology. *Molecular Breeding* 4, 277-289.
- Levene, S.D.; Zimm, B.H. (1987): Separations of open-circular DNA using pulsed-field electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4054-4057.
- Levine, J.D.; Cech, C.L. (1989): Low frequency restriction enzymes in pulsed field gel electrophoresis. *Bio/Technology* 7, 1033-1036.
- Libert, F.; Lefort, A.; Okimoto, R.; Womack, J.; Georges, M. (1993): Construction of a bovine genomic library of large yeast artificial chromosome clones. *Genomics* 18, 270-276.
- Link, A.J.; Olson, M. (1991): Physical map of the *S. cerevisiae* genome at 110-kilobase resolution. *Genetics* 127, 681-698.
- Linsmaier, E.M.; Skoog, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18, 100-127.

- 
- Lodhi, M.A.; Daly, M.J.; Ye, G.N.; Weeden, N.F.; Reisch, B.I (1995): A molecular marker-based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38, 786-794.
- Lodhi, M.A.; Reisch, B.I. (1995): Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars and other genera of the vitaceae. *Theor. Appl. Genet.* 90, 11-16.
- Lognonne, J.L. (1993): Introduction to pulsed field gel electrophoresis. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 4, 49-55.
- Loulakakis, K.A. (1997): Genomic organization and expression of an osmotin-like gene in *Vitis vinifera* L. *Vitis* 36 (3), 157-158.
- Loulakakis, K.A.; Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996): Characterization of *Vitis vinifera* glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for the cytosolic enzyme. *Plant Mol. Biol.* 3, 983-992.
- Luro, F.; Laigret, F. (1995): Preparation of high molecular weight DNA from nuclei of woody plants. *BioTechniques* 19 (3), 388-392.
- Marek, L.F.; Shoemaker, R.C. (1997): BAC contig development by fingerprint analysis in soybean. *Genome* 40, 420-427.
- Martin, G.B.; Brommonschenkel, S.H.; Chunwongse, J.; Frary, A.; Ganai, M.W.; Spivey, R.; Wu, T.; Earle, E.D.; Tanksley, S.D. (1993): Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.
- Maule, J. (1997): Physical mapping by pulsed field gel electrophoresis. In: Boulton, J. (ed) *Gene isolation and mapping protocols*. Humana Press, NJ, USA.
- McClelland, M.; Wong, K.K.; Sanderson, K. (1998): Physical mapping and fingerprinting of bacterial genomes using rare cutting restriction enzymes. *Bacterial Genomes*, 253-311.
- Messeguer, R.; Ganai, M.W.; Steffens, J.C.; Tanksley, S.D. (1991): Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation into tomato nuclear DNA. *Plant Mol. Biol.* 16, 753-770.
- Monaco, A.P.; Larin, Z. (1994): YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *TIBTECH* 12, 280-286.
- Mozo, T.; Fischer, S.; Shizuya, H.; Altmann, T. (1998): Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol. Gen. Genet.* 285 (5), 562-570.

- 
- Mullen, J.; Adam, G.; Blowers, A.; Earle, E. (1998): Biolistic transfer of large DNA fragments to tobacco cells using YACs retrofitted for plant transformation. *Mol. Biol.* 4, 449-457.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nakamura, S.; Asakawa, S.; Ohmido, N.; Fukui, K.; Shimizu, N.; Kawasaki, S. (1997): Construction of an 800-kb contig in the near centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta2* using a highly representative rice BAC library. *Mol. Gen. Genet.* 254, 611-620.
- Narayan, R.K.J. (1991): Molecular organisation of the plant genome: its relation to structure, recombination and the evolution of chromosomes. *J. Genet* 70: 43-61.
- National Agricultural Library, USA (1999): Physical maps, Internet-Homepage [www.nal.usda.gov/pgdic/tutorial/lesson.htm](http://www.nal.usda.gov/pgdic/tutorial/lesson.htm).
- Negrul, A.M. (1930): Chromosomenzahl und Charakter der Reduktionsteilung bei den Artbastarden der Weinrebe (*Vitis*). *Züchter* 2 (2), 33-43; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Neil, D.L.; Villasante, A.; Fisher, R.B.; Vetrie, D.; Cox, B.; Tyler-Smith, C. (1990): Structural instability of human tandemly repeated DNA sequences cloned in yeast artificial chromosome vectors. *Nucl. Acids Res.* 18, 1421-1428.
- Nürnbergger, T.; Nennstiel, D.; Hahlbrock, K.; Scheel, D. (1995): Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2338-2342.
- Nürnbergger, T.; Nennstiel, D.; Jabs, T.; Sacks, W.R.; Hahlbrock, K.; Scheel, D. (1994): High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449-460.
- Old, R.W.; Primrose, S.B. (1994): Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. Blackwell Science, Cambridge, MA, USA.
- Olmo, H.P. (1937): Chromosome numbers in the european grape (*Vitis vinifera*). *Cytologia Fujii Jub. Vol. Part II*, 606-613; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.

- Olson, M.V.; Dutchik, J.E., Graham, M.Y.; Brodeur, G.M.; Helms, C.; Frank, M.; MacCollin, M.; Scheinman, R.; Frank, T. (1986): Random-clone strategy for genomic restriction mapping in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7826-7830.
- Patil, S.P.; Patil, V.P. (1992): Karyomorphology of *Vitis vinifera*, *V. rotundifolia* and their hybrid. *Cytologia* 57, 91-95; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Patil, V.P.; Jadhav, A.S. (1985): Karyomorphology of three varieties of *Vitis vinifera*. *Cytologia* 50 (1), 83-88; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Pedersen, C.; Giese, H.; Linde-Laursen, I. (1995): Towards an integration of the physical and the genetic chromosome maps of barley by *in situ* hybridization. *Hereditas* 123, 77-88.
- Poustka, A. (1990): Physical mapping by PFGE. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 1 (2), 204-211.
- Poustka, A.; Lehrach, H. (1986): Jumping libraries and linking libraries: the next generation of molecular tools in mammalian genetics. *Trends in Genetics* 7/1986, 174-179.
- Primrose, S.B. (1998): Principles of genome analysis. 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Science, MA, USA.
- Purrello, M.; Balzas, I. (1983): Direct hybridization of labeled DNA in agarose gels. *Analytical Biochemistry* 128, 393-397.
- Rajyashri, K.R.; Nair, S.; Ohmido, N.; Fukui, K.; Kurata, N.; Sasaki, T.; Mohan, M. (1998): Isolation and FISH mapping of yeast artificial chromosomes (YACs) encompassing an allele of the Gm2 gene for gall midge resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 97, 507-514.
- Reustle, G.; Harst, M.; Alleweldt, G. (1995): Plant regeneration of grapevine (*Vitis* sp.) protoplasts isolated from embryogenic tissue. *Plant Cell Reports* 15, 238-241.
- Reustle, G.M. (1989): Untersuchungen zur Protoplastenkultur und zur somatischen Embryogenese bei Reben. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Sarni-Manchado, P.; Verries, C.; Ageorges, A.; Tesniere, C.M. (1995): Übermittelte DNA-Sequenz an die NCBI-Datenbank. (Accession No. U36586).

- Sax, K. (1929): Chromosome counts in *Vitis* and related genera. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 26, 32-33; zitiert nach Haas, U.J. (1996): Untersuchungen zur Charakterisierung der Rebchromosomen (*Vitis* sp.). Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Schmidt, R. (1998): Physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. Plant Physiol. Biochem. 36 (1-2), 1-8.
- Schmidt, R.; Putterill, J.; West, J.; Cnops, G.; Robson, F.; Coupland, G.; Dean, C. (1994): Analysis of clones carrying repeated DNA sequences in two YAC libraries of *Arabidopsis thaliana* DNA. Plant Journal 5, 735-744.
- Schneider, S.; Reustle, G.; Zyprian, E. (1996): Detection of somaclonal variation in grapevine regenerants from protoplasts by RAPD-PCR. Vitis 35 (2), 99-100.
- Scholler, P.; Heber, S.; Hoheisel, J.D. (1998): Optimization and automation of fluorescence-based DNA hybridization for high-throughput clone mapping. Electrophoresis 19, 504-508.
- Schwartz, D.C.; Cantor, C.R. (1984): Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75.
- Serquen, F.C.; Bacher, J.; Staub, J.E. (1997): Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random amplified polymorphic DNA markers. Molecular Breeding 3, 257-268.
- Shizuya, H.; Birren, B.; Kim, U.J.; Manchino, V.; Slepak, T.; Tachiri, Y.; Simon, M. (1992): Cloning and stable maintenance of 300-kilobasepair fragments of human DNA in *E. coli* using an F-factor based vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8794-8797.
- Short, J.M.; Fernandez, J.M.; Sorge, J.A.; Huse, W.D. (1988):  $\lambda$ Zap: a bacteriophage  $\lambda$  expression vector with *in vivo* excision properties. Nucl. Acids Res. 16, 7583-7600.
- Siedler, H.; Graner, A. (1991): Construction of physical maps of the *Hor1* locus of two barley cultivars by pulsed field gel electrophoresis. Mol. Gen. Genet. 226, 177-181.
- Simske, J.S.; Scherer, S. (1989): Pulsed-field electrophoresis of circular DNA. Nucl. Acids Res. 17 (11), 4359-4365.
- Sinclair, B. (1999): Everything's great when it sits on a chip. A bright future for DNA arrays. The Scientist 13 (11), 18.
- Smith, C.L.; Cantor, C.R. (1987): Purification, specific fragmentation and separation of large DNA molecules. Methods in Enzymology 155 (35), 449-467.

- 
- Smith, C.L.; Econome, J.G.; Schutt, A.; Klco, S.; Cantor, C.R. (1987): A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science* 236, 1448-1453.
- Somssich, I.E. (1997): MAP kinases and plant defence. *Trends in Plant Science* 2 (11), 406-407.
- Song, W.Y.; Wang, L.L.; Kim, H.S.; Kim, L.Y.; Pi, T.; Holsten, B.; Wang, B.; Zhai, W.X.; Zhu, L.H.; Fauquet, C.; Ronald, P. (1995): A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science* 270, 1804-1806.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503.
- Sparvoli, F.; Martin, C.; Scienza, A.; Gavazzi, G.; Tonelli, C. (1994): Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 24, 743-755.
- Staskawicz, B.J.; Ausubel, F.M.; Baker, B.J.; Ellis, J.G.; Jones, J.D.G. (1995): Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667.
- Sterky, F.; Holmberg, A.; Alexandersson, G.; Lundeberg, J.; Uhlen, M. (1998): Direct sequencing of bacterial artificial chromosomes (BACs) and procaryotic genomes by biotin capture PCR. *Journal of Biotechnology* 60, 119-129.
- Strong, S.J.; Ohta, Y.; Litman, G.W.; Amemiya, C.T. (1997): Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed field gel separated partial digests of genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 25 (19), 3959-3961.
- Syntichaki, K.M.; Loulakakis, K.A.; Roubelakis-Angelakis, K.A. (1996): The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. *Gene* 168 (1), 87-92.
- Syring, A. (1997): Verifizierung und Vervollständigung einer physischen und genetischen Karte von *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* DSM7290 durch Zuordnung von *AscI*- und *I-CeuI*-Makrorestriktionsfragmenten. Diplomarbeit Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie, Universität Kaiserslautern.
- Tao, Q.; Zhang, H.B. (1998): Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 Kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors. *Nucl. Acids Res.* 26 (21), 4901-4909.

- 
- Thomas, M.R.; Matsumoto, S.; Cain, P.; Scott, N.S. (1993): Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 86, 173-180.
- van Daelen, A.J.; Jonkers, J.J.; Zabel, P. (1989): Preparation of megabase-sized tomato DNA and separation of large restriction fragments by field inversion gel electrophoresis (FIGE). *Plant Molecular Biology* 12, 341-355.
- Vanhouten, W.; MacKenzie, S. (1999): Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. *Plant Mol. Biol.* 40, 977-983.
- Vinatzer, B.A.; Zhang, H.B.; Sansavini, S. (1998): Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1183-1190.
- Vollrath, D.; Davis, R.W. (1987): Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucl. Acids Res.* 15 (19), 7865-7876.
- Wada, M.; Little, R.D.; Abidi, F.; Porta, G.; Labella, T.; Cooper, T.; Della-Valle, G.; D'Urso, M.; Schlessinger, D. (1990): Human *Xq24-Xq28*: approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 95-106.
- Walker, M.A., Jin, Y. (1998): Breeding *Vitis rupestris* x *Muscadinia rotundifolia* rootstocks to control *Xiphinema index* and fanleaf degeneration. Oral presentation, 7<sup>th</sup> Symposium on grape genetics and breeding, Montpellier.
- Wang, G.L.; Holsten, T.E.; Song, W.Y.; Wang, H.P.; Ronald, P.C. (1995): Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the *XA-21* disease resistance locus. *Plant Journal* 7 (3), 525-533.
- Willems, N.; Skurray, R. (1987): Structure and function of the F-factor and mechanism of conjugation. In: Neidhardt, F.C. (ed) *E. coli* and *S. typhimurium*: cellular and molecular biology, Vol. 2. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- Woo, S.S.; Jiang, J.; Gill, B.S.; Paterson, A.H.; Wing, R.A. (1994): Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucl. Acids Res.* 22 (22), 4922-4931.
- Wu, K.S.; Röder, M.S.; Ganai, M.W. (1992): Isolation of plant DNA for pulsed field gel electrophoresis. In: Burmeister, M; Ulanovsky, L. (eds): *Methods in Molecular Biology* 12: Pulsed field gel electrophoresis. The Humana Press Inc., NJ, USA.

- Wu, K.S.; Tanksley, S.D. (1993): PFGE analysis of the rice genome: estimation of fragment sizes, organization of repetitive sequences and relationships between genetic and physical distances. *Plant Mol. Biol.* 23, 243-254.
- Yang, D.; Parco, A.; Nandi, S.; Subudhi, P.; Zhu, Y.; Wang, G.; Huang, N. (1997): Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4 specific RFLP markers in rice. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1147-1154.
- Young, N.D. (1990): Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 37, 81-94.
- Zhang, H.B.; Choi, S.; Woo, S.S.; Li, Z.; Wing, R.A. (1996): Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Molecular Breeding* 2, 11-24.
- Zhang, H.B.; Wing, R.A. (1997): Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Mol. Biol.* 35, 115-127.
- Zhang, H.B.; Zhao, X.; Ding, X.; Paterson, A.H.; Wing, R.A. (1995): Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant Journal* 7 (1), 175-184.
- Zhang, P.; Schon, A.E.; Fischer, S.G.; Cayanis, E.; Weiss, J.; Kistler, S.; Bourne, P.E. (1994): An algorithm based on graph theory for the assembly of contigs in physical mapping of DNA. *CABIOS* 10, 309-317.
- Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M. (1994): Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zyprian, E. (1998): Molecular markers for grapevine fingerprinting and genetic mapping. Oral presentation, 7<sup>th</sup> Symposium on grape genetics and breeding, Montpellier.
- Zyprian, E.; Fischer, B.; Salakhutdinov, I. (1999): Molecular markers for grapevine fingerprinting and genetic mapping. Oral presentation, Workshop on molecular markers. 3.-4. Juli 1999, Siebeldingen.

## 7. Anhang

```

10      20      30      40      50      60
TCTAGATTAGATGGTGTCCAGCAGGAGGCCAGACCCGAAAAGGCCTTTGGTTGTTGCAGTC 60

70      80      90      100     110     120
CAGGTTGTTGCCATAGCTAACCCCTAAGTATATCACAGTACCTCTTATAGAAACCTATGCG 120

130     140     150     160     170     180
GTCCTGGACCTGAGGAACTACCCCTTTCCCACATTCAACACCTCCATTGATGATGTTTGT 180

190     200     210     220     230     240
CATAACACCAAAACCGGGAAGCCGCCCTGCTGACCTATCTGCACCTGATGGGGTCCATCC 240

250     260     270     280     290     300
TCCTGTGATGACATTATGGCAGGAAGGCTTGGGTGACTGGGGTGTCATCCAGAACCAGAA 300

310     320     330     340     350     360
GGCTGTCTTGAATGATATGACTGCATCTGTTGCTACTAGATCAGGGTTGTTTACCAGGTC 360

370     380     390     400     410     420
TACCCCTATGGCTTTCCCAGCTTGCCCATAGTTGTAGTTGCTGAAATACAAAGGTTATTT 420

430     440     450     460     470     480
GAGATTAATCCATAGTTACCATGAAAGGAACAAGAAAGAATCTGTAAACAGAAGAAGTTT 480

490     500     510     520     530     540
TCGTGTACTTACTAGGAAATCTGTATGGGGCCTCGGCCATAGTATTTCCCTACCAGCGGCA 540

550     560     570     580     590     600
CAAGGCCACTGTGCACTAGGAACACAGTAAGCTCCGGGCTGCCTTGTTCCCTGAAGTAGC 600

610     620     630     640     650     660
AGTATCCCCAAGCGTATGGGCCATCAGGTGCACTAGCCACCCCTGACAAGCATAACCA 660

670     680     690
AATAATCATTCATTAAGGCTTTCATATGCTACT 693

```

**Abb. 17a:** partielle DNA-Sequenz des für eine Chitinase aus 'Regent' spezifischen 820 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
10      20      30      40      50      60
ACCATGGGGTTGTGGGCATTGGTAGCTTTCTGTCTGTTGTCATTAATACTGGTTGGCTCA 60

70      80      90      100     110     120
GCAGAGCAATGTGGAGGGCAAGCTGGGGGTAGAGTTTGCCAGGGGGGGCATGCTGCAGC 120

130     140     150     160     170     180
AAGTTTGGTTGGTGTGGCAACATGCTGATTACTGTGGCAGTGGCTGCCAAAGCCAGTGCA 180

190     200     210     220     230     240
GTTCCACTGGTGACATTGGCCAGCTTATTACCAGGTCCATGTTCAATGATATGCTTAAGC 240

250     260     270     280     290     300
ATAGAAATGAGGGGAGTTGCCCTGGCAAGGGCTTCTACACCTATGACGCTTTCATAGCTG 300

310     320     330     340     350     360
CTGCTAAGGCCTTTCTGGCTTTGGAACAACCTGGTGATAACCACTACTCGTAAAAGGGAAA 360

370     380     390     400     410     420
TCGCAGCCTTCTTGGCTCAAACCTTCTCATGAAACCACTGGTTAGTTTAAGTTAGTATTCA 420

430     440     450     460     470     480
AGTTTGTGTTGTGTTGCTTATTTGATTTTGTGTCATTATGAATGATCAGCTCCAGCCATA 480

490     500     510
TTGATATATCATATTGAGCCATGTGCTCTACCGTTTTCTA 519
```

**Abb. 17b:** partielle DNA-Sequenz des für eine Chitinase aus 'Regent' spezifischen 820 bp großen PCR-Produktes in minus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
TCACCAACAGTGAGCACATGACCGAGTTGAAGGAGAAGTTCAAGCGCATGTGTACGTGCC 60

      70      80      90     100     110     120
TTATTAATGGATTAAATCTGTAATCCTTGTGTTTGTGTTTTTTTTGGTAGGAATGGTATTG 120

     130     140     150     160     170     180
TGCATGGAGCCAATTTTCAGTGCATGGGAAATAGGCGAGTATCTGATACTGATGATGGTTA 180

     190     200     210     220     230     240
TTTGATACTATTTTACCTGGTTTTTACAGGTGAAAAATCCATGATAAACAAACGCATCAT 240

     250     260     270     280     290     300
GCACCTCACTGAAGAAATTTCTCAAGGAGAACCCCAACGTCTGTGCCTACATGGCCCCAT 300

     310     320     330     340     350     360
CTCTTTGATGCCCGTCAAGGACATGGCCGGTGGTTGAAAGTACCAAAGCTTAGGCAAAG 360

     370     380     390     400     410     420
GGAAACCTGCTACCAAGGCCATTCAAAGAATGGGGCCAGCCAAAATCCATAATCACCCA 420

     430     440     450
CTTGGCTTTGCACCACCTTCGGTGTGACAAT 452
```

**Abb. 18a:** partielle DNA-Sequenz des für eine Chalkonsynthese aus 'Regent' spezifischen 750 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
GCAAGTGTCCGTCGATTGCTCCTTCGGAGTCAGGGAGGATGGTCTGAGCCGCGGAGACGA 60

      70      80      90     100     110     120
GCTCGAACAGTGGGCGTTCAATTTTGGTATCCGGGTCTGCGCCAATGATAACGGCAGCTG 120

     130     140     150     160     170     180
CACCATCACCGAAAAGTGCCTGACCCACGAGGGAGTCCAAGTGGGTGTCAGACGGGCCTC 180

     190     200     210     220     230     240
GGAAAGTGACAGCTGTGATTTTCAGAGCAGACGACCAGAACACGAGAGCCGGCGGTTGTTC 240

     250     260     270     280     290     300
CCGGCGAGATCCTTGGCAAGGCGGAGGACGGTGCCACCGGCAAAGCAGCCCTGTTGGTAC 300

     310     320     330     340     350     360
ATCATCAGCCTCTTGACGGATGGGTTTGAGGCCTAGCAGCTTGTTGAGTTGATAGTCAA 360

     370     380     390     400     410     420
GCACCGGGCATGTCAACACCGGAAGGTTGGTGCAAAGACAAGTGGGTGATCTTGATTTG 420

     430     440
GGCTGGCCATCTTGATTGGCCTTGGC 446
```

**Abb. 18b:** partielle DNA-Sequenz des für eine Chalkonsynthese aus 'Regent' spezifischen 750 bp großen PCR-Produktes in minus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
CTGATCGTCCTTAGGGTAGCTATAAGCATCAGGGCACCTAGTCTTGAAAAACCTTGAGTA 60

      70      80      90     100     110     120
ATCTGTAGCACTACAGCTCCCAGAATTGCAACAATATTCATCGGTCTTGAAAACGGTGCA 120

     130     140     150     160     170     180
TGGGTTGTTGCAACCACCGGTAGTCTTTAGCGCAGCGGGGCACTCTCCCACGATGTCGGC 180

     190     200     210     220     230     240
GGTGCAACTTGATGCCACGGGTGCACCCATTGGAAGTAGGATTAAAGGCCATAGGCACAT 240

     250     260     270     280     290     300
TAAATCCATCAACCAAAGATATATCAAAGAAGTCCAAGTTGCTGAATTGGTTAAGTGC GA 300

     310     320     330     340     350     360
ATTCGGCCTAAGGTGTTAGGGGTGTACCATAGGCCGTGCATTGGAGGAGGCCACCACAG 360

     370     380     390     400     410     420
TCCCCCGGTCTCACACTTCCCATTCCCTGATGCATCGAAGTTGCAGTTGGTACGGGCCCA 420

     430     440     450     460     470     480
AACACTGGCCTCCAAGTGGTGCCGGGCATTACATTGAGGCTCCAGGATTGGCCTGAGCC 480

     490     500     510     520     530     540
AAGCTGCATGCCCCCGCCTGGGACTGCCGCAGCCCAAACCGTGTAGGAGCAATGGTTTTG 540

     550
GATGTTGAAGGTGGCTG 557
```

**Abb. 19:** vollständige DNA-Sequenz des für Osmotin aus 'Regent' spezifischen 557 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
TCATTGCATCCAAACAGGTGGTACAAGCAACAGTTCTAGACATCCTTTGGTTTTGACACT 60

      70      80      90     100     110     120
AAATCCACCAGGGTTTTGAAGTTCTCAGTAGAACTCCCTTTAGGACCAACTGCCCTGTCT 120

      130     140     150     160     170     180
GCAGTCTCTCTTAGGGCTCTCAGATTTTCCCTCAGTTTCTTCCCTTTTTCTTGTGAGAGA 180

      190     200     210     220     230     240
ATTTGATCAAAGCAACTCATTAGCCCACTCTTTGTGAAAACCCACCTTCAATTCTCACT 240

      250     260     270     280     290     300
CCAATCTCCAAACATCCTCCACCATCCTCCCATTGAGCCTTTGGTCCCCAAAAAAGGGC 300

      310     320     330     340     350     360
CTGCAAATCAAGGGTACCCACCGGCCACGCTTTCCACAATGAGTTCCAACCACAATGT 360

      370     380     390     400     410     420
GTTACAAAAGCCCCAACTGCCTCATGTGCTAGGACCTCCGCTTGAGGAGCCCATGGAACC 420

      430     440     450     460     470     480
ACCATTCCGTGCCCTCTGGTCTTCTCCAAGAAACCTTCTGGCAAATGCACCCCTTGCCCTTG 480

      490
TCCCTTAGGACCATATAAA 499
```

**Abb. 20:** vollständige DNA-Sequenz des für UFGT aus 'Regent' spezifischen 499 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

```
      10      20      30      40      50      60
GAGCTGGGTGTGTCTTATGGCTTCCAGAGGATAGTAGTTTCTGCAATCATGGAGGTGACC 60

      70      80      90      100     110     120
ACATAAGGATCCATGTTTGAAGCAGGCCTTCTGTCTCATAAATATCCTTTCCAGCTTTC 120

      130     140     150     160     170     180
TTTGTGTCTCTTCCAACCTCTAATGGAGGCTCCTCGGTTTGCACCTCCCTGTAATCAACCA 180

      190     200     210     220     230     240
CATGTGAAGGACGGATGATCAGCATTCTGGGAAACTTATCCAAATTCCTCGAAAAGAGGGT 240

      250     260     270     280     290     300
GATTTCTGGCTTATGATTCAACTAATTACAAATTCTCAATGCATATGTTAAATCATTGCT 300

      310     320     330     340     350     360
AATAAGCTCCCTAGTTCCTTGCCAAGTTCCTCTATCTATACTCACTTTCTGAATGATTTG 360

      370     380     390     400     410     420
ATCTTCTATTTAATGATGGAAACAGTAATTTTTTACCCATAAGAATGTGTTGATGTCAGC 420

      430     440     450     460     470     480
AAGTTTCATGTCCGGTCCAGTGAGACGGCGTTCATTGCCCTTCCTCCATAAGCTGCAATGT 480

      490     500     510     520     530     540
GTTCTTGTGCTCAGCCCAAGCTTTTTCAATGGCTTTTTTTGATGACTTCAAACCCTCCAT 540

      550     560     570     580     590     600
CATTTCTATCGACCTTGGTGCTGAATTTGTGTGCGCACCCGTTTCATTCAATACCTGTGA 600

      610     620     630
CACACCCCGAAGAAGTTAAATGCAGCCATTT 631
```

**Abb. 21:** partielle DNA-Sequenz des für eine Glutaminsynthetase aus 'Regent' spezifischen 1000 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
TACCACCTCTCTCACCGATGAGTCTTGCTACCCAAGATCCAACATTGCCAAAACCTGAA 60

      70      80      90     100     110     120
AAGTTTTTTTATTTTCCATTTAAATAACCCAACCTTTCTAAGCATCAAGAACAGAAATAGA 120

     130     140     150     160     170     180
AAGGATTTCCAATATTTTACCTGAATAACAAATGTCAAACCTTGATTGACTTCCCATGT 180

     190     200     210     220     230     240
TGCGCAAGTAAAGCTTCAGTTGCGAAAAACAACACCTCGACCAGTTGCAGCCTCCCTACCG 240

     250     260     270     280     290     300
AGGGATCCACCAAGAGCCTAAAAGCCCAAATGGAAATGAAGTCCAAGAACAAGAAACAA 300

     310     320     330     340     350     360
CAGTTACAAATTTTGTATTCTCGACTTCAAAGGGTTTACACAAATCTAAATCATAGATGC 360

     370     380     390     400     410     420
TCGGTTTTTGTGCGAAATACTTACTATTGGCTTTCCAGTCACTACGGCCGGTGAGTGACCA 420

     430
TTGGAATTTGAG 432
```

**Abb. 22a:** partielle DNA-Sequenz des für eine Glutamatdehydrogenase aus 'Regent' spezifischen 1480 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
GGAGAAGAGTCTTCTGATACCTTTTCAGAGAGATCAAGGTTGGAATTCTGGGGTTTTTGT 60

      70      80      90     100     110     120
CATGGGTTCTGTTTGATTCCCGGAATTATTTGTTTATTTATTTTCCTTACTCGGAATCT 120

      130     140     150     160     170     180
TGTTTTTGGTTTTTCATGGCTTGTGTTTGTTCCTGAGAATTTTTTTCCAGAATTTTGATCT 180

      190     200     210     220     230     240
TTTGGTGGTGGTGTGTTAGGTGGAGTGCACGATTCCGAAGGATGATGGAAGTCTGGCGA 240

      250     260     270     280     290     300
CGTATGTGGGGTTCCGTGTGCAGCATGATAATGCTCGTGGGCCCATGAAGGGAGGGATCA 300

      310     320     330     340     350     360
CGATATCACCTGAGGTTTGTGATTCCTGATTCTTTTGTGTTGCTTCCGGATTTTGTCT 360

      370     380     390     400     410     420
GGTTGGTTGCTGAGAAAGTTGGGAATGAAAAGGAGAGATTGAAATTTTGGTTTTGTAGGG 420

      430
TAAGATAAAGCAG 433
```

**Abb. 22b:** partielle DNA-Sequenz des für eine Glutamatdehydrogenase aus 'Regent' spezifischen 1480 bp großen PCR-Produktes in minus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGGCATTGACATTTCCAGTATATTCGAGGCTTCTGTGCGACGCCTCCACCGGTCAT 60

      70      80      90     100     110     120
CTCCACAATAACCTAATGAACAATTCCAAGAGCAAACCTCTTTGAAGCATCTTTAGATTTG 120

     130     140     150     160     170     180
GGTTGGGAGCTTCACTCAAAAAGTTGAGTAACAAACCTCTTGAAGTGAATTTCTCATGGTC 180

     190     200     210     220     230     240
TTTTGGGTTTCAAAAAGTCGGTCACACCAAACCTTCTTGGCTGTCAACAAGCACCAGAAACT 240

     250     260     270     280     290     300
TCAGTAACAAATTCTTTGCTTATATTTCTCATGCATAATGGATTCTAAATGCGAGTATGAT 300

     310     320     330     340     350     360
ATCTGCTTTGAAATGCTTCACTTACCGTCTTCGGTATCTTTTTGGATTCAAATCAAACAC 360

     370     380     390     400     410     420
CAATAATTCCTCGAAGCGCCAGCAATCCTAGCCCCTTCTGCAGCCTGATCACAATTAAGA 420

     430     440     450
CCACAACCTATTAAGATCCTCCAGCAGAAAATTTGG 455
```

**Abb. 23a:** partielle DNA-Sequenz des für eine Alkoholdehydrogenase aus 'Regent' spezifischen 1100 bp großen PCR-Produktes in plus-Orientierung im Vektor pBluescript.

---

```
      10      20      30      40      50      60
GGATCCTGAAGCATGAGGGTATGTGAATTTGCACAAAGTACATCTTAATTTTCAGAGGATT 60

      70      80      90     100     110     120
GCTCATCTTATAAAATGCCCATATGTAACGGACTCTGTTTAACTTTGTGGGTGTATAGGA 120

     130     140     150     160     170     180
TTGTGGAGAGTGTGGGGAGGGTGTGACAGATCTCAAACCAGGAGACCATGTCCTCCCAA 180

     190     200     210     220     230     240
TATTCACCGGAGAGTGCAAGGACTGTGCTCACTGCAAATCAGAAGAAAGCAACCTGTGTG 240

     250     260     270     280     290     300
ACCTCCTCAGGATAAACACTGACAGAGGGGTGATGATCCATGATGGAAAATCAAGATTCA 300

     310     320     330     340     350     360
CCATTAAGGGCAAACCCGTATACCATTTTTGGGAACCTCCACCTTTAGTGAGTACACCGT 360

     370     380     390     400     410     420
TCGTACGTTGGCTGTGTTGCTAAGATCATCCTTGGCCCTCTTGACAAAGTCTGTGTCTA 420

     430     440
GTTGCGGCATCTCACAGGTACAAAAAT 446
```

**Abb. 23b:** partielle DNA-Sequenz des für eine Alkoholdehydrogenase aus 'Regent' spezifischen 1100 bp großen PCR-Produktes in minus-Orientierung im Vektor pBluescript.

PCR-product	similarity with genes	expected value	accession	similarity
chitinase	<i>Vitis vinifera</i> mRNA for chitinase	E = 0,0	Z54234	Identities = 392/394 (99%)
chalcone synthase	<i>Elaeagnus umbellata</i> basic chitinase mRNA	E = 6e <sup>-20</sup>	AF061806	Identities = 94/108 (87%)
	<i>Vitis vinifera</i> CHS mRNA for chalcone synthase	E = 0,0	X75969	Identities = 417/430 (96%)
osmotin-like protein	Mustard mRNA for chalcone synthase (SCHS3)	E = 7e <sup>-28</sup>	X14314	Identities = 159/189 (84%)
	<i>Vitis vinifera</i> mRNA for osmotin-like protein	E = 0,0	Y10992	Identities = 540/557 (96%)
UFGT	<i>Quercus suber</i> mRNA for an osmotin-like protein	E = 7e <sup>-10</sup>	AJ000692	Identities = 107/131 (81%)
	<i>Vitis vinifera</i> UDP glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase precursor mRNA, complete cds	E = 0,0	AF000372	Identities = 492/500 (98%)
glutamine synthetase	<i>Vigna mungo</i> UF3GaT mRNA for flavonoid 3-O-galactosyltransferase, complete cds	E = 2e <sup>-13</sup>	AB009370	Identities = 83/97 (85%)
	<i>Vitis vinifera</i> mRNA for cytosolic glutamine synthetase	E = 7e <sup>-75</sup>	X94320	Identities = 150/152 (98%)
glutamat dehydrogenase	<i>Phaseolus vulgaris</i> mRNA (pR-2) for glutamine synthetase	E = 4e <sup>-33</sup>	X04002	Identities = 113/126 (89%)
	<i>Vitis vinifera</i> mRNA for NADH glutamate dehydrogenase	E = 2e <sup>-39</sup>	X86924	Identities = 118/118 (100%)
alkohol dehydrogenase	<i>N.plumbaginifolia</i> mRNA for NADH glutamate dehydrogenase	E = 0,002	Y08292	Identities = 48/56 (85%)
	<i>Vitis vinifera</i> alcohol dehydrogenase gene, cds	E = 0,0	U36586	Identities = 428/446 (95%)
	<i>M.domestica</i> Borkh. Granny Smith adh mRNA for alcohol dehydrogenase	E = 6e <sup>-47</sup>	Z48234	Identities = 230/273 (84%)

**Tab. 6:** Auszug aus den Ergebnissen des BLAST-Datenbankgleichs mit den Sequenzen der spezifischen PCR-Produkte.

## **Danke!**

Herrn Prof. Dr. Blaich danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas, den vielfältigen Anregungen und der freundlichen Unterstützung während der Arbeit.

Frau Dr. Zyprian möchte ich für die Betreuung der Arbeit am Institut für Rebenzüchtung, ihre große Hilfsbereitschaft und ihre kritischen Beiträge zu allen Fragen und Problemen bei der Durchführung der Experimente ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Hesemann danke ich sehr für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Herrn Prof. Dr. Weber bedanke ich mich für seine spontane Zusage, als Prüfer der Arbeit mitzuwirken.

Herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. Töpfer für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Rebenzüchtung, den vielen fruchtbaren Diskussionen und seiner fachlichen Unterstützung der Arbeit.

Herrn Dr. Reustle danke ich für die Einführung in die Protoplastentechnik.

Ein dickes Lob und ganz besonders herzlichen Dank den "JuFos" und Mit-Doktoranden Andreas Ehemann, Andreas Kortekamp, Alexandra Syring-Ehemann, Stefan Buck, Birgitta Fischer, Beatrix Bornhoff, Ilkhom Salakhutdinov und Dr. Ludger Hausmann für ihre vielfältigen Unterstützungen.

Vielen Dank allen Mitarbeitern im Labor, besonders Frau M. Schneider, Frau C. Welsch, Frau I. Steck, Frau H. Bennek, Frau U. Scherer, Frau M. Grün, Frau C. Gleich, Herrn R. Wind, Herrn Dr. Bachmann und Herrn A. Preiss sowie der Abteilung *In Vitro* für ihre stete Hilfsbereitschaft, Frau D. Schneider für ihre große Mühe bei allen fototechnischen Arbeiten und Frau U. Müller bei der Lösung der allgegenwärtigen Computerprobleme.

Großen Dank schulde ich der Forschungsgemeinschaft des Deutschen Weinbaus bei der DLG (FDW) und der Gemeinschaft der Förderer und Freunde des Instituts für Rebenzüchtung für die Finanzierung der Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Friederike Knoche, Astrid Forneck und Helga Radic-Miehle, auf deren besondere Unterstützung ich mich immer uneingeschränkt verlassen konnte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich immer in jeder Hinsicht unterstützen.

## Lebenslauf

Name: Andreas Böhm

Geburtstag: 18.04.1969

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: ledig

### Ausbildung:

1976 - 1980 Grundschule in Leinfelden

1980 - 1989 Philipp-Matthäus-Hahn-Gymnasium in Echterdingen

April 1989 Abitur

1989 - 1990 landwirtschaftliches Praktikum

1990 - 1996 Studium der Allgemeinen Agrarwissenschaften  
der Fachrichtung "Pflanze" an der Universität Hohenheim

April 1996 Abschluß als Diplom-Agraringenieur

1996 - 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Bundesanstalt für  
Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Siebeldingen

seit 1996 Doktorand der Universität Hohenheim, Lehrstuhl für Weinbau

### **Erklärung:**

Ich versichere, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Hohenheim, den 18. Januar 2000

(Andreas Böhm)