

Franco Röckel
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof

Färberreben (Teinturiers) sowie rote Farbmutanten weißer Qualitätsrebsorten entstanden durch *VvmybA*-bedingte Mutationen am Beerenfarbgenort



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:
Franco Röckel
Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof
76833 Siebeldingen

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates and completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.julius-kuehn.de Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website www.julius-kuehn.de (see Publications).

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.julius-kuehn.de> Bereich Veröffentlichungen.

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.julius-kuehn.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-051-7
DOI 10.5073/dissjki.2017.007

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons – Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen – 4.0 Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons – Attribution – ShareAlike – 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

Färberreben (Teinturiers) sowie rote Farbmутanten
weißer Qualitätsrebsorten entstanden durch
VvmybA-bedingte Mutationen am Beerenfarblokus

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Franco Röckel

aus

Zweibrücken

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: apl. Prof. Dr. Eva Zyprian

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2017



Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte am Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof in Siebeldingen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Deutschen Weinbau Jahrbuch 2017 (*Deutsches Weinbau Jahrbuch* **68**, 165-170) unter dem Titel „Roter Riesling – Eine Farbmutante des Weißen Rieslings“ veröffentlicht.

Publikation in Vorbereitung:

Röckel, F., Hausmann, L., Cousins, P., Schwander, F. und Töpfer, R. (2017). The red-fleshed phenotype in *Vitis vinifera* L. teinturier grapes is related to a multiple duplication of a 408 bp fragment in the promoter region of *VvmybA1*.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. Ursprünge und Domestikation unserer heutigen Kulturreben.....	1
1.2. `Heunisch Weiß´ und seine bedeutenden Nachkommen	2
1.2.1. `Riesling`Weiß´ und `Riesling Rot´	3
1.2.2. `Elbling Weiß´ und `Elbling Rot´	5
1.2.3. `Räuschling Weiß´ und `Räuschling Rot´	6
1.2.4. `Silvaner Grün´, `Silvaner Blau´ und `Silvaner Rot´	7
1.2.5. `Kerner´ und `Kernling´	8
1.2.6. `Müller-Thurgau Weiß´ und `Müller-Thurgau Rot´	9
1.3. Die Färberreben	10
1.4. Pflanzenpigmente.....	12
1.5. Anthocyan-Biosynthese.....	14
1.6. MYB Transkriptionsfaktoren	16
1.7. Der Beerenfarbokus der Weinrebe.....	17
1.8. Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Material.....	21
2.1.1. Geräte	21
2.1.2. Software / Datenbanken	21
2.1.3. Chemikalien / Kits und Enzyme / Verbrauchsmaterial	22
2.1.4. Pflanzenmaterial.....	23
2.2. Methoden	24

2.2.1. DNA-Extraktion.....	24
2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.2.3. Verwendete Primer zur Analyse der <i>VvmybA</i> -Gene.....	25
2.2.4. SSR-Markeranalyse	27
2.2.5. Sequenzierung von Klonen aus der BAC-Bank von `Riesling Rot´	29
2.2.6. RNA-Extraktion.....	32
2.2.7. cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	32
2.2.8. HPLC-DAD-Analyse der Anthocyane	33
2.2.9. Statistische Auswertungen	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Die Farbmutanten weißbeeriger Qualitätsrebsorten.....	35
3.1.1. Sortenechtheitsüberprüfung	35
3.1.2. Erstellung von homozygoten Selbstungslinien am Farblokus.....	36
3.1.3. Die spezifischen Mutationen am Farblokus	38
3.1.3.1. `Müller-Thurgau Rot´ und `Silvaner Rot´	38
3.1.3.2. `Elbling Rot´	39
3.1.3.3. `Kernling´ und `Räuschling Rot´	40
3.1.3.4. `Riesling Rot´ und `Silvaner Blau´	41
3.1.3.5. Vergleichende Sequenzanalysen.....	45
3.1.3.6. Haplophasenzusammensetzung.....	46
3.1.4. Abstammungsrichtungen.....	47
3.1.5. Genexpressionanalyse des Anthocyan-Biosynthesewegs	49
3.1.6. Anthocyankonzentrationen und -profile	52
3.1.7. Herbstlaubfärbung durch das <i>MybA1b</i> -Allel	53
3.2. Färberreben (Teinturiers)	55
3.2.1. Mutation und Abstammung.....	55
3.2.2. Die Korrelation der Repeat-Anzahl mit der Anthocyanfärbung	60
3.2.2.1. `Teinturier´-Klone	60

3.2.2.2. F ₁ -Nachkommen	62
4. Diskussion	67
4.1. Die Farbmutanten weißbeeriger Qualitätsrebsorten	68
4.1.1. Mögliche Ursachen der <i>VvmybA</i> -bedingten Mutationen	68
4.1.2. Unterscheidungsmerkmale der Farbmutationen	73
4.2. Färberreben (Teinturiers)	75
4.2.1. Die Entstehung der Mutation	75
4.2.2. Auswirkungen auf den Phänotyp	78
5. Zusammenfassung	81
6. Summary	83
Literaturverzeichnis.....	XI
Anhang	XXV
Danksagungen.....	XL

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reife 'Heunisch Weiß'-Traube kurz vor der Lese.....	2
Abbildung 2: Stammbaum der in diesem Projekt untersuchten 'Heunisch'- Nachkommen mit ihren Farbmutanten.	3
Abbildung 3: 'Riesling Weiß' und 'Riesling Rot'.....	4
Abbildung 4: Reife Trauben von 'Elbling Weiß' (links) und 'Elbling Rot' (rechts) im Vergleich.....	6
Abbildung 5: Reife Trauben von 'Räuschling Weiß' (links) und 'Räuschling Rot' (rechts) im Vergleich.....	7
Abbildung 6: Reife Trauben von 'Silvaner Grün' (links), 'Silvaner Blau' (Mitte) und 'Silvaner Rot' (rechts) im Vergleich.....	8
Abbildung 7: Reife Trauben von 'Kerner' (links) und 'Kernling' (rechts) im Vergleich.	9
Abbildung 8: Reife Trauben von 'Müller-Thurgau Weiß' (links) und 'Müller-Thurgau Rot' (rechts; Quelle: Karlheinz Thoma) im Vergleich.....	10
Abbildung 9: Der Phänotyp der Färberreben.	11
Abbildung 10: Struktur der sechs Haupt-Anthocyanidine (Aglykone) des Pflanzenreichs.	13
Abbildung 11: Der Anthocyan-Biosyntheseweg der Weinrebe.	15
Abbildung 12: Die Evolution des Beerenfarblokus nach Pelsy (2010).	18
Abbildung 13: Vorhergesagte VvMYBA-Proteinsequenzen der Weinrebe.	18
Abbildung 14: Schema zum Screening der BAC-Bank, das am Genomics Institute der Clemson University durchgeführt wurde.	30
Abbildung 15: Schematisches Vorgehen zur Selektion von homozygoten Selbstungslinien am Farblokus.....	36
Abbildung 16: Die Mutation von 'Müller-Thurgau Rot' und 'Silvaner Rot'.....	38
Abbildung 17: Die Mutation von 'Elbling Rot'.....	39
Abbildung 18: Die Mutation von 'Kernling' und 'Räuschling Rot'.....	40
Abbildung 19: Die Mutation von 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau'.....	42

Abbildung 20: Schematische Darstellung der beiden Haplophasen am Farblokus von 'Riesling Rot' anhand einer BAC-Sequenzierung.	44
Abbildung 21: Aminosäuresequenz-Alignments der mutierten <i>mybA</i> -Genvarianten.	45
Abbildung 22: Übersicht der kompletten Haplophasen in den untersuchten Farbmутanten anhand Amplikon-Sequenzierungen.	47
Abbildung 23: Bestimmung der Abstammungsrichtungen der untersuchten Farbmутanten.	48
Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der mutierten Allelvarianten durch qRT-PCR in der Beerenhaut vier Wochen nach <i>Véraison</i>	50
Abbildung 25: Genexpressionsanalyse des Anthocyan-Biosynthesewegs durch qRT-PCR in der Beerenhaut vier Wochen nach <i>Véraison</i>	51
Abbildung 26: Anthocyandaten der Beerenfarbmутanten lesereifer Beeren (mindestens 70 °Oe).	52
Abbildung 27: Rote Herbstlaubfärbung der Rebsorten mit <i>MybA1b</i> -Allel.	54
Abbildung 28: Die Mutation der Färberreben.	56
Abbildung 29: Putativer Stammbaum der Färberreben-Ursorte 'Teinturier' sowie der in diesem Projektteil untersuchten Färberreben aus Deutschland.	59
Abbildung 30: Gesamtanthocyane in Blättern sowie <i>VvmybA1</i> - und <i>VvUFGT</i> -Expression drei verschiedener 'Teinturier'-Klone mit ansteigender Repeat-Anzahl.	61
Abbildung 31: Anthocyanprofil in Blättern in Relation zur Expression von <i>VvF3'H</i> und <i>VvF3'5'H</i> drei verschiedener 'Teinturier'-Klone mit ansteigender Repeat-Anzahl.	62
Abbildung 32: Gesamtanthocyane von Beerenhaut, Fruchtfleisch sowie Farbstärke im Most lesereifer Beeren (mindestens 70 °Oe) von 'Teinturier'-Nachkommen mit ansteigender Repeat-Anzahl.	63
Abbildung 33: Relative Expression von <i>VvmybA1</i> und <i>VvUFGT</i> vier Wochen vor und nach <i>Véraison</i> in der Beerenhaut von 'Teinturier'-Nachkommen mit ansteigender Repeat-Anzahl.	65
Abbildung 34: Relative Expression von <i>VvmybA1</i> und <i>VvUFGT</i> vier Wochen vor und nach <i>Véraison</i> im Fruchtfleisch von 'Teinturier'-Nachkommen mit ansteigender Repeat-Anzahl.	66

Abbildung 35: Synthesis-dependent strand annealing (SDSA) und Single-strand annealing (SSA) Pfad der homologen Rekombination als wahrscheinliche Ursachen der gefundenen mutierten *VvmybA*-Allele. 70

Abbildung 36: Modell zum Wirkmechanismus des 408 bp GCE-Elementes. 79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der in diesem Projekt geselbsteten Rebsorten.	23
Tabelle 2: Liste der in diesem Projekt verwendeten Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der <i>VvmybA</i> -Allele.	26
Tabelle 3: Liste der in diesem Projekt verwendeten SSR-Marker zur Genotypisierung und Analyse des Farblokus.	28
Tabelle 4: Übersicht der ungefähren Größe und Position der zwei sequenzierten BAC-Klone und den zum Screening verwendeten SSR-Markern mit der Position auf Chromosom 2 der Referenzsequenz PN40024 (12x).	31
Tabelle 5: Liste der nach der BAC-Sequenzierung entwickelten Primer zum Lückenschluss der einzelnen Contigs.	31
Tabelle 6: Liste der in diesem Projekt zur qRT-PCR verwendeten Primer.	33
Tabelle 7: Genetisches Profil der untersuchten Qualitätssorten sowie deren Farbmутanten.	35
Tabelle 8: SSR-Markerprofil entlang Chromosom 2 der untersuchten Ausgangssorten.	37
Tabelle 9: Überprüfung des in 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' nicht mehr vorhandenen Bereichs (= Deletion) des roten Allels mittels SSR-Markern.	43
Tabelle 10: Haplophasenverteilung am Farblokus und Repeat-Anzahl aller untersuchten 'Teinturier'-Klone sowie der im Zuge dieses Projektes untersuchten Färberreben.	57

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ABRE	<u>A</u> BA- <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement
AMV	<u>A</u> vian <u>M</u> yeloblastosis <u>V</u> irus
BAC	künstliches bakterielles Chromosom (<u>B</u> acterial <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome)
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Proteine
bZIP	basische Region/Leucin Reißverschluss (<u>B</u> asic Leucine <u>Z</u> ipper)
CFU	koloniebildende Einheiten (<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits)
CHI	Chalkonisomerase
Chr	Chromosom
CHS	Chalkonsynthese
CRISPR/Cas	<u>C</u> lustered <u>R</u> egularly Interspaced <u>S</u> hort <u>P</u> alindromic <u>R</u> epeats / <u>C</u> RISPR- <u>a</u> ssociated
DAD	<u>D</u> iode- <u>A</u> rray <u>D</u> etektor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DGR	<u>D</u> eutsche <u>G</u> enbank <u>R</u> eben
DSB	Doppelstrangbruch (<u>D</u> ouble- <u>s</u> trand <u>b</u> reak)
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur (<u>D</u> ouble- <u>s</u> trand <u>b</u> reak <u>r</u> epair)
DW	Trockengewicht (<u>D</u> ry <u>W</u> eight)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay
F3'5'H	Flavonoid-3', 5'-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
F3H	Flavanon-3-Hydroxylase
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3-phosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GCE	<u>G</u> rapevine <u>c</u> olor <u>e</u> nhancer
HD-Zip	Leucin Reißverschluss mit Homöodomäne (<u>H</u> omeodomain-Leucine <u>Z</u> ipper)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
LDOX	Leucoanthocyanidin dioxygenase
LTR	<u>L</u> ong <u>T</u> erminal <u>R</u> epart
MADS-box	Anfangsbuchstaben der Gene, in denen das Sequenzelement zuerst gefunden wurde
MT / OMT	(O)-Methyltransferase(n)
MYB	<u>M</u> yeloblastosis
NHEJ	<u>N</u> on- <u>h</u> omologous <u>e</u> nd <u>j</u> oining
OIV	International Organisation of Vine and Wine
ORF	offenes Leseraster (<u>O</u> pen <u>R</u> eadng <u>F</u> rame)
SDSA	<u>S</u> ynthesis- <u>d</u> ependent <u>s</u> trand <u>a</u> nealing
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
SSA	<u>S</u> ingle- <u>s</u> trand <u>a</u> nealing
SSR	Simple <u>S</u> equene <u>R</u> epart; Mikrosatelitten
TF	Transkriptionsfaktor
UFGT	UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase
VVC	<u>V</u> itis <u>I</u> nternational <u>V</u> ariety <u>C</u> atalogue
WD40	Proteine mit 40 Tryptophan (W) und Asparaginsäure (D) Wiederholungen

1. Einleitung

1.1. Ursprünge und Domestikation unserer heutigen Kulturreben

Das primäre Domestikationszentrum unserer heutigen Kulturreben (*Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera*) dürfte nach bisherigen Erkenntnissen im Gebiet von Transkaukasien (Georgien, Armenien, Aserbaidschan) gewesen sein, das ein Gen- bzw. Mannigfaltigkeitszentrum der Weinrebe darstellt (Alleweldt, 1965). Dies belegen zahlreiche archäologische sowie paleobotanische Funde, wie beispielsweise eine 7000 bis 7400 Jahre alte Amphore aus dem Nordiran (Haji Firuz Tepe) (McGovern, 2003) oder eine aufgegebene Kelteranlage aus Armenien, die auf 4000 v. Chr. datiert wird (Barnard *et al.*, 2011). Vermutlich eroberte die Weinkultur auch von dort aus sukzessive Mesopotamien (3500 v. Chr.), Vorderasien (Israel, Syrien, Libanon 3000 v. Chr.), Nordafrika (Ägypten 3000 v. Chr., Tunesien 800 v. Chr.) sowie letztlich Europa (Griechenland 4000 v. Chr., Italien 1500, bzw. 1000 v. Chr., Frankreich 600 v. Chr.) (Labra *et al.*, 2002; Valamoti, 2015). Wie jedoch der Übergang von der einzigen in Eurasien heimischen Wildrebe (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris*) (Levadoux, 1956) zur Kulturrebe erfolgte, ist unklar. Wohingegen alle heute noch bekannten Wildarten (ca. 30 amerikanische, ca. 40 asiatische und die eurasische *Vitis sylvestris*) getrenntgeschlechtlich sind (Töpfer *et al.*, 2011), wird als ein bedeutender Schritt in der Domestikation der Übergang zur Monözie (Einhäusigkeit, Zwitterigkeit) angesehen (Olmo, 1995). Die Auslese begann dabei wahrscheinlich anhand besonders reichtragender weiblicher Pflanzen, die zusammen mit männlichen Bestäubern in Kultur genommen wurden. Entstand dann zufällig durch eine Mutation ein einhäusiger Blütenstand (vermutlich an einer männlichen Rebe), wurde diese Pflanze dann natürlich bevorzugt vermehrt und entsprechende Nachkommen ausgelesen (Olmo, 1995). Der ausschließlich transkaukasische Ursprung unserer autochthonen Rebsorten wird jedoch jeher bezweifelt, denn schon Bronner (1857) beschrieb, anhand der ampelographischen Begutachtung der wilden Reben des Rheintals, dass die dort vorkommende Population von *Vitis sylvestris* vermutlich die Urform unserer einheimischen Rebsorten darstellten. Deshalb wird heute allgemein angenommen, dass europaweit durch Kreuzungen mit den einheimischen, an klimatische und terrestrische Verhältnisse angepasste, Reben (Vorgang wird als Sekundärdomestikation bezeichnet) unsere heutige Sortenvielfalt entstand (Grassi *et al.*, 2003; Maul *et al.*, 2011; Myles *et al.*, 2011).

1.2. `Heunisch Weiß` und seine bedeutenden Nachkommen

Als zentrale Sorte, die den größten Beitrag zur Entstehung unserer autochthonen Rebenvielfalt leistete, kann `Heunisch Weiß` (siehe Abbildung 1) angesehen werden (Maul *et al.*, 2015). Vermutlich wurde er nach seiner Ankunft im ersten Jahrtausend n. Chr. in Deutschland oder generell in Westeuropa als Massenträger mit großen Beeren zu einer großen Konkurrenz zu den einheimischen Sorten mit kleinen Trauben und Beeren (Maul *et al.*, 2011; This *et al.*, 2006). Durch den verstärkten Anbau stellte `Heunisch Weiß` wahrscheinlich eine zusätzliche, gern gesehene Nahrungsquelle dar und bekam im deutschsprachigen Raum einzigartige Synonyme wie `Bettschisser` (Metzger, 1827), `Laxiertraube` (Babo, 1844) oder `Scheißtraube` (Bock, 1595), die direkt auf eine starke abführende Wirkung hinweisen. Der Wein wurde dabei aber generell als wässrig und säuerlich bezeichnet. Auf dem Weg seiner Wanderung von Osten nach Westen zeugte `Heunisch Weiß` vor allem mit `Pinot` oder in Kombination mit den ansässigen Wildreben über 120 Kinder (Lacombe *et al.*, 2013), von denen einige heute weltweit stark angebaut werden wie z.B. `Chardonnay Blanc` (198.793 ha), `Riesling Weiß` (50.060 ha) oder `Gamay Noir` (32.671 ha) (Anderson & Aryal, 2013). Ein kleiner Ausschnitt des umfangreichen `Heunisch`-Stammbaums mit den in dieser Arbeit untersuchten Sorten des deutschsprachigen Raums ist in Abbildung 2 dargestellt. Schritt für Schritt jedoch verschwand `Heunisch Weiß` aus dem Anbau und wurde durch seine Nachkommen, die eine deutlich bessere Weinqualität zeigten, ersetzt (Maul *et al.*, 2015). So verschwand er zu Beginn des 20. Jahrhunderts nahezu komplett aus dem Weinbau und wurde nur noch in kleiner Menge wie z.B. im Wallis (Schweiz) angebaut (Aeberhard, 2005) oder überlebte vereinzelt in Rebsortimenten. Seit ein paar Jahren jedoch konnten ein paar Flächen im Rheingau sowie in der Pfalz mit `Heunisch Weiß` etabliert werden (Maul *et al.*, 2015).



Abbildung 1: Reife `Heunisch Weiß`-Traube kurz vor der Lese.

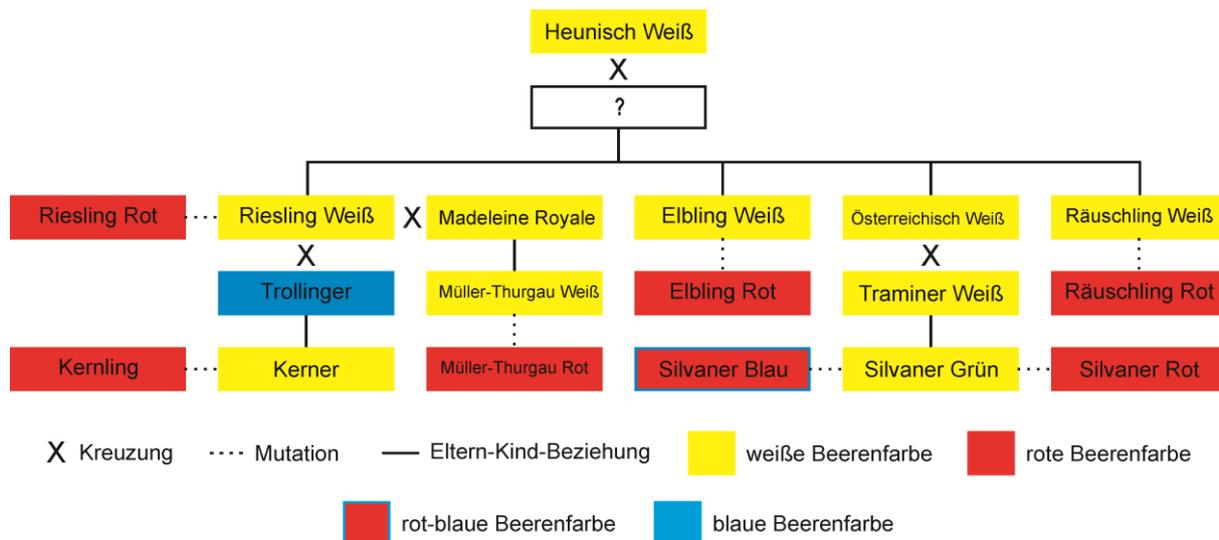


Abbildung 2: Stammbaum der in diesem Projekt untersuchten `Heunisch`-Nachkommen mit ihren Farbmутanten.

1.2.1. `Riesling` Weiß` und `Riesling Rot`

Die erste urkundliche Erwähnung von `Riesling` geht auf eine Kellereirechnung der Grafen von Katzenelnbogen in Rüsselsheim aus dem Jahr 1435 zurück (Staab, 1991). Im Verlauf des 15. Jahrhunderts wurde `Riesling` unter anderem mit den Namen „Rueßelinge“, „Ruesseling“, „Rüszlinge“ oder „Ruszling“ erwähnt, jedoch ist die Herkunft des Namens bis heute unter Fachleuten sehr umstritten. Nach den jüngsten Deutungen des Namensforschers Prof. Dr. Jürgen Udolph lässt sich der Name `Riesling` auf die mit zunehmendem Reifeverlauf stärker sichtbar werdenden „Rußflecken“ (Lentizellen, siehe Abbildung 3B) zurückführen (Udolph, 2016).

Als direkter Nachkomme von `Heunisch Weiß` und vermutlich einem Sämling von `Traminer Weiß` und *Vitis sylvestris* (Regner *et al.*, 1998) wird allgemein angenommen, dass der Ursprung des `Riesling` im Rheintal zwischen Karlsruhe und Worms liegt (Babo, 1844). Mit 23.596 ha bestockter Rebfläche (23 % Anteil an der Gesamtrebfläche, Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017) stellt `Riesling Weiß` die meistangebaute Rebsorte Deutschlands dar, die auch grenzübergreifend weltweit Bekanntheit erlangte. Über die Herkunft hingegen von `Riesling Rot` (siehe Abbildung 3A) ist nichts bekannt, jedoch ist davon auszugehen, dass auch er schon im späten Mittelalter im Mischsatz zusammen mit anderen Rebsorten stand. Generell war der Anbau vor der Reblauskrise gering, so dass nach der Umstellung auf reinsortige Weinberge aus unbekanntem Gründen `Riesling Rot`

komplett aus dem Anbau verschwand. Das Potenzial dieses Farbklaus wurde jedoch schon früh erkannt, denn so schrieben schon Babo & Metzger (1851) „Es wäre wünschenswert, dass man dieser Spielart mehr Aufmerksamkeit schenkte, indem zu erwarten steht, dass dieselbe wichtig für die Weinkultur werden könnte“.

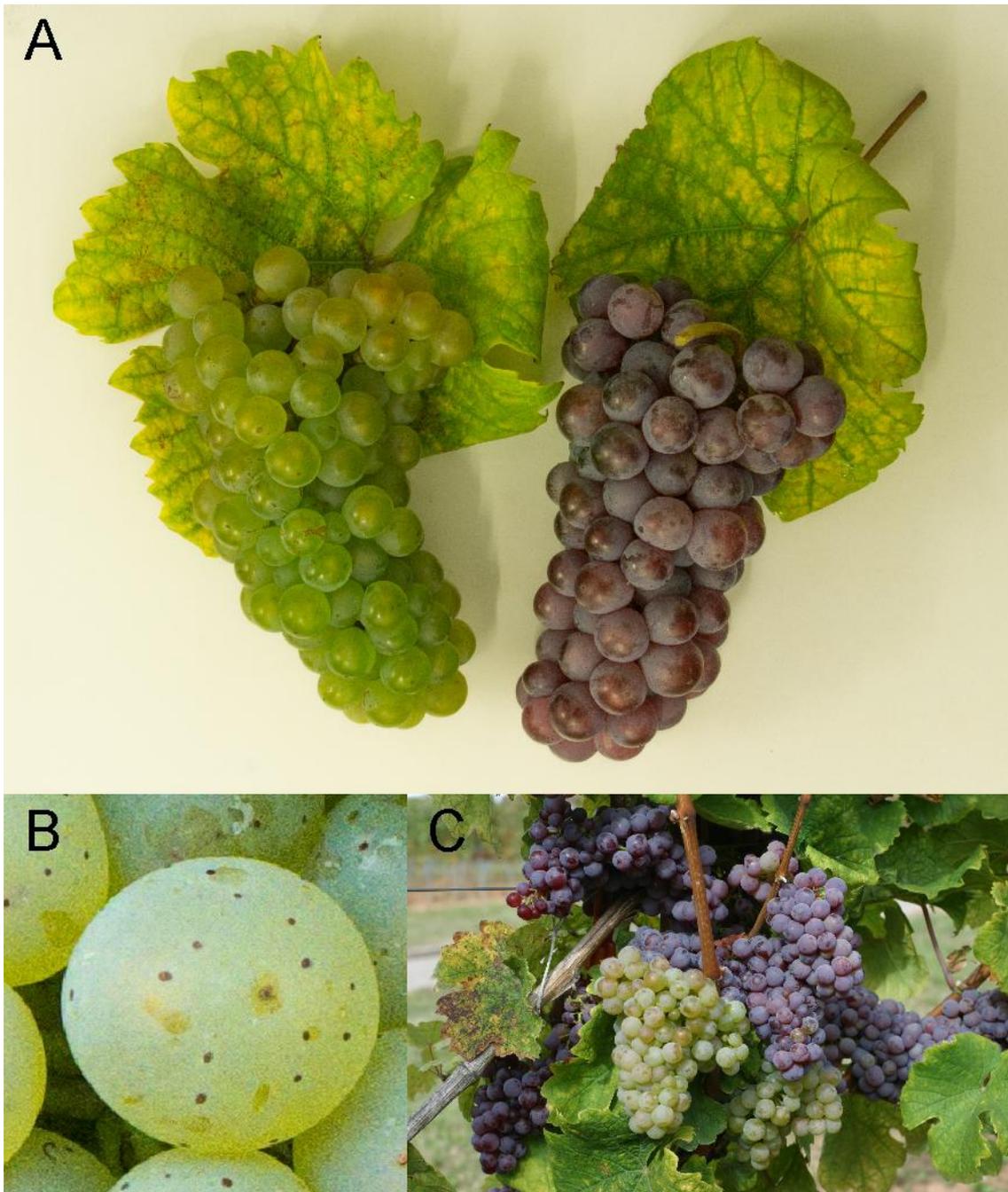


Abbildung 3: `Riesling Weiß` und `Riesling Rot`. (A) Reife Trauben von `Riesling Weiß` und `Riesling Rot` im Vergleich. (Quelle: Ludger Hausmann). (B) Reife `Riesling Weiß`-Beere mit deutlich sichtbaren Lentizellen. (C) `Riesling Rot` mit zwei mutierten weißen Trauben an einer Fruchtrute.

Wie viele andere Sorten ohne praxisrelevante Anbaufläche überlebte `Riesling Rot` in den deutschen Rebsortimenten, wo man im Fachgebiet Rebenzüchtung in

Geisenheim 1991 mit der erhaltungszüchterischen Bearbeitung begann, so dass unter anderem, durch viele zwischenzeitliche Funde einzelner Stöcke in alten Weinbergen, die Klonvielfalt erhöht werden konnte. Seit 2002 erfolgt der verstärkte Anbau wieder in der Praxis und führte zur Klassifizierung in den Anbaugebieten Sachsen und Saale-Unstrut sowie in den hessischen Anbaugebieten Rheingau und Hessische Bergstraße. Aufgrund der großen Nachfrage seitens der Winzer, 'Riesling Rot' als Qualitätswein anbauen zu können, wurde auf eine schnelle Anbaueignungsprüfung gedrängt, so dass bis 2018 mit der deutschlandweiten Klassifizierung zu rechnen ist.

Ampelographisch ist 'Riesling Rot' nur durch die rote Beerenfarbe von 'Riesling Weiß' zu unterscheiden (siehe Abbildung 3A). Im Gegensatz zu den meisten Farbmutanten anderer Rebsorten ist die Farbe jedoch nicht komplett stabil, sodass immer wieder weiße Trauben an einem roten Stock zu finden sind (siehe Abbildung 3C). Da dieses Phänomen von den entsprechenden Winzern immer wieder beobachten werden konnte, jedoch nie umgekehrt (d.h. Mutation von weiß nach rot), führte dies zu der Vermutung, dass 'Riesling Rot' die Urform darstellt und 'Riesling Weiß' aus ihm entstand. So wurde aufgrund dieser Hypothese eine Skulptur mit dem Namen „Die Genesis von König Riesling“ am Erlebnispfad Wein und Stein an der Hessischen Bergstraße errichtet, welche die Entstehung von 'Riesling Weiß' an einer 'Riesling Rot'-Traube darstellt.

1.2.2. 'Elbling Weiß' und 'Elbling Rot'

'Elbling Weiß' zählt zu den ältesten Rebsorten Deutschlands und ist, vergleichbar zu 'Riesling Weiß', vermutlich im Rheintal als Kind von 'Heunisch Weiß' und einem Abkömmling von *Vitis sylvestris* mit 'Traminer Weiß'-Erbgut entstanden (Maul, 2005). Die erste Erwähnung, unter dem Namen „Elseser“, geht dabei vermutlich auf das Hofrecht des Schweizer Klosters Engelberg aus dem 13. Jahrhundert zurück (Aeberhard, 2005). Eine definitive Nennung hingegen gibt es im „Kreütterbuch“ von Bock (1595) unter dem Synonym „Albich“ (von lateinisch „*albus*“ = weiß). Der Anbau erfolgte wahrscheinlich in fast allen heutigen deutschen Weinbaugebieten, so dass 'Elbling Weiß' um 1800 ca. drei Viertel und um 1850 noch ca. zwei Drittel der rheinischen Rebflächen ausmachte (Stoltz, 1852). Seit den 1930er Jahren ist der Anbau von 'Elbling Weiß' rückläufig und beträgt in Deutschland heute noch 521 ha

(0,5 % Anteil an der Gesamtrebfläche, Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017). Die morphologisch identische rote Spielart `Elbling Rot` (siehe Abbildung 4) wurde schon von Trummer (1841) und Babo (1844) erwähnt und wird heute noch als Nischensorte mit 13 ha (Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017) in Deutschland angebaut.



Abbildung 4: Reife Trauben von `Elbling Weiß` (links) und `Elbling Rot` (rechts) im Vergleich.

1.2.3. `Räuschling Weiß` und `Räuschling Rot`

Die erste Erwähnung von `Räuschling Weiß` unter dem Synonym „Drutsch“ für das Gebiet um Landau geht auf das „Kreütterbuch“ von Bock (1595) zurück. Vergleichbar zu `Riesling Weiß` und `Elbling Weiß` wird als Ursprung das Rheintal angesehen (Maul, 2005). So besteht eindeutig eine Elternteil-Kind-Beziehung mit `Heunisch Weiß` und das zweite Elternteil war auch hier vermutlich ein Abkömmling von *Vitis sylvestris* mit `Traminer Weiß`-Erbgut. Stark verbreitet war `Räuschling Weiß` ursprünglich in der Schweiz und wird dort heute noch auf ca. 23 ha angebaut. In Deutschland hingegen gibt es bis auf kleinere Reste in Baden und am Oberrhein keine nennenswerten Flächen mehr. Die Herkunft der bis auf die Beerenfarbe identischen Farbvariante `Räuschling Rot` (siehe Abbildung 5) ist unbekannt. Sie wird in keiner der umfangreichen Ampelographien der letzten Jahrhunderte erwähnt, so dass vermutlich von einer neueren Entstehung ausgegangen werden kann. Im Anbau befindet sich `Räuschling Rot` jedoch nicht. Es erfolgt lediglich der Anbau zur

Erhaltung am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof und dem schweizerischen Rebsortiment in Rheinhof.



Abbildung 5: Reife Trauben von 'Räuschling Weiß' (links) und 'Räuschling Rot' (rechts) im Vergleich.

1.2.4. 'Silvaner Grün', 'Silvaner Blau' und 'Silvaner Rot'

Nach neuesten Recherchen geht die Ersterwähnung von 'Silvaner Grün' auf den Prior der Zisterzienserabtei Ebrach Alberich Degen zurück, der schon zwischen 1654 und 1658 in der Weinbergslage „Stein“ 'Silvaner Grün' anpflanzte (Seeliger, 2014). Als Elternsorten konnten anhand einer SSR-Markeranalyse 'Österreichisch Weiß', ein direkter Nachkomme von 'Heunisch Weiß', und 'Traminer Weiß' identifiziert werden (Sefc *et al.*, 1998). Als Ursprungsland wird auch folglich Österreich angenommen (Schmitt & Höllerl, 1999). Aufgrund der großen Beliebtheit von 'Silvaner Grün', vor allem in Franken, stellt diese Sorte heute mit 4977 ha (4,9 % Anteil an der Gesamtrebfläche, Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017) die sechst meistangebaute Sorte in Deutschland dar.

Die Herkunft der beiden bekannten Farbvarianten 'Silvaner Blau' und 'Silvaner Rot' ist weitgehend unbekannt. So beschreibt zwar schon Trummer (1841) die Farbvariante 'Silvaner Rot', die sich nur durch die Beerenfarbe und eine rötliche Herbstlaubfärbung von 'Silvaner Grün' unterscheidet, jedoch ist in den älteren Ampelographien des 19. Jahrhunderts 'Silvaner Blau' nicht als Farbklon, sondern immer als eine eigenständige Sorte aufgeführt. Erst 1964 wurde ein Farbklon, der als

‘Silvaner Blau’ benannt wurde, aus ‘Silvaner Grün’-Beständen selektioniert (Hillebrand *et al.*, 2003). Wann aber ‘Silvaner Blau’ genau entstand und ob er parallel zu ‘Silvaner Rot’ in den früheren Mischsätzen vorkam, ist unbekannt.



Abbildung 6: Reife Trauben von ‘Silvaner Grün’ (links), ‘Silvaner Blau’ (Mitte) und ‘Silvaner Rot’ (rechts) im Vergleich.

1.2.5. ‘Kerner’ und ‘Kernling’

Die weißbeerige Neuzüchtung ‘Kerner’ (siehe Abbildung 7) entstand durch die Kreuzung von ‘Trollinger’ und ‘Riesling’, die 1929 an der LVWO Weinsberg durch den Rebzüchter August Herold durchgeführt wurde (Hillebrand *et al.*, 2003). Anfangs hieß die Sorte noch „weißer Herold“, so dass erst später, in Anlehnung an den Weinsberger Dichter Justinus Kerner, der bis heute gültige Leitname ‘Kerner’ vergeben wurde. Der Sortenschutz und die Eintragung in die Sortenliste erfolgten 1969. Die größte Anbaufläche befindet sich mit 2792 ha (2,7 % Anteil an der Gesamtrebfläche, Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017) in Deutschland, jedoch wird ‘Kerner’ auch in anderen Ländern wie z.B. Japan (357 ha) oder der Schweiz (19 ha) angebaut (Anderson & Aryal, 2015).

Der Farbklon ‘Kernling’ wurde laut eigenen Angaben 1974 von Ludwig Hochdörffer in Nußdorf bei Landau als Farbmutation in einer ‘Kerner’-Rebläche entdeckt und entsprechend vermehrt. Die Endsilbe „ling“ soll dabei auf die Ähnlichkeit des Weintyps zu ‘Riesling’ hindeuten. Der Sortenschutz erfolgte 1991 und die

ausschließlich in Deutschland gelegene Anbaufläche beträgt 18 ha (Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017).



Abbildung 7: Reife Trauben von `Kerner` (links) und `Kernling` (rechts) im Vergleich.

1.2.6. `Müller-Thurgau Weiß` und `Müller-Thurgau Rot`

Die weitere Neuzüchtung `Müller-Thurgau Weiß` stellt hinter `Riesling Weiß` mit 12736 ha Anbaufläche in Deutschland (12,7 % Anteil an der Gesamtrebfläche, Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017) die zweit meistangebaute Sorte dar. Der Ursprung geht auf eine um das Jahr 1882 durchgeführte Kreuzungszüchtung des Züchters Prof. Dr. Hermann Müller, ein Schweizer aus dem Thurgau, zurück. Die ursprünglich angegebene Abstammung von `Riesling` x `Silvaner`, die zu dem heute noch verwendeten Synonym `Rivaner` führte, wurde schon früh bezweifelt (Büscher *et al.*, 1994; Eichelsbacher, 1957). Durch den genetischen Fingerabdruck konnte die tatsächliche Abstammung `Riesling` x `Madeleine Royale` ermittelt werden (Dettweiler & Jung, 2001).

`Müller-Thurgau Rot` (siehe Abbildung 8) wurde 1978 von Christoph Süßle aus Merdingen selektioniert (Thoma, 2015). Nach eigenen Angaben entdeckte er in einer `Müller-Thurgau Weiß`-Anlage an einer Fruchtrute zwei rote Trauben. Anschließend erfolgte eine Vermehrung des mutierten Triebes. Die Beerenfarbe war stabil und zeigte keine Rückmutationen. Ab 2005 begann der Aufbau von Versuchsanlagen für

die Sortenprüfung und Erfassung von Leistungsdaten, so dass 2014 ein Antrag auf Erteilung des Sortenschutzes und der Sortenzulassung beim Bundessortenamt gestellt wurde. Ein großer Vorteil dieses Farbklangs soll eine geringere Botrytisanfälligkeit sein, die eine spätere Lese ermöglicht.



Abbildung 8: Reife Trauben von 'Müller-Thurgau Weiß' (links) und 'Müller-Thurgau Rot' (rechts; Quelle: Karlheinz Thoma) im Vergleich.

1.3. Die Färberreben

Die als Färberreben (französisch Teinturiers) bezeichneten Rebsorten zeichnen sich durch eine mehr oder weniger intensive Rotfärbung des kompletten Habitus aus (Hillebrand *et al.* (2003), siehe Abbildung 9). Im Gegensatz zu klassischen Rotweinsorten, die zur Reife ausschließlich eine gefärbte Beerenhaut besitzen, befinden sich bei den Färberreben Anthocyane auch im Fruchtfleisch. Es konnten zwar mittlerweile auch Klone von klassischen Rotweinsorten wie 'Pinot Noir' und 'Gamay Noir' selektioniert werden, die ein gefärbtes Fruchtfleisch besitzen (entsprechend 'Pinot Teinturier' und 'Gamay Teinturier de Bouze'), jedoch weisen diese Sorten einen deutlich schwächer gefärbten Phänotyp auf und sind mit den ursprünglichen Färberreben nicht näher verwandt.

Die Ursprünge dieser Reben liegen vermutlich an der mittleren Loire, wo sie schon im 17. Jahrhundert in der Gegend von Orléans zum Färben von schwachen Rotweinen angebaut wurden (Galet, 2000). Aufgrund der geringeren Weinqualität der Ursprungsrebe 'Teinturier' begann schon Louis Bouschet 1824 mit der Züchtung

neuer Färberreben mit verbesserter Weinqualität. So entstand durch seine Arbeit die heute noch weltweit angebaute Sorte `Alicante Henri Bouschet` (19.398 ha) (Anderson & Aryal, 2015). In Deutschland begann man im 20. Jahrhundert mit der Züchtung neuer Färberreben, die, wie die Geisenheimer Züchtung `Dakapo`, zum Teil sortenrein als Wein angebaut werden. Die drei meistangebauten Färbersorten in Deutschland sind `Cabernet Mitoš` (311 ha), `Dunkelfelder` (272 ha) und `Dakapo` (54 ha) (Stand 31.7.2015, Deutsches Weinbaujahrbuch 2017).

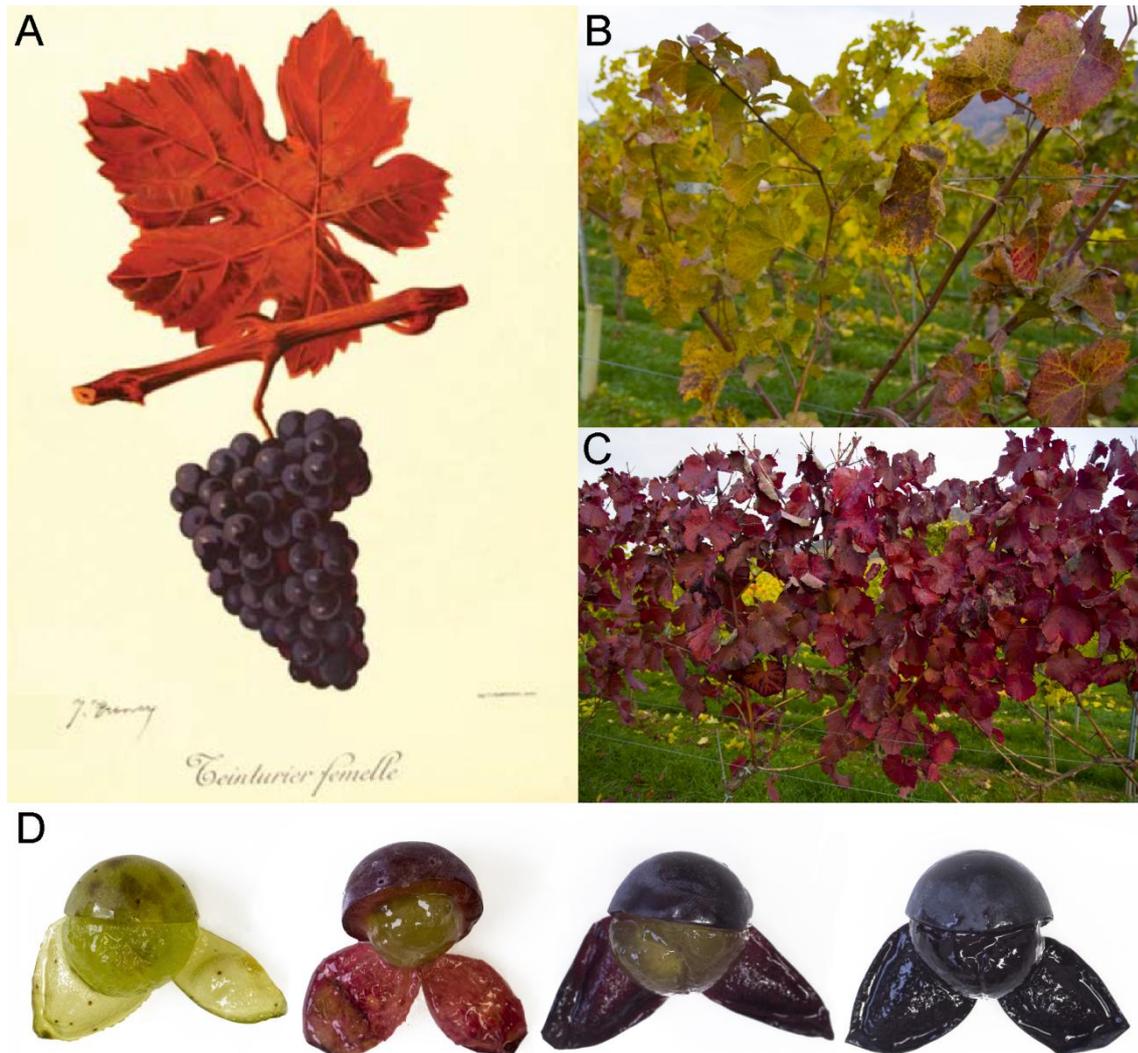


Abbildung 9: Der Phänotyp der Färberreben. (A) Zeichnung der Urfärberrebe `Teinturier` (Synonym `Teinturier femelle`) mit rotem Blatt sowie Holz. (Quelle: Viala & Vermorel (1905)). (B) Gelb / rötlich gefärbtes Herbstlaub der klassischen Rotweinsorte `Pinot Noir`. (C) Rot / violett gefärbtes Herbstlaub der Färberrebe `Cabernet Mitoš`. (D) Verlauf der Beerenfarbintensitäten der Weinrebe. Links beginnend: weißbeerige Sorte (`Riesling Weiß`), rotbeerige Sorte (`Riesling Rot`), klassische Rotweinsorte ohne gefärbtes Fruchtfleisch (`Pinot Noir`), Färberrebe mit gefärbtem Fruchtfleisch (`Teinturier`).

In der Medizin wird das grüne Laub der Weinreben schon seit der Antike zur Behandlung diverser Krankheiten wie z.B. Entzündungen oder Blutfluss aus Wunden

eingesetzt (Schneider, 2007). Zu dieser Zeit waren die Färberreben mit rotgefärbten Laub (siehe Abbildung 9C) jedoch noch nicht bekannt, so dass sie erst seit 1943 (z.B. als Venenmittel) in der Medizin Verwendung fanden. Obwohl man früher davon ausgegangen war, dass die Anthocyane die gesundheitsförderliche Wirkung besitzen würden, führt man die Wirksamkeit heute auf die Flavonoide Quercetin-3-O- β -D-glucuronid, Isoquercitrin (Quercetin-3-O- β -D-glucosid) und Kaempferol-3-O- β -D-glucosid zurück (Schneider, 2007).

1.4. Pflanzenpigmente

Pflanzen produzieren generell mehr als 200.000 verschiedene Arten von Verbindungen, von denen eine Vielzahl pigmentiert ist (Fiehn, 2002). Menschen können das reflektierte oder transmittierte Licht der einzelnen Verbindungen in einem Wellenlängenbereich von 380 bis 730 nm wahrnehmen, wohingegen z.B. Insekten kürzere Wellenlängen detektieren können (Davies, 2009). Eine der Hauptfunktionen der Pflanzenpigmente, die gerade in der Evolution der Pflanzen eine zentrale Rolle einnimmt, ist die Färbung von Früchten und Blüten zur Interaktion mit Bestäubern und Samenverbreitern (Kevan & Baker, 1983). Abgesehen von den Chlorophyllen gibt es drei große Gruppen von Pflanzenpigmenten: Carotinoide, Betalaine und Anthocyane (gehören zu den Flavonoiden), die eine Färbung von gelb / orange bis blau / violett aufweisen können.

Carotinoide sind weitverbreitete fettlösliche Isoprenoide (Grundgerüst ist ein Tetraterpen), die in den Chloroplasten synthetisiert werden und essentielle Funktionen, wie z.B. die Fotoprotektion während der Fotosynthese, besitzen (Green & Durnford, 1996; Niyogi, 2000). So zählt auch die Bereitstellung von Substraten zur Biosynthese von Abscisinsäure (ABA) zu den wichtigen Funktionen (Nambara & Marion-Poll, 2005). Der Biosyntheseweg wurde intensiv untersucht (Cunningham Jr & Gantt, 1998; Howitt & Pogson, 2006), jedoch ist die Regulation auf transkriptioneller Ebene noch nicht völlig verstanden (Sandmann *et al.*, 2006).

Betalaine sind wasserlösliche, stickstoffhaltige Verbindungen, die ausgehend von der Aminosäure Tyrosin durch Kondensation der Betalaminsäure entstehen (Grotewold, 2006). Ihr Vorkommen ist im Pflanzenreich restriktiert auf die Ordnung der Caryophyllales (Nelkenartige), zu denen unter anderem die Rote Bete (*Beta vulgaris*) gehört. Neben den Pflanzen konnte so auch ein Vorhandensein für bestimmte

Lamellenpilze wie z.B. *Amanita muscaria* (Fliegenpilz) nachgewiesen werden (Hinz *et al.*, 1997). Aufgrund einer geringeren pH-Sensitivität sind die Betalaine allgemein stabiler als Anthocyane und weisen dabei ein Farbspektrum von gelb bis rot auf. Die Biosynthese und Lagerung erfolgt in der Vakuole. Da das Vorkommen nur auf eine verhältnismäßig kleine Gruppe von Organismen beschränkt ist und ein wechselseitiger Ausschluss zu den Anthocyanen besteht (Grotewold, 2006), sind die Betalaine, im Gegensatz zu den Carotinoiden und den Flavonoiden, wenig untersucht (Stafford, 1994).

Die Gruppe der Anthocyane (von griechisch „anthos“ = Blume und „kyanos“ = blau) stellt eine in der Natur ubiquitär vorkommende Stoffklasse dar (Kühnau, 1976). Sie zählen zu der sehr großen Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, den Flavonoiden, von denen über 4000 bekannte Verbindungen aus Pflanzen isoliert werden konnten (Macheix & Fleuriet, 1990). Anthocyane sind sowohl in Alkohol als auch in Wasser löslich und weisen ein Farbspektrum von orange / rot bis blau / violett (stark pH-Wert abhängig) auf. Sie konnten schon in allen Pflanzenorganen nachgewiesen werden, jedoch sind sie zumeist in der Zellvakuole in membrangebundenen Anthocyanoplasten lokalisiert (Markakis & Jurd, 1974; Pfannhauser & Riedl, 1983) und erst nach der Einlagerung stabil (Winkel-Shirley, 2001). Ihre Struktur leitet sich chemisch von den Pyriliumsalzen ab (Balaban *et al.*, 1969). Dabei entstehen die eigentlichen Anthocyane durch die Substitution der Anthocyanidine (direkte Vorstufen, siehe Abbildung 10) an der R3 Position (Grotewold, 2006).

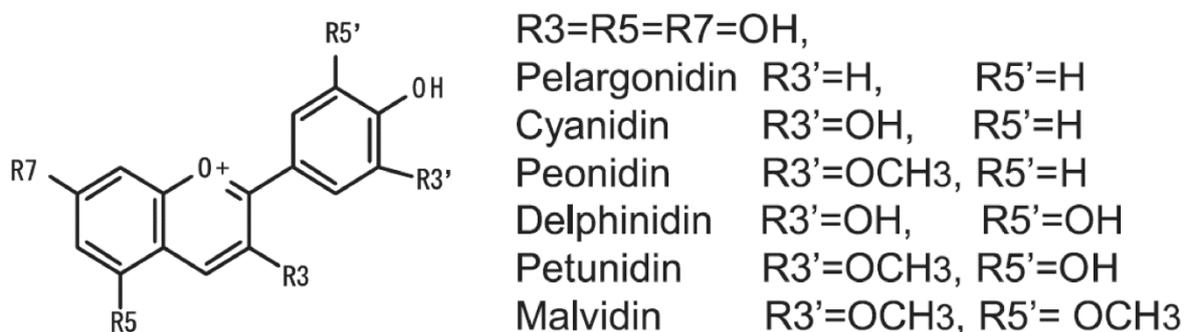


Abbildung 10: Struktur der sechs Haupt-Anthocyanidine (Aglykone) des Pflanzenreichs. Grundgerüst ist das 2-Benzyl-1-benzopyrilium Kation (Flavylium Ion), dessen R3, R5, R7 und R4' Positionen hydroxyliert sind. Die Substitutionen an der R3' und R5' Position des B-Rings bestimmen die einzelnen Anthocyanidine. (Quelle: Tanaka *et al.* (2008), modifiziert).

Die möglichen Substituenten sind dabei meistens Zuckermoleküle wie Glucose, Galaktose, Rhamnose oder Arabinose, jedoch kann das entsprechende

Zuckermolekül auch mit einer pflanzeigenen Säure wie Essigsäure (-acetyl), p-Cumarsäure (-cumaroyl) oder Kaffeesäure (-kaffeeyl) verestert sein (Gerós *et al.*, 2012). So beläuft sich die theoretisch mögliche Anzahl an Anthocyanen der Weinrebe auf ca. 100 verschiedene Verbindungen. Pelargonidin-Derivate konnten innerhalb der Gattung *Vitis* ausschließlich für Abkömmlinge der *Vitis amurensis* oder *Vitis labrusca* nachgewiesen werden, so dass die Anthocyane unserer Kulturreben (*Vitis vinifera*) aus den fünf Anthocyanidinen Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin und Malvidin aufgebaut sind (Wang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2010).

Als eine der Hauptfunktionen der Anthocyane im Pflanzenreich wird die Anlockung von Vögeln (Samenverbreitern) und Insekten (Bestäubern) durch Färbung von Früchten und Blüten angesehen (Harborne, 1976). Weitere Funktionen sind z.B. der Schutz gegen UV-Strahlung (Barber, 1965) oder der Schutz von sauerstoffempfindlichen Verbindungen vor oxidativen Schäden durch entsprechende Redoxeigenschaften (Brouillard & Markakis, 1982). Anthocyane sind für den Menschen aus medizinischer und ernährungsphysiologischer Sicht als unbedenklich eingestuft, da sie weder toxische noch mutagene Eigenschaften besitzen und des Weiteren schon über einen sehr langen Zeitraum von Menschen und Tieren ohne Beschwerden verzehrt werden (Lee & Hong, 1992). So scheinen sie im Gegenteil sogar einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Menschen zu haben. Aufgrund der phenolischen Struktur und der daraus resultierenden Fähigkeit Radikale zu „fangen“, werden den Anthocyanen antioxidative Wirkungen zugesprochen (Chun *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2003). Zusätzlich stehen sie in Verbindung mit antiinflammatorischen Effekten (Mazza *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1997), dem Schutz vor koronaren Herzerkrankungen (Goldberg *et al.*, 1995; Paganga & Rice-Evans, 1997) sowie einer anticancerogenen Wirkung (Kamei *et al.*, 1995; Katsube *et al.*, 2003).

1.5. Anthocyan-Biosynthese

Der Flavonoid-Biosyntheseweg des Pflanzenreichs spaltet sich in drei Zweige auf, die zur Bildung der drei Gruppen, den Flavonolen, den Proanthocyanidinen und den Anthocyanen führen (Czemmel *et al.*, 2012). Die Ausgangsprodukte aller Flavonoide und folglich auch der Anthocyane sind Malonyl-CoA (Malonyl-Coenzym A) und das aktivierte Zimtsäurederivat p-Cumaroyl-CoA (p-Cumaroyl-Coenzym A) (Dixon &

Steele, 1999). In einem einleitenden Schritt bildet die Chalkonsynthase (CHS) aus *p*-Cumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA ein Chalkon-Molekül, das als erstes das strukturgebende C₁₅-Rückgrat besitzt (Boss *et al.* (1996a), siehe Abbildung 11).

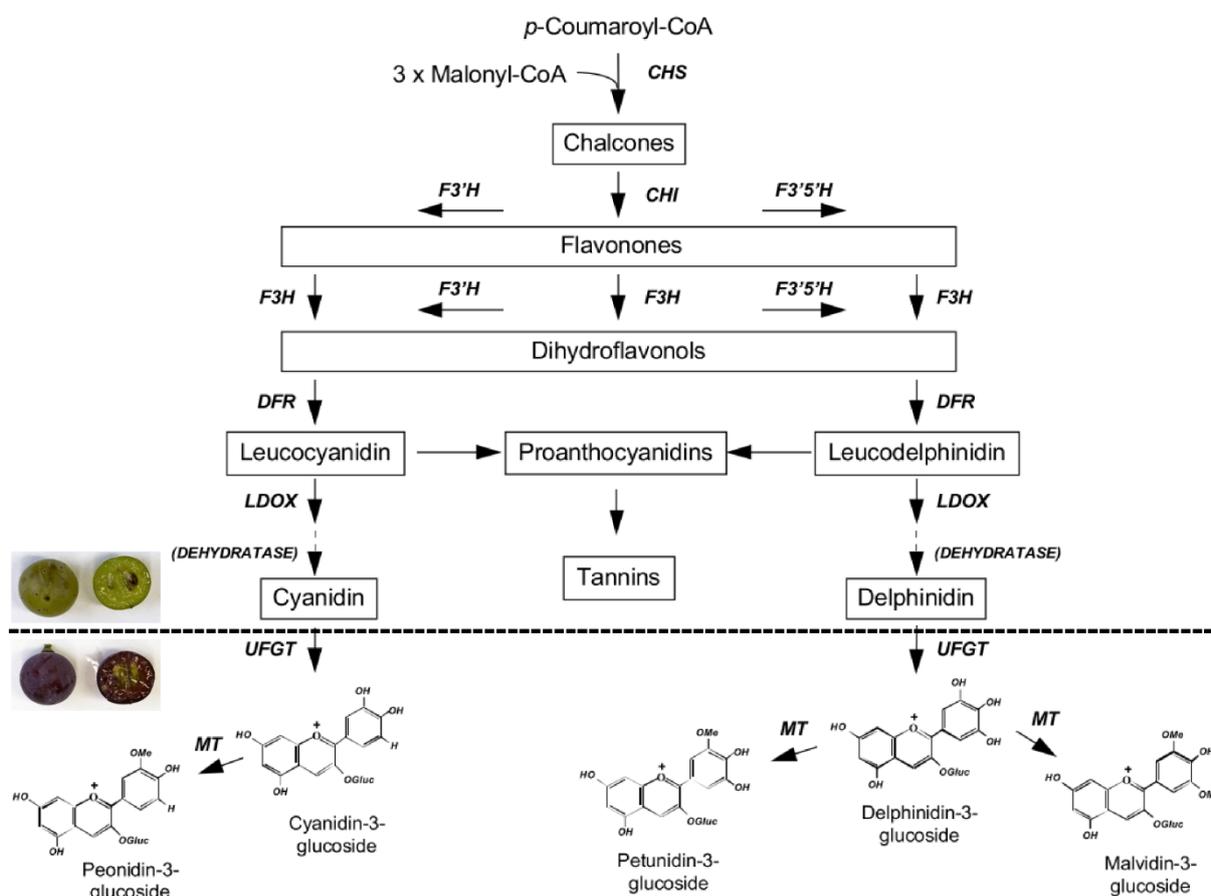


Abbildung 11: Der Anthocyan-Biosyntheseweg der Weinrebe. CHS = Chalkonsynthase; CHI = Chalkonisomerase; F3'H = Flavonoid-3'-Hydroxylase; F3'5'H = Flavonoid-3', 5'-Hydroxylase; F3H = Flavanon-3-Hydroxylase; DFR = Dihydroflavonol-4-Reduktase; LDOX = Leucoanthocyanidindioxygenase; UFGT = UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase; MT = Methyltransferase. (Quelle: Boss *et al.* (1996a), modifiziert).

Die Chalkonisomerase (CHI) katalysiert die Isomerierung zu einem Flavanon (z.B. Naringenin) und anschließend erfolgt die Hydroxylierung zu einem Dihydroflavonol, die jeweils bedingt durch eine Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) oder eine Flavonoid-3', 5'-Hydroxylase entsprechend an der 3'-Position oder an den 3', 5'-Positionen hydroxyliert sein können. Diese Intermediate der Klasse der Dihydroflavonole sind die letzten Zwischenprodukte, die sowohl zur Synthese der Flavonole als auch zur Synthese der Anthocyane sowie Proanthocyanidine führen können (Britsch *et al.*, 1981). Anhand der nachfolgenden Reduktion mittels DFR (Dihydroflavonol-4-Reduktase) und der Dioxygenierung durch das Enzym LDOX (Leucoanthocyanidindioxygenase) entstehen die direkten Vorstufen der Anthocyane,

die, bis einschließlich zu diesem Zwischenschritt, farblos sind. Erst durch die Glykosylierung mittels UFGT (UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase) entstehen die fertigen farbintensiven Anthocyane, die anhand möglicher Methylierungen durch entsprechende Methyltransferasen (MTs) noch weiter aufgespalten werden können (Cyanidin-3-O-glucosid zu Peonidin-3-O-glucosid sowie Delphinidin-3-O-glucosid zu Petunidin-3-O-glucosid und Malvidin-3-O-glucosid). Die heutigen Kulturreben produzieren ausschließlich Anthocyan-3-O-Monoglucoside, da durch multiple Verlustmutationen in den 5GTs (5-Glucosyltransferasen) die Bildung von Anthocyan-3, 5-O-Diglucosiden nicht mehr möglich ist (Yang *et al.*, 2014). So wird das Vorhandensein von Anthocyan-3, 5-O-Diglucosiden im späteren Wein schon lange als diagnostisches Werkzeug zur Erkennung von sogenannten „Hybridweinen“ verwendet, da andere *Vitis*-Arten zur Produktion fähig sind (Würdig & Woller, 1989). Einer der wichtigsten externen Faktoren zur Bildung von Anthocyanen in der Weinrebe ist das Licht, jedoch wirken sich zu hohe Temperaturen und zu viel Licht negativ auf die Bildung der Anthocyane aus (Mori *et al.*, 2007). So nimmt auch die Menge an Anthocyanen in der letzten Phase der Reifung leicht ab, so dass eine Verlängerung der Reifezeit bei farbschwächeren Rebsorten keine zusätzliche Farbe mehr bringt.

1.6. MYB Transkriptionsfaktoren

Generell steuert eine Kombination aus den verschiedensten Klassen von Transkriptionsfaktoren (TFs) die Effizienz, Spezifität und Sensitivität der Transkription eines Organismus (Graw, 2015b). So gibt es eine Vielzahl an Vertretern der TF-Klassen MYB, bHLH, WD40, WRKY, HD-Zip, bZIP und MADS-box, die an der Regulation des Flavonoid-Biosynthesewegs beteiligt sind (Davies & Schwinn, 2003; Kubo *et al.*, 1999; Ramsay & Glover, 2005). MYB Transkriptionsfaktoren allgemein findet man bei allen Eukaryoten, aber besonders zahlreich in Pflanzen, wo sie zu den wichtigsten Genfamilien mit regulatorischer Funktion gehören (Jia *et al.*, 2004). Da weiterhin MYB TFs im Vergleich von Pflanzen zu Säugetieren eine Homologie von ca. 40 % aufweisen, wird allgemein davon ausgegangen, dass MYB TFs in der evolutionären Entwicklung des Lebens vor der Trennung von Tieren und Pflanzen entstanden sind (Paz-Ares *et al.*, 1987). Die Abkürzung MYB (von Myeloblastosis; Myeloblasten = Vorläuferzellen einer bestimmten Population weißer Blutkörperchen)

geht dabei auf den AM-Retrovirus aus Vögeln (AMV = Avian Myeloblastosis Virus) zurück, der ein krebserregendes Gen *v-myb* trägt (LePrince *et al.*, 1983). Charakterisiert sind alle MYB TFs durch eine stark konservierte N-terminale DNA-Bindedomäne, die aus einzelnen oder mehreren imperfekten Wiederholungen (1RMYB, R2R3MYB oder 3R MYB; R = Repeat) besteht (Stracke *et al.*, 2001). Diese wiederholenden Einheiten bilden jeweils drei Helices (Helix-Turn-Helix Struktur; jeweils 51 - 53 Aminosäuren), von denen die dritte direkt mit der DNA interagieren kann (Williams & Grotewold, 1997). Dabei bilden drei Tryptophan-Reste in regelmäßigen Abständen von 18 - 19 Aminosäuren einen hydrophoben Kern, der charakteristisch für eine Sequenzwiederholung in der MYB-Domäne ist.

In Pflanzen sind MYB TFs an der Regulation verschiedenster Synthesewege und Prozesse beteiligt (Jin & Martin, 1999). So spielen sie z.B. bei der Zelldifferenzierung während der Entwicklung (Oppenheimer *et al.*, 1991) sowie der Hormonantwort und Signaltransduktion (Abe *et al.*, 2003) eine wichtige Rolle. Die am besten untersuchte Funktion jedoch ist die Kontrolle des Phenylpropanoid-Metabolismus, zu dem auch die Biosynthese der Anthocyane (oder generell Flavonoide) gehört (Paz-Ares *et al.*, 1987). Die MYB TFs, die an der Regulation des Anthocyan-Biosynthesewegs beteiligt sind, gehören dazu überwiegend zu der Unterklasse des R2R3-Typs (Stracke *et al.*, 2001) und interagieren mit basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren (Mol *et al.*, 1996; Winkel-Shirley, 2001). Zusätzlich zur Interaktion von MYB und bHLH TFs konnte die Beteiligung einer separaten Klasse von Proteinen mit einer WD40-Domäne (40 Tryptophan (W) und Asparaginsäure (D) Wiederholungen) gezeigt werden (Baudry *et al.*, 2004). Die WD40 Proteine erleichtern dabei eher die Protein-Protein-Interaktion von MYB und bHLH, anstatt selbst eine intrinsische enzymatische Funktion zu haben (Ramsay & Glover, 2005), jedoch ist nicht für alle funktionellen MYB-bHLH-Interaktionen zwingend ein WD40-Protein nötig (Carey *et al.*, 2004).

1.7. Der Beerenfarbokus der Weinrebe

Die Vorfahren unserer heutigen Kulturreben sowie auch alle wilden Reben besitzen zur Reife blau / schwarz gefärbte Beeren. Den Ursprung der Weißbeerigkeit vermutet man im Nahen Osten, da schon Analysen der Grabbeigaben des ägyptischen Pharaohs Tutanchamun (1332 - 1322 v. Chr.) belegen, dass die Ägypter schon vor

über 3000 Jahren Weißwein kelterten (Guasch-Jané *et al.*, 2006). Weißbeerige Rebsorten bilden während der Reife keine Anthocyane in der Beerenhaut, da sie, im Gegensatz zu den gefärbten Rebsorten, nicht in der Lage sind, die Expression von *VvUFGT* (Chr 16, bei ca. 2,3 Mb bezogen auf das Referenzgenom) (siehe Kapitel 1.5) zu induzieren (Boss *et al.*, 1996b). Verantwortlich für die Färbung mit Beginn der Reife ist ein einziger Locus auf Chromosom 2 (bei ca. 14,2 Mb bezogen auf das Referenzgenom), der mehrere *VvmybA*-Gene des R2R3-Typs enthält, die in gefärbten Beeren die *VvUFGT*-Expression kontrollieren (Walker *et al.* (2007), siehe Abbildung 12).

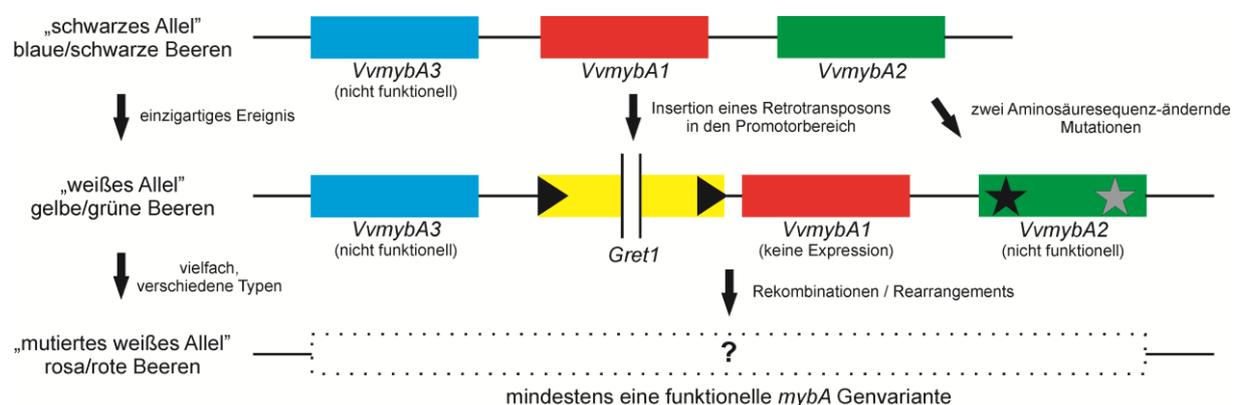


Abbildung 12: Die Evolution des Beerenfarblocus nach Pelsy (2010).

VvmybA1 und *VvmybA2* sind in blauen / schwarzen Rebsorten funktionell und unterscheiden sich nur durch eine in *VvmybA2* duplizierte C-terminale Domäne (CR) (siehe Abbildung 13). Zusätzlich befindet sich in diesem Locus ein weiteres *VvmybA*-Gen (*VvmybA3*) mit kompletter Sequenz, das aber, bedingt durch ein frühes Stopcodon im ORF, in gefärbten Rebsorten nicht funktionell ist. In weißbeerigen Rebsorten sind beide ursprünglich funktionellen *VvmybA*-Gene mutiert. Im Falle von *VvmybA1* wird die Expression durch das Retrotransposon *Gret1* verhindert, das in den Promotorbereich inserierte. Nach Schätzungen von Mitani *et al.* (2009) könnte die Insertion von *Gret1* dabei schon vor rund 110.000 bis 290.000 Jahren passiert sein. Im Falle von *VvmybA2* hingegen führten zwei Aminosäuresequenz-ändernde Mutationen im ORF zu einer

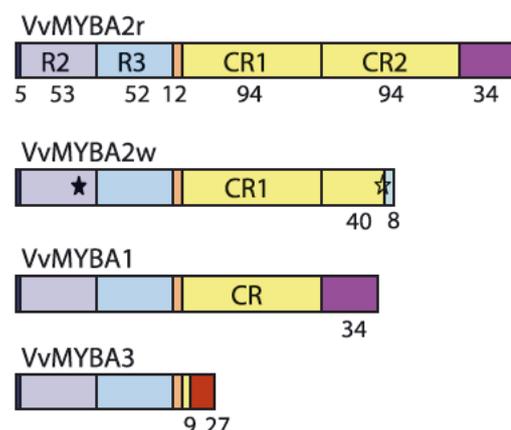


Abbildung 13: Vorhergesagte VvMYBA-Proteinsequenzen der Weinrebe. VvMYBA2r = funktionelle Variante; VvMYBA2w = nicht funktionelle Variante. (Quelle: Walker *et al.* (2007), modifiziert).

Strukturänderung des Proteins und folglich zur Nichtfunktionalität. Die vordere Mutation im N-terminalen Bereich liegt dabei in der zur DNA-Bindung wichtigen R2R3-Domäne, wohingegen die zweite Mutation im C-terminalen Bereich (2 bp Deletion) zu einem früheren Stopcodon und somit zu einer verkürzten Proteinsequenz führt. In Kombination führten beide mutierten *VvmybA*-Varianten zur Bildung des weißen Allels, das in fast allen weißbeerigen Rebsorten homozygot vorliegt (Fournier-Level *et al.*, 2010).

Da die meisten Beerenfarbmutationen mit dem bloßen Auge zu erkennen sind, wurde seit den Anfängen des Weinbaus eine Vielzahl unterschiedlicher Klone mit verschiedenen Farben selektioniert. Die meisten Mutationen treten dabei von weiß nach rot auf, wobei dieser Mutationstyp bisher nie zu einer blauen / schwarzen Beerenfarbe führte. Eine mögliche Ursache ist, dass durch die Rückmutation von weiß nach rot durch Rekombinationen und Rearrangements innerhalb der *VvmybA*-Gene des Farblokus immer nur ein funktionelles Gen zur Farbbildung entstand, so dass ein zweites im Vergleich zu den klassischen Rotweinsorten fehlte (Pelsy, 2010). Weitere Farbmutationen können z.B. von schwarz über grau zu weiß führen (Vezzulli *et al.*, 2012). Die Weinrebe besteht allgemein aus zwei Zellschichten L1 und L2, wobei die L1-Zellschicht ausschließlich aus der äußeren Epidermis besteht. Kommt es nun zu einer Mutation innerhalb einer Zellschicht, bildet sich eine periklinale Chimäre, die, bedingt durch die vegetative Vermehrung der Weinrebe, stabil sein kann. Führt diese Mutation z.B. zum Verlust des funktionellen Beerenfarblokus in der L2-Zellschicht einer klassischen Rotweinsorte wie z.B. 'Cabernet Sauvignon', bilden sich zur Reife ausschließlich in der verhältnismäßig dünnen L1-Zellschicht Anthocyane und der entsprechende Farbklon erscheint als grau (Walker *et al.*, 2006). Graue Rebsorten wurden dabei schon von dem griechischen Philosoph und Naturforscher Theophrastos von Eresos (372 / 370 bis 288 / 286 v. Chr.) in seinem Werk „*Historia Plantarum*“ beschrieben (Hort, 1916). Bedingt durch zelluläre Neuordnungen der beiden Zellschichten kann es anschließend zu einer Homogenisierung des Phänotyps kommen, so dass ausgehend von grauen Rebsorten entsprechend Farbvarianten mit weißen Beeren (Verlustmutation in beiden Zellschichten) oder wieder mit blauen / schwarzen Beeren (funktionelle Variante in beiden Zellschichten) entstehen können (Hocquigny *et al.*, 2004).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten zunächst Selbstungslinien von Beerenfarbmutanten weißbeeriger Qualitätssorten erstellt und auf Homozygotie am Farblokus mittels SSR-Markeranalyse selektiert werden. Diese homozygoten Selbstungslinien sollten zur Identifizierung und Charakterisierung der spezifischen *VvMybA*-bedingten Mutationen am Beerenfarblokus genutzt werden und einen Rückschluss auf die Abstammungsrichtungen der einzelnen Farbvarianten einer Sorte erlauben. Anhand eines ampelographischen Vergleichs, einer Genexpressionanalyse des Anthocyan-Biosynthesewegs in reifen Beeren sowie einer Anthocyananalyse (Konzentration und Komposition) bei Vollreife sollten anschließend Alleinstellungsmerkmale bestimmter Mutationstypen identifiziert werden, die zum Screening weiterer Farbmutanten in der Züchtung und Forschung genutzt werden können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die spezifische Mutation der Färberreben am Beerenfarblokus identifiziert und charakterisiert werden. Darüber hinaus wurden mehrere Klone der Färberursorte 'Teinturier' sowie verschiedene direkte Nachkommen bzgl. der Genexpression des Anthocyan-Biosynthesewegs und Anthocyankonzentration sowie -komposition analysiert, um Unterschiede innerhalb der Färberreben zu identifizieren, die auf die Mutation zurückzuführen sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI 9700 Thermocycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen
Agilent 1100/1200 Series HPLC System	Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornien, USA
EC 330 Primo Midicell Gel Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gefriertrocknung Beta 1102	Christ, Osterode
Gerhardt RO30 Schüttelmaschine	C. Gerhardt GmbH + Co. KG, Königswinter
Liquidator96	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroplatten-Reader CLARIOstar	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
pH-Messgerät: C860	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Pipettierroboter FasTrans	AnalytikJena, Jena
Power Supply EC-105	E-C Apparatus Corporation, Milford, USA
Geldokumentation Quantum ST4	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Schwingmühle Tissue-Lyser	Qiagen GmbH, Hilden
Vortex-Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Precision Advanced	Ohaus, Florham, USA
WineScan	Foss, Hamburg
Zentrifuge 2K15	Sigma, Osterode
Zentrifuge 4K15	Sigma, Osterode
Zentrifuge 6K15	Sigma, Osterode
Zentrifuge Z160M	Hermle, Wehingen

2.1.2. Software / Datenbanken

Software	Hersteller / Referenz
7500 Fast System Sequence Detection Software (Version 1.4.0.27)	Applied Biosystems, Darmstadt
BioEdit Sequence Alignment Editor	Hall (1999)
CLARIOstar MARS Data Analysis Software (Version 3.00 R2)	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
CLC Genomics Workbench (Version 6.5.1)	CLC bio, Aarhus, Dänemark
CLC Main Workbench (Version 7.7.3)	CLC bio, Aarhus, Dänemark
Corel Photo-Paint X3 (Version 13.0.0.576)	Corel Corporation, Ottawa Kanada
CorelDRAW X3 (Version 13.0.0.576)	Corel Corporation, Ottawa Kanada
EndNote (Version X8 Build 10063)	Thomson Reuters, Toronto, Kanada

Gene Mapper 5.0	Applied Biosystems, Darmstadt
MapChart 2.2	Voorrips (2002)
Primer3Plus http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi	Untergasser <i>et al.</i> (2007)
Quantum ST4 (Version 16.07)	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
R (Statistik Software)	Venables & Smith (2005)
WebSat http://wsmartins.net/websat/	Martins <i>et al.</i> (2009)

Datenbanken	Ersteller / Referenz
DGR - Deutsche Genbank Reben http://www.deutsche-genbank-reben.jki.bund.de/	Julius Kühn-Institut, Geilweilerhof
EU- <i>Vitis</i> The European <i>Vitis</i> Database http://www.eu-vitis.de/index.php/	Julius Kühn-Institut, Geilweilerhof
Genoscope http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/	Jaillon <i>et al.</i> (2007)
Gramene http://ensembl.gramene.org/Vitis_vinifera/Info/Index	Monaco <i>et al.</i> (2014)
PLACE http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/	Higo <i>et al.</i> (1999)
PlantCare http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/	Lescot <i>et al.</i> (2002); Rombauts <i>et al.</i> (1999)
VVC - <i>Vitis</i> International Variety Catalogue http://www.vivc.de/	Julius Kühn-Institut, Geilweilerhof

2.1.3. Chemikalien / Kits und Enzyme / Verbrauchsmaterial

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
2-Propanol (≥ 99,8 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Acetonitril (für HPLC)	Merck KGaA, Darmstadt
Ameisensäure (98-100 %, p.a.)	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (absolut, p.a.)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (37 %, reinst)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Malvidin-3-O-glucosid	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Orange G	Merck KGaA, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon (PVPP)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Primersynthese inkl. 5'-Label	Metabion, Planegg-Martinsried
Spermidin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Tris	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylenxyanol FF	Sigma-Aldrich, München

Kits und Enzyme	Hersteller
Fast Digest <i>EcoRI</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
KAPA HiFi Hot Start PCR Kit	Kapa Biosystems Inc., Wilmington, Massachusetts, USA
KAPA2G Fast Multiplex ReadyMix	Kapa Biosystems Inc., Wilmington, Massachusetts, USA
peqGOLD Plant DNA Mini Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy MinElute Cleanup	Qiagen GmbH, Hilden
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96er Deepwell-Platten	ABgene, Epsom, UK
96er PCR-Platten	Kisker Biotech GmbH + Co. KG, Steinfurt
Reaktionsgefäße (0,2 und 0,5 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.4. Pflanzenmaterial

Die analysierten Pflanzen stammten aus der am Institut angesiedelten Rebsortensammlung, den weiteren zur DGR (Deutsche Genbank Reben) gehörenden Sortimenten sowie aus dem Rebsortiment in Vassal (FRA139; Frankreich). Gewächshauspflanzen wurden aus Schnittholz (Stupfer = Holzstecklinge) nach dem Laubfall 2015 angezogen. Diverse Blattproben von 'Riesling Rot'-Klonen wurden freundlicherweise von den jeweiligen Winzern aus Deutschland zur Verfügung gestellt (siehe Anhang 5). Im Zuge dieses Projektes aufgezogene Selbstungslinien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Liste der in diesem Projekt geselbsteten Rebsorten.

Leitname	VVC-Kennnummer	Akzessionsname	Akzessionsnummer	Zuchtstammnummer
Elbling Rot	3863	Stolle 505	DEU098-1997-064	2014-267
Räuschling Rot	24627	Räuschling Rot	DEU098-2007-019	2014-268
Riesling Weiß	10077	Ortlieber Gelb	DEU098-1993-305	2013-321
Riesling Rot	10076	Riesling Rot	DEU098-1998-129	2013-322
Riesling Rot Rückmutante	-	Roter Riesling Mut.	DEU363-059	2014-271
Silvaner Rot	11807	Silvaner Rot	DEU098-2007-061	2014-270
Silvaner Blau	11804	Silvaner Blau	DEU098-1992-066	2014-269

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus frischem Blatt- sowie Wurzelmaterial erfolgte mit dem peqGOLD Plant DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden ca. 1 cm² große Blattstücke vom dritten Blatt eines Triebes oder eine äquivalente Menge junger Wurzeln gesammelt, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Bedarf anschließend in einer Schwingmühle homogenisiert. Zum Screening der Selbstungslinien wurden etwa 1 cm² Blattmaterial des dritten Blattes eines Triebes in 96er Deepwell-Platten gesammelt und lyophilisiert. Nach Homogenisierung des Pflanzenmaterials in einer Schwingmühle erfolgte die anschließende DNA-Extraktion mit dem DNeasy 96 Plant Kit nach Anleitung des Herstellers.

Die Konzentration und Reinheit aller Proben wurde spektralphotometrisch mit dem Mikroplatten-Reader CLARIOstar nach Handbuch bestimmt.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCRs zur Amplifikation spezifischer *VvmybA*-Allele wurden mit dem KAPA HiFi Hot Start PCR Kit in einem Mastercycler gradient nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zuvor wurden mittels Gradienten-PCR die optimalen Annealingtemperaturen der jeweiligen Primerkombinationen bestimmt. Trotz der Ermittlung der optimalen Annealingtemperaturen, vermutlich aufgrund der großen Homologien der *Vvmyb*-Gene, wurden oft unspezifische Produkte amplifiziert, so dass auf eine Touch-Down-Variante zur spezifischeren Amplifikation zurückgegriffen wurde. Jede Reaktion (25 µl) beinhaltete 20-25 ng gDNA, 0,3 mM dNTPs, 1 x HiFi-Puffer, 0,3 nM von jedem Primer und 0,5 U Polymerase. Die Reaktion begann mit einer initialen Denaturierungsphase von 3 min bei 95 °C. Anschließend folgten 10 Zyklen mit einer Denaturierungsphase für 20 s bei 98 °C, Annealingphase der Primer für 15 s, die bei 5 °C über der optimalen Temperatur begann und bei jedem Zyklus um 0,5 °C verringert wurde (Touch-Down-Phase) sowie einer Elongationsphase bei 72 °C entsprechend der Produktlänge (ca. 30 s/kb). Danach erfolgten nochmals 20 Zyklen bei gleichbleibender optimaler Annealingtemperatur und eine finale Elongation bei 72 °C für 5 min. Die Größe der Amplikons wurde auf einem 1 %igen Agarosegel im Vergleich zum Größenmarker O'GeneRuler DNA Ladder Mix ermittelt.

2.2.3. Verwendete Primer zur Analyse der *VvmybA*-Gene

Selbst erstellte Primer für die Amplifikation sowie Sequenzierung der *VvmybA*-Allele wurden von der Referenzgenomsequenz PN40024 (12x) (Jaillon *et al.*, 2007) abgeleitet. Die Entwicklung erfolgte mit der Software CLC Main Workbench sowie Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Primer eine Annealingtemperatur von 51 – 64 °C, eine Länge von 18 – 27 bp und ca. einen GC-Gehalt von 50 % aufwiesen. Um Mehrfachbindungen und folglich unspezifische Produkte bei der Amplifikation zu vermeiden, wurden die Primersequenzen gegen die Referenzsequenz der Rebe (Jaillon *et al.*, 2007) abgeglichen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Zur direkten Sequenzierung wurde eine kleine Menge des entsprechenden PCR-Produktes (3 – 5 µl; Touch-Down-Variante) zur Kontrolle auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, anschließend mit dem GeneJET PCR Purification Kit aufgereinigt und mit einer Konzentration von 30 – 50 ng/µl mit den entsprechenden Primern an einen Sequenzier-Service (GATC Biotech AG, Köln) gesendet.

Tabelle 2: Liste der in diesem Projekt verwendeten Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der *VmybA*-Allele. x = Primer wurden zur Amplifikation und Sequenzierung verwendet; (x) = Primer wurden ausschließlich zur Sequenzierung verwendet.

Primername	Primersequenzen 5'-3'	<i>MybA1c</i> / <i>MybA1</i>	<i>MybA1a</i>	<i>MybA1b</i>	<i>MybA31</i>	<i>MybA3</i>	<i>MybA313</i>	<i>MybA2w</i> / <i>MybA232a</i> / <i>MybA232b</i>	Referenz
a	AAAAAGGGGGCAATGATGGGACCC	x							Kobayashi <i>et al.</i> (2004)
b	GGACGTTAAAAAATGGTTGCACGCTG		x						Kobayashi <i>et al.</i> (2004)
c	GAACCTCCTTTTGAAGTGGTGACT	(x)	x	x	(x)	(x)	(x)		Kobayashi <i>et al.</i> (2004)
3' <i>MybA1</i> _f	TTCCAGGGAGGACTGCTAATGATG	(x)	(x)	(x)	(x)		(x)		Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
3' <i>MybA1</i> _rev	TTGGCACCATAATTTCCATTTTC	(x)	(x)	(x)		x			Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
3' <i>MybA2</i> _f	TTCCAGGGAGGACTGCTAATGATG						(x)		Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
3' <i>MybA2</i> _f	CCTTGATTGCCGGGTAGGCCTTC					(x)			Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
3' <i>MybA3</i> _rev	GGGCCCTCAAAAATGGAGAAGT					x	x		Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
Prom_ <i>MybA3</i> _f	AAACCCGGTCATTGAATTGACAATAAG				x	x	x		Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
Prom_ <i>MybA3</i> _rev	GAACCTTCTTTTTTCAGGTGGTGACC					(x)			Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
Prom <i>MybA2</i> _rev	GAACCTTCTTTTTTCAGGTGGTGACC						(x)		Fournier-Level <i>et al.</i> (2009)
3' <i>MybA2</i> _2_rev	GGTGAATATAGATGGATGTAGG						x		diese Arbeit
BAC_h2A1a_rev	CAAGCTAGAAAAGAGAGATGTGT	x							diese Arbeit
nLTR_1_rev	AATGCCGCTGGAGTTCATGG	(x)							diese Arbeit
PA3_SeqRR_1_fw	TGTCCCATTCATCCTAACCAA					(x)			diese Arbeit
Prom <i>MybA2</i> _2_f	TGATTGTACCCTTCTTCG						x		diese Arbeit
Seq_Exon1_ <i>Myb</i> _fw	ATATGGAGAAAGGAAAAAGTGG						(x)		diese Arbeit
VLTR_1_fw	TCAGTGAGGGTAACAAAAGTC	x							diese Arbeit
VLTR_was5_fw	TAAAAGCCTATAATATTTCCAC	(x)							diese Arbeit

2.2.4. SSR-Markeranalyse

Zur SSR-Markeranalyse (Simple Sequences Repeat; Mikrosateliten) wurde eine PCR im Multiplexverfahren mittels KAPA2G Fast Multiplex ReadyMix eingesetzt. Dazu wurde eine 10 µl Reaktion mit jeweils 1 ng gDNA, 10 µM je Primer und 1 x KAPA Multiplex-Mix (enthält dNTPs und DNA-Polymerase) eingesetzt. Ein Primer jedes SSR-Markers wurde am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-FAM, HEX, TAMRA oder ROX) markiert. Die Amplifikation erfolgte in ABI 9700 Thermocyclern unter folgenden Bedingungen: 1) Initiale Denaturierungsphase bei 95 °C für 3 min, 2) 30 Zyklen mit jeweils 95 °C für 15 s (Denaturierung), 60 °C für 30 s (Annealing) sowie 72 °C für 30 s (Elongation) und 3) finale Elongation für 7 min bei 72 °C. Anschließend wurde das PCR-Produkt 1:3 verdünnt und jeweils 1 µl mit 12 µl H₂O und 0,5 µl Größenstandard gemischt. Der Größenstandard wurde am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof hergestellt, besitzt eine BODIPY 639/650-Markierung und deckt einen Bereich von 35 bis 500 bp ab. Die Fragmentlängenanalyse erfolgte auf einem 16-Kapillar-Sequenzier (ABI 3130xl Genetic Analyzer) und wurde mit der Software GeneMapper 5.0 ausgewertet. Die in dieser Arbeit verwendeten SSR-Marker sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die neu entwickelten Marker zur Untersuchung des Farblokus wurden mit Hilfe der Software WebSat (Martins *et al.*, 2009) von der Referenzgenomsequenz PN40024 (12x) (Jaillon *et al.*, 2007) abgeleitet.

Tabelle 3: Liste der in diesem Projekt verwendeten SSR-Marker zur Genotypisierung und Analyse des Farblokus. Chr = Chromosom.

Markername	Chr	Physikalische Position PN40024 (12x)	forward Primer		reverse Primer		Abgeleitete Fragmentgröße [bp] am SSR-Lokus	SSR- Motiv	Referenz
VMC6B11	2	8128449	TGATTATGGCAATAATCACACC	TTGCTTACCATCAAAAAAGAAA	106	GA	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMC5G7	2	8222941	CATTTCGCTGTGACTTTC	ACTACCCCTCTCTTCTCGC	210	TC	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
GF02-55	2	13998165	AAAAATTGAAGGACAGGAGGAGG	GCAAGGCTGGTCTACTCAGAAA	212	AT	diese Arbeit		
VNNTM1	2	14149178	CCACGCCACTATTGCTAAAC	TGCACCGTATCAAGATCATGTC	168	AT	Fournier-Level et al. (2009)		
GF02-61	2	14187240	GCAAACTCCAGAACTGATTT	TATTGGTCGAGAAAGGAATGTGG	280	AAT	diese Arbeit		
GF02-62	2	14192053	GGGATTTGTTAAGGAGATTTGC	GATGACAGTTCCAGAGTTGGC	381	ATA	diese Arbeit		
GF02-68	2	14253531	CCCCTGCCATCTCCATGC	GGTCGTTGCATCATTTTCTCCA	390	TC	diese Arbeit		
GF02-69	2	14287643	TTCCACTGTCAACTCATTTTCC	ATTTTCCATTCTCGGATACACC	445	AT,AT	diese Arbeit		
VNNTM3	2	14287923	TGCTGACCTGAATCATTTTCTACT	GATGTTCTGGAGAGATGCTTATC	276	AT	Fournier-Level et al. (2009)		
GF02-70	2	14292921	CCATTTACCTCTGGGAATTTGA	TTGGGGAATAGGAAAAGAGTAGG	416	TTA	diese Arbeit		
GF02-72	2	14304409	TTTTGGCTCACTCACCATTTT	GGGTAGTTGGGGAATAGGAA	244	TAT	diese Arbeit		
VNNTM5	2	14325217	AGGAGGAATCCACATCAAAAAGA	TGATTCAAAGGAATAAATAACCATCA	294	AT	Fournier-Level et al. (2009)		
VNNTM6	2	14330197	CCTTCTTTGGACACCCATACAAA	TTCCCTATCAACAACAACCTTGAGG	147	AT	Fournier-Level et al. (2009)		
GF02-50	2	16086719	TTAGTGCACAAGAATGATAGGGC	GTCACACTTGAGCTGTTGTTTTG	165	AT	Schwander (intern; 2013)		
VMC8C2	2	17514962	AAGGAATTTGGATACTGAAAGT	TGAAGACATCTACGTAAGTGAA	149	TC	Doligez et al. (2006)		
VMC7G3	2	18270887	TTACTAGTGTCTGTCTGCTCCA	TGCTTCTCTCTTTCAACTTTCA	129	GA	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMMD28	3	11617504	AACAATTTCAATGAAAAAGAGAGAGAGA	TCATCAATTTTGTATCTATATTTGCTG	227	CT	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMMD32	4	18035578	TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG	GGAAGAATGGGATGACTCGC	256	CT	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMMD27	5	4472022	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	ACGGGTATAGAGCAAAACGCTGT	188	CT	Doligez et al. (2006)		
VJZAG79	5	5692460	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	TGCCCCCATTTTTCAAACTCCCTTCC	254	GA	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMMD7	7	1178552	AGAGTTGGCGAGAACAGGAT	CGAACCTTCCACACGCTTGAAT	241	CT	Doligez et al. (2006)		
VJZAG62	7	1767002	GGTGAATGGGACCGCAACACACACCGC	CCATGTCCTCTCTCAGCCTTCTCAGC	200	TC	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMMD25	11	2971693	TTCCGTTAAAGCAAAAAAGAAAAAGG	TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	244	CT	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VVS2	11	3909894	CAGCCCGTAAATGATCCATC	AAATTCAAAAATTTCTAATTCAACTGG	151	TC	Doligez et al. (2006); Riaz et al. (2004)		
VMMD5	16	20442394	CTAGAGCTACGCCCAATCCAA	TATACCAAAAAATCATATTCTAAA	227	TC	Doligez et al. (2006)		

2.2.5. Sequenzierung von Klonen aus der BAC-Bank von `Riesling Rot`

Um den kompletten mutierten Farblokus von `Riesling Rot` darstellen zu können, wurde mithilfe von BACs (Bacterial Artificial Chromosome) der entsprechende Bereich sequenziert. In dem Kontext sind nachfolgend die erzielten Ergebnisse ausführlich beschrieben und aufgrund der geringeren Relevanz in Kapitel 3.1.3.4 des Ergebnisteils nur zusammengefasst.

BACs sind künstliche Chromosomen (ursprünglich aus *Escherichia coli*), die als Vektoren Inserts bis 300 kb aufnehmen können und anschließend beispielsweise zur Sequenzierung von größeren Abschnitten des Genoms verwendet werden (O'Connor *et al.*, 1989; Shizuya *et al.*, 1992). Zur Erstellung der BAC-Bank wurden ca. 70 g junge Blattmasse (Gewächshauspflanzen; 24 h vor der Ernte im Dunkeln gehalten) des `Riesling Rot`-Klons Gm4 (siehe Anhang 5) gesammelt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die gesammelten Blattproben auf Trockeneis an einen externen Dienstleister (Genomics Institute der Clemson University, Clemson, South Carolina, USA) gesendet, der im Auftrag die BAC-Bank erstellte. Nach Extraktion von hochmolekularer DNA und Fragmentierung durch ein Restriktionsenzym erfolgte eine Ligation der ca. 90 – 140 kb großen Fragmente in den linearisierten und dephosphorylierten BAC-Vektor pCUGIBAC1 (Luo *et al.*, 2001). Anschließend erfolgte die Transformation in den *Escherichia coli*-Stamm K12 DH10B (*F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-*). Es wurden 22 „Pools“ mit jeweils ca. 2000 CFU (Colony Forming Units; ca. 44.000 BAC-Klone) bei einer theoretischen Coverage des Genoms von bis zu sechsfach erstellt. Zum Screening der Pools wurde das in Abbildung 14 dargestellte Schema verwendet. Die Primerkombination für Sonde 1 (Probe 1) sollte dabei als Nachweis für den Farblokus dienen und die Primerkombination für Sonde 2 (Probe 2) sollte dabei die weiße Haplophase spezifisch über *Gret1* binden. Die rote Haplophase hätte demnach aus einem positiven Signal für Probe 1 und einem negativen Signal für Probe 2 selektiert werden können. Dazu wurden mittels PCR zuerst positive Pools für beide Kombinationen selektiert, anschließend auf einem Selektivmedium ausplattiert und jeweils in 384-Well-Mikrotiterplatten zur DNA-Hybridisierung (Einzel-Klon-Selektion) überführt. Sonden wurden anhand der Primersequenzen entsprechend für Probe 1 und Probe 2 auf Basis der gDNA von `Riesling Rot` hergestellt. Es konnte jeweils ein Pool selektiert werden, der eindeutig ein Fragment der weißen (neun positiv

getestete Einzel-Klone) sowie der roten (sechs positiv getestete Einzel-Klone) Haplophase trug. Nach Beendigung des Screenings wurden die BAC-Bank (verteilt auf 48 384-Well-Mikrotiterplatten) sowie die identifizierten positiven Einzel-Klone zurück an das Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof gesendet.

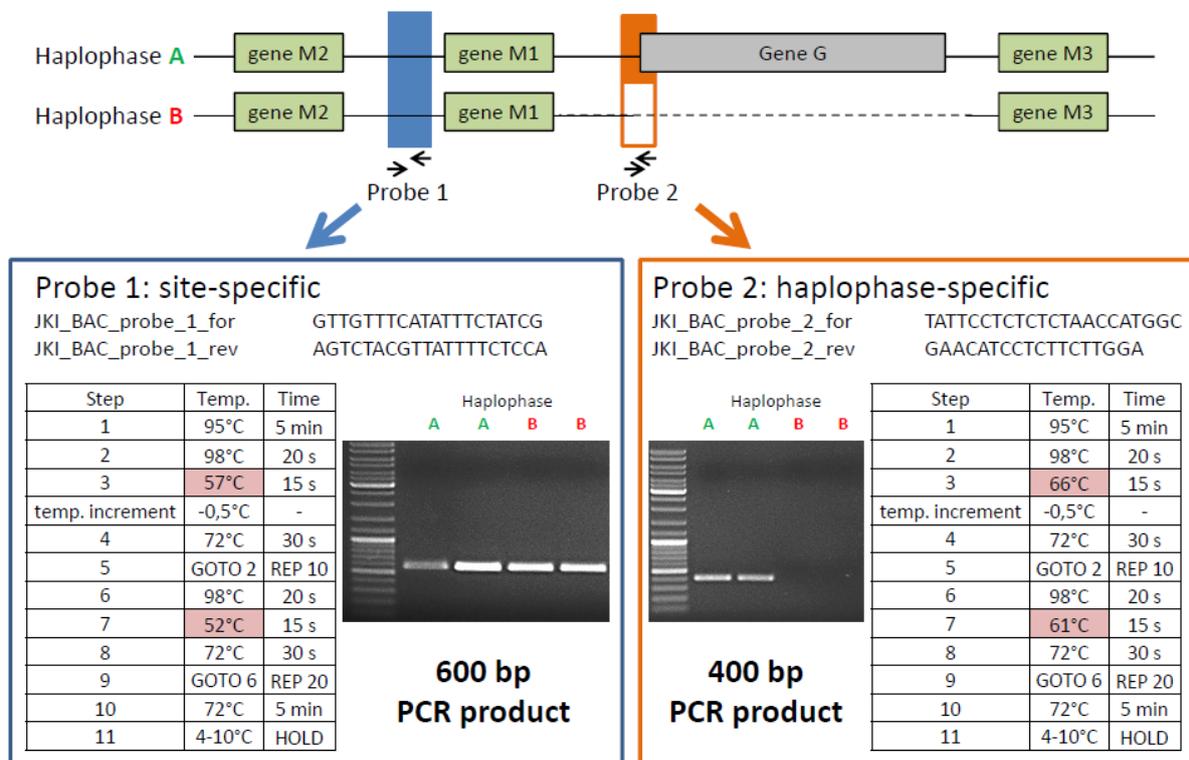


Abbildung 14: Schema zum Screening der BAC-Bank, das am Genomics Institute der Clemson University durchgeführt wurde. Probe 1 sollte dabei BACs mit einem Farblokus-Insert selektieren, während Probe 2 spezifisch zur Unterscheidung der weißen Haplophase (A) und roten Haplophase (B) diene. Die durchgeführte PCR wurde mittels KAPA HiFi Hot Start PCR Kit in der Touch-Down-Variante auf Basis genomischer DNA homozygoter Selbstungen von 'Riesling Rot' zur Differenzierung der Haplophasen durchgeführt. gene M1-M3 = *VvmybA1-3*; Gene G = *Gret1*.

Da das Screening durch die Sonden 1 und 2 nur jeweils zum Nachweis des *VvmybA1*-Bereiches diene, wurde vor der Sequenzierung eine finale Überprüfung zur ungefähren Größe und Position des enthaltenen Fragmentes mit SSR-Markern durchgeführt (siehe Tabelle 4). Dabei konnten, aufgrund des Vorhandenseins von *VvmybA1a* (weiße Haplophase) oder *VvmybA31* (rote Haplophase), die Ergebnisse des Genomics Institute der Clemson University bestätigt werden. Das Fragment in BAC 05I18 (rot) erstreckte sich über den *VvmybA2*-Bereich, wohingegen der BAC 07A05 zusätzlich *VvmybA3* abdeckte.

Zur Sequenzierung (Seq-It GmbH + Co. KG, Kaiserslautern) wurde die DNA der zwei Klone präpariert, eine Shotgun library (Nextera XT) pro Klon erstellt und mittels MiSeq (2x250 bp paired-end reads, ca. 100x Coverage) sequenziert.

Tabelle 4: Übersicht der ungefähren Größe und Position der zwei sequenzierten BAC-Klone und den zum Screening verwendeten SSR-Markern mit der Position auf Chromosom 2 der Referenzsequenz PN40024 (12x). Das Vorhandensein der *mybA*-Genvarianten wurde mittels PCR überprüft.

Position		~14,15	~14,18	~14,19	~14,19	~14,24	~14,24	~14,25	~14,29	~14,31	~14,33	~14,33	~14,35
BAC	Allel	VVNTM1	VvmybA2	GF02-61	GF02-62	VvmybA31	VvmybA1a	GF02-68	VVNTM3	VvmybA3	VVNTM5	VVNTM6	GF02-58
05I18	rot	169	x	285	385	x							
07A05	weiß						x	390	276	x			

Die Verrechnung der Rohdaten erfolgte mit der CLC Genomics Workbench am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof. Dazu wurden die Daten zuerst nach Qualitätsparametern getrimmt (Quality score: 0,05; Ambiguous nucleotides: 2) und anschließend eine *De Novo*-Assemblierung aller Reads zu größeren Contigs durchgeführt. Nach Abschluss der Assemblierung wurden noch vorhandene Reste des verwendeten BAC-Vektors pCUGIBAC1 entfernt. Da die Sequenz im Bereich des Farblokus viele repetitive Elemente sowie diverse kleinere *VvmybA*-Fragmente enthält, führte die *De Novo*-Assemblierung zu mehreren Contigs, die mit der Referenzsequenz PN40024 (12x) im Bereich des Farblokus verglichen wurden, um die genaue Abfolge der kompletten Sequenz zu bestimmen. Anhand der Referenzsequenz wurden für entstandene Lücken Primer entwickelt, die entsprechenden Bereiche über die präparierte BAC-DNA amplifiziert und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung (GATC Biotech AG, Köln) sequenziert, um den Locus komplett darstellen zu können (siehe Anhang 1 und Anhang 2). Die speziell zum Lückenschluss entwickelten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Liste der nach der BAC-Sequenzierung entwickelten Primer zum Lückenschluss der einzelnen Contigs.

Lücke	BAC	Primernamen	Primersequenzen 5'-3'
1	05I18 (rot)	CS1_2_fw	TGAGAATCAAACCCTACCTCG
		CS1_1_rev	ATGGACCCACTCTCAAAC
2	05I18 (rot)	CS2_2_fw	GATTGGAAGCTTGGTTGAAG
		CS2_1_rev	CATGACATACGTGGACAATAC
3	beide	CS3_1_fw	GGGAAAGTTGTGTTTATAGGCT
		CS3_1_rev	ATATAGACATTCACACACGG
4	07A05 (weiß)	CS4_2_fw	AATCGGTGTGTATTTGTAGAC
		CS4_2_rev	TTCCCATCTCCAGCACTC
5	07A05 (weiß)	CS5_1_fw	GGAGGCTCTTCTAATTTGGA
		CS5_2_rev	CGTGTTGATCTCAATTTATGG

2.2.6. RNA-Extraktion

Für die Genexpressionsanalysen von Beerenproben wurden vier Wochen vor (nur Färberreben) und vier Wochen nach *Véraison* (Farbmutanten und Färberreben) jeweils drei Beeren aus dem mittleren Bereich von drei sonnenexponierten Trauben gesammelt, umgehend die Beerenhaut vom Fruchtfleisch getrennt und separat (bei Farbmutanten nur Beerenhaut) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für Blattproben wurden jeweils ca. 200 mg Blattmaterial von ca. acht Monaten alten Gewächshauspflanzen (*Teinturier*-Klone) oder von Herbstblättern kurz vor dem Laubfall (*Silvaner Grün*, *Silvaner Blau*, *Silvaner Rot*) gesammelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Verwendung aller gesammelten Proben erfolgte bei -80 °C.

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll von Iandolo *et al.* (2004) mit zwei Änderungen: 1) bei allen Proben wurde ein Lysepuffer mit 300 mM Tris-HCl zur besseren Stabilisierung des pH-Wertes verwendet und 2) das Protokoll wurde zur Verwendung von 1,5 mL Reaktionsgefäßen skaliert, so dass der beschriebene Filterschritt nach der Lyse nicht durchgeführt werden musste. Die extrahierte RNA wurde zur Entfernung genomischer DNA anschließend mit RNase-Free DNase behandelt und mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit aufgereinigt. Die Konzentration und Reinheit wurde spektralphotometrisch mit dem Mikroplatten-Reader CLARIOstar nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.2.7. cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Zur Synthese von cDNA wurden 100-1000 ng Gesamt-RNA mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Quantitative real-time PCR zur Genexpressionsanalyse wurde mit dem ABI 7500 Fast PCR System mittels SYBR-Green Real Time PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers mit jeweils 10 ng cDNA und 250 nM Primern pro Reaktion durchgeführt. Die relative Quantifizierung der Expression erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode (Livak & Schmittgen, 2001) durch Verwendung der 7500 Fast System Sequence Detection Software des Herstellers. Eine Normalisierung der Expressionsdaten erfolgte dabei in allen Analysen auf das „Housekeeping“ Gen *VvGAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), das

zuvor in Reid *et al.* (2006) für Genexpressionsstudien getestet wurde. Die untersuchten Gene des Anthocyan-Biosynthesewegs mit den verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Liste der in diesem Projekt zur qRT-PCR verwendeten Primer.

Gen	Chr	Primersequenzen 5'-3'	Annotation / Bemerkung	Referenz
<i>VvGAPDH</i>	17	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA CCACAGACTTCATCGGTGACA	VIT_17s0000g10430	Reid <i>et al.</i> (2006)
<i>VvMybA1</i>	2	GAGTTTGCATTAGACGAGGTT CTTTTTGAAGTGGTGACT	VIT_02s0033g00410	diese Arbeit
<i>VvMybA2</i>	2	GAGTTTGCATTAGACGAGGTT GTGTTTGGGGTTTTTTTCTC	VIT_02s0033g00390	diese Arbeit
<i>VvMybA3</i>	2	GAGTTTGCATTAGACGAGGTT GTCCAGAGGCTTGCGAGA	VIT_02s0033g00450	diese Arbeit
<i>VvMybA232</i>	2	GATGCCGAAAAAGCTGCAGG GTGTTTGGGGTTTTTTTCTC	-	diese Arbeit
<i>VvUFGT</i>	16	TAACACATTGTGGATGGAACATCAT ACCTTCAATTCTCACTCCAATCTC	VIT_16s0039g02230	Ali <i>et al.</i> (2011)
<i>VvF3'H</i>	17	CCAAGTTTTCGGGAAGTAAATG TACCCCTTGAGAATCATCGTTT	bindet <i>VvF3'H</i> Cluster	Mu <i>et al.</i> (2014)
<i>VvF3'5'H</i>	6	GCATGGATGCAGTTAAGTAGAAAA ATATGGCTTGGTGGTAGAATGAAACGA	bindet <i>VvF3'5'H</i> Cluster	Mu <i>et al.</i> (2014)
<i>VvOMT</i>	1	GAGAGCAGGCAGAGTCCATC CACCATAAGCAAACCCTAAACC	bindet <i>VvOMT</i> Cluster	Mu <i>et al.</i> (2014)

2.2.8. HPLC-DAD-Analyse der Anthocyane

Zur Bestimmung der Anthocyankonzentration sowie –komposition in Blättern von Gewächshauspflanzen (‘Teinturier’-Klone) und reifen Beeren (Farbmutanten und Färberreben) wurden Anthocyanextrakte nach Failla *et al.* (2014) hergestellt. Jeweils zehn reife Beeren (mindestens 70 °Oe) aus dem mittleren Bereich von drei sonnenexponierten Trauben wurden für alle untersuchten Sorten gesammelt und gewogen. Die Beerenhäute wurden vom Fruchtfleisch getrennt, erneut gewogen und gefriergetrocknet (für die Analyse der Färberreben wurde das Fruchtfleisch zusätzlich bearbeitet). Im Falle der Blattproben wurden jeweils vier bis sechs Blätter eines Stupfers entfernt, gewogen und gefriergetrocknet.

Alle getrockneten Proben wurden fein gemörsert und jeweils 0,02 - 0,12 g Beerenmaterial (0,08 – 0,15 g Blattmaterial) in 10 ml einer EtOH:H₂O:HCl-Lösung (70:29:1) über Nacht schüttelnd bei 100 rpm zur Extraktion eingesetzt. Die Extrakte

wurden am nächsten Tag 10 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und 50 µl des Überstandes in der HPLC verwendet.

Die Analyse der Anthocyane wurde mit einem Agilent 1100/1200 Series HPLC System einschließlich eines Diode-Array Detektors (DAD) nach der OIV-MA-AQ315-11 Methode (OIV, 2007) durchgeführt. Verwendet wurde eine LiChrospher 100 RP 18 (5 µm) Säule in LiChroCart 250-4 und eine LiChroCart 4 mm RP 18 Vorsäule. Ein Gradient bestehend aus Solvent A (H₂O / Ameisensäure / Acetonitril, 87:10:3, v/v/v) und Solvent B (H₂O / Ameisensäure / Acetonitril, 40:10:50, v/v/v) wurde bei einer Flussrate von 0,4 mL/min und einer konstanten Säulentemperatur von 20 °C wie folgt eingesetzt: 94–70% A von 0 bis 15 min, 70–50% A von 15 bis 30 min, 50–40% A von 30 bis 35 min, 40–94% A von 35 bis 41 min und ein letzter Schritt von 94% A zur Equilibrierung der Säule von 41 bis 50 min (entsprechend Solvent B bis 100 %). Die Detektion der Anthocyane erfolgte bei 520 nm. Eine Quantifizierung wurde anhand der Flächensumme („peak area“) durchgeführt. Die Anthocyankonzentration wurde dabei anhand eines Malvidin-3-O-glucosid Standards und einer Kalibrierungskurve ($R^2 = 0,99$) berechnet (Chandra *et al.*, 2001). Die Identifizierung der einzelnen Anthocyan-Peaks erfolgte nach Kammerer *et al.* (2005) und De Rosso *et al.* (2012).

2.2.9. Statistische Auswertungen

Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen der Anthocyan- sowie Expressionsdaten wurde die Software R (Venables & Smith, 2005) verwendet. Dazu wurde entweder der Student's T-Test sowie TukeyHSD (Tukey's Honest Significant Difference method) oder ein nichtparametrischer Permutationstest angewendet. Die Berechnung des nichtparametrischen Permutationstests, der speziell für Daten ohne Normalverteilung und Varianzhomogenität geeignet ist, erfolgte mit dem Package „nperm“ (Burchett *et al.*, 2017).

3. Ergebnisse

3.1. Die Farbmutanten weißbeeriger Qualitätsrebsorten

3.1.1. Sortenechtheitsüberprüfung

Die Sortenechtheit (engl. trueness-to-type) ist Voraussetzung für die Sicherung der genetischen Diversität zur Vermeidung von Generosion. Darüber hinaus ist die korrekte Identifikation von Rebsorten und Klonen für die Züchtung und insbesondere für die Forschung von grundlegender Bedeutung. So befinden sich neben Synonymen und Homonymen ca. 10 % Bezeichnungssirrtümer in den weltweiten Rebsortimenten (Dettweiler, 1991). Um die Sortenechtheit der in diesem Projekt untersuchten Farbmutanten sicherzustellen, wurde deshalb der genetische Fingerabdruck der neun SSR-Marker des VVC (Vitis International Variety Catalogue; <http://www.vvc.de/>) erhoben (siehe Tabelle 7) und zusätzlich ein ampelographischer Abgleich durchgeführt. Alle getesteten Farbmutanten zeigten im Vergleich zu den weißbeerigen Ursprungssorten ein identisches genetisches Profil und konnten folglich als sortenecht bestätigt werden. Dies stellte die Grundlage aller weiterführenden Arbeiten dar.

Tabelle 7: Genetisches Profil der untersuchten Qualitätssorten sowie deren Farbmutanten.

Leitname	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VrZag62	VrZag79
Elbling Weiß	143:151	240:242	249:257	249:255	180:190	228:234	240:272	194:204	237:245
Elbling Rot	143:151	240:242	249:257	249:255	180:190	228:234	240:272	194:204	237:245
Kerner	151:155	228:238	247:257	241:249	186:190	228:236	272:272	194:194	239:245
Kernling	151:155	228:238	247:257	241:249	186:190	228:236	272:272	194:194	239:245
Müller-Thurgau Weiß	143:151	228:230	247:257	249:255	182:182	234:244	252:252	194:194	243:245
Müller-Thurgau Rot	143:151	228:230	247:257	249:255	182:182	234:244	252:252	194:194	243:245
Räuschling Weiß	143:151	236:240	243:249	249:255	182:190	218:246	272:272	188:204	243:245
Räuschling Rot	143:151	236:240	243:249	249:255	182:190	218:246	272:272	188:204	243:245
Riesling Weiß	143:151	228:236	249:257	249:255	182:190	228:234	252:272	194:204	243:245
Riesling Rot	143:151	228:236	249:257	249:255	182:190	228:234	252:272	194:204	243:245
Riesling Rot Rückmutante	143:151	228:236	249:257	249:255	182:190	228:234	252:272	194:204	243:245
Silvaner Grün	151:153	228:234	243:247	241:249	190:195	228:236	272:272	188:204	249:251
Silvaner Rot	151:153	228:234	243:247	241:249	190:195	228:236	272:272	188:204	249:251
Silvaner Blau	151:153	228:234	243:247	241:249	190:195	228:236	272:272	188:204	249:251

3.1.2. Erstellung von homozygoten Selbstungslinien am Farblokus

In vorangegangenen Studien über Farbmутanten weißbeeriger Rebsorten konnten die zur Farbe führenden Mutationen identifiziert und beschrieben werden (Azuma *et al.*, 2009; Giannetto *et al.*, 2008; This *et al.*, 2007). Jedoch wurden viele Farbkclone entweder nicht untersucht oder die Mutation konnte nicht gefunden werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die untersuchten Farbmутanten am Farblokus heterozygot sind und die nicht mutierte, weiße Haplophase vor allem bei PCR-Analysen zu Interferenzen führen kann. Deshalb wurden zu Beginn des Projektes die untersuchten Farbmутanten mittels freier Abblüte geselbstet und anschließend auf Homozygotie am Farblokus selektiert. Folglich konnte erst rückwirkend nach den Analysen festgestellt werden, auf welchen Haplophasen die entsprechenden Mutationen lagen. Als weiterer Vorteil kann, aufgrund der Homozygotie am Farblokus, auf eine Klonierung zur Trennung der Haplophasen verzichtet und aufgereinigte PCR-Produkte können direkt zur Sequenzierung verwendet werden. Das Vorgehen zur Selektion dieser homozygoten Selbstungslinien mittels SSR-Markern ist in Abbildung 15 dargestellt.

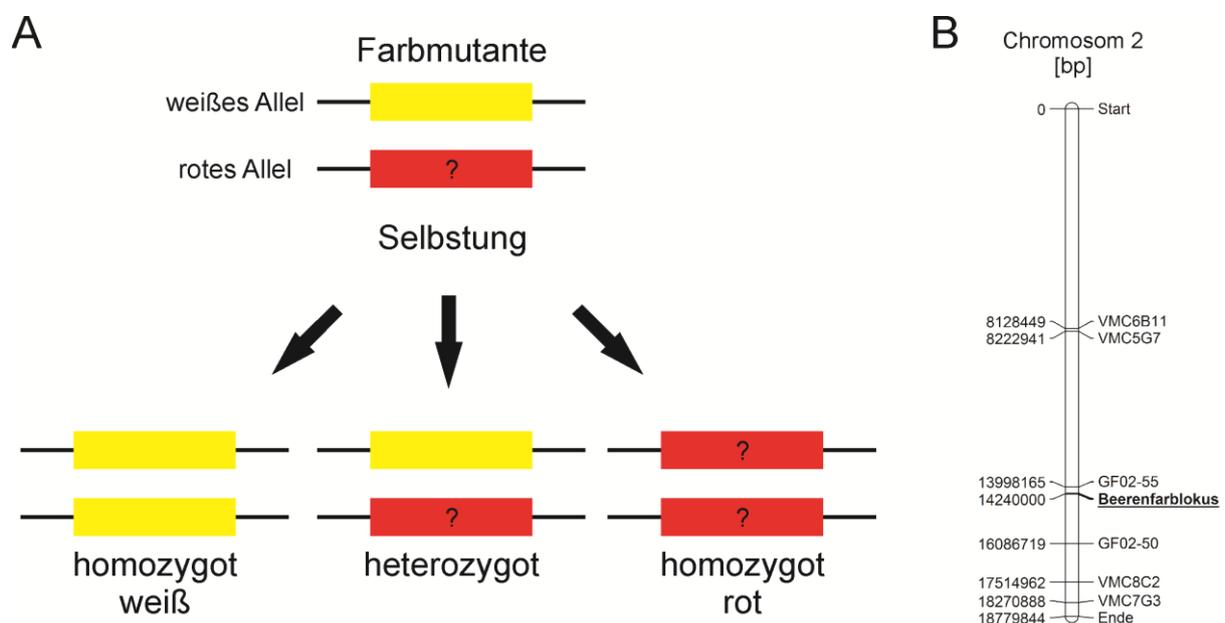


Abbildung 15: Schematisches Vorgehen zur Selektion von homozygoten Selbstungslinien am Farblokus. (A) Schema der Haplotypen-Aufspaltung am Farblokus einer Selbstungslinie. (B) Schematische Darstellung von Chromosom 2 mit den zum Screening der Selbstungslinien verwendeten SSR-Markern. Die Positionen der SSR-Marker sowie des Beerenfarblokus sind relativ zum Referenzgenom PN40024 (12x) angegeben (vgl. Tabelle 8).

Der eigentliche Farblokus liegt zwischen den Markern GF02-55 und GF02-50. Die Sorten `Elbling` sowie `Silvaner` zeigten dabei jeweils, bezogen auf das

Referenzgenom PN40024 (12x), unterhalb (3'-Ende) des Farblokus homozygote Allele, so dass ein Screening der Nachkommen nur oberhalb (5'-Ende) des Farblokus stattfinden konnte (siehe Tabelle 8). Der Marker GF02-55 liegt ca. 180 kb vor Beginn des Farblokus. Eine eventuelle Rekombination innerhalb dieser verhältnismäßig kleinen Region sollte daher selten auftreten. Zur Absicherung wurden deshalb mehrere Genotypen selektiert, um alle Eventualitäten einer möglichen Rekombination bei späteren Analysen ausschließen zu können. Die Sorte 'Kerner' mit dem Farbklon 'Kernling' zeigte jedoch bei allen untersuchten SSR-Markern homozygote Allele, so dass in der Selbstungslinie kein optimales Screening hätte durchgeführt werden können und folglich auf eine Selbstung verzichtet wurde. Des Weiteren konnte auch 'Müller-Thurgau Rot' nicht geselbstet werden, da diese Farbmutante erst seit 2015 am Institut war und die jungen Pflanzen noch nicht blühten. Da bei der Weinrebe eine starke Inzuchtdepression vorliegt (Mullins *et al.*, 1992), wurde bei der Selektion der Sämlinge besonders auf ein gesundes Wachstum geachtet.

Tabelle 8: SSR-Markerprofil entlang Chromosom 2 der untersuchten Ausgangssorten. Homozygote Bereiche einzelner Sorten, die sich nicht zum Screening von homozygoten Selbstungslinien geeignet haben, sind rot hinterlegt.

Leitname	VMC6B11	VMC5G7	GF02-55	GF02-50	VMC8C2	VMC7G3	Zuchtstammnummer	Bemerkung
Elbling Weiß	89:104	198:216	215:217	160:160	147:147	114:114		
Elbling Rot	89:104	198:216	215:217	160:160	147:147	114:114	2014-267	
Kerner	89:89	216:216	215:215	160:160	147:147	114:114		kein Screening möglich
Kernling	89:89	216:216	215:215	160:160	147:147	114:114		
Müller-Thurgau Weiß	78:104	192:198	215:217	160:182	143:147	114:136		erst seit 2015 am Institut
Müller-Thurgau Rot	78:104	192:198	215:217	160:182	143:147	114:136		
Räuschling Weiß	89:104	198:216	215:217	160:182	143:147	114:136		
Räuschling Rot	89:104	198:216	215:217	160:182	143:147	114:136	2014-268	
Riesling Weiß	89:104	198:216	215:217	160:182	143:147	114:136	2013-321	
Riesling Rot	89:104	198:216	215:217	160:182	143:147	114:136	2013-322	
Riesling Rot Rückmutante	89:104	198:216	215:217	160:182	143:147	114:136	2014-271	
Silvaner Grün	89:104	198:216	215:217	160:160	147:147	114:114		
Silvaner Rot	89:104	198:216	215:217	160:160	147:147	114:114	2014-270	
Silvaner Blau	89:104	198:216	215:217	160:160	147:147	114:114	2014-269	

3.1.3. Die spezifischen Mutationen am Farblokus

3.1.3.1. `Müller-Thurgau Rot` und `Silvaner Rot`

Zu Beginn wurden alle untersuchten Farbmутanten auf bereits aus der Literatur bekannte Mutationen überprüft (Lijavetzky *et al.*, 2006; Pelsy, 2010). Dabei konnte für die Sorten `Müller-Thurgau Rot` und `Silvaner Rot` die bisher meist gefundene Mutation identifiziert werden (siehe Abbildung 16). Beide Sorten besitzen das schon von Kobayashi *et al.* (2004) beschriebene *MybA1b*-Allel.

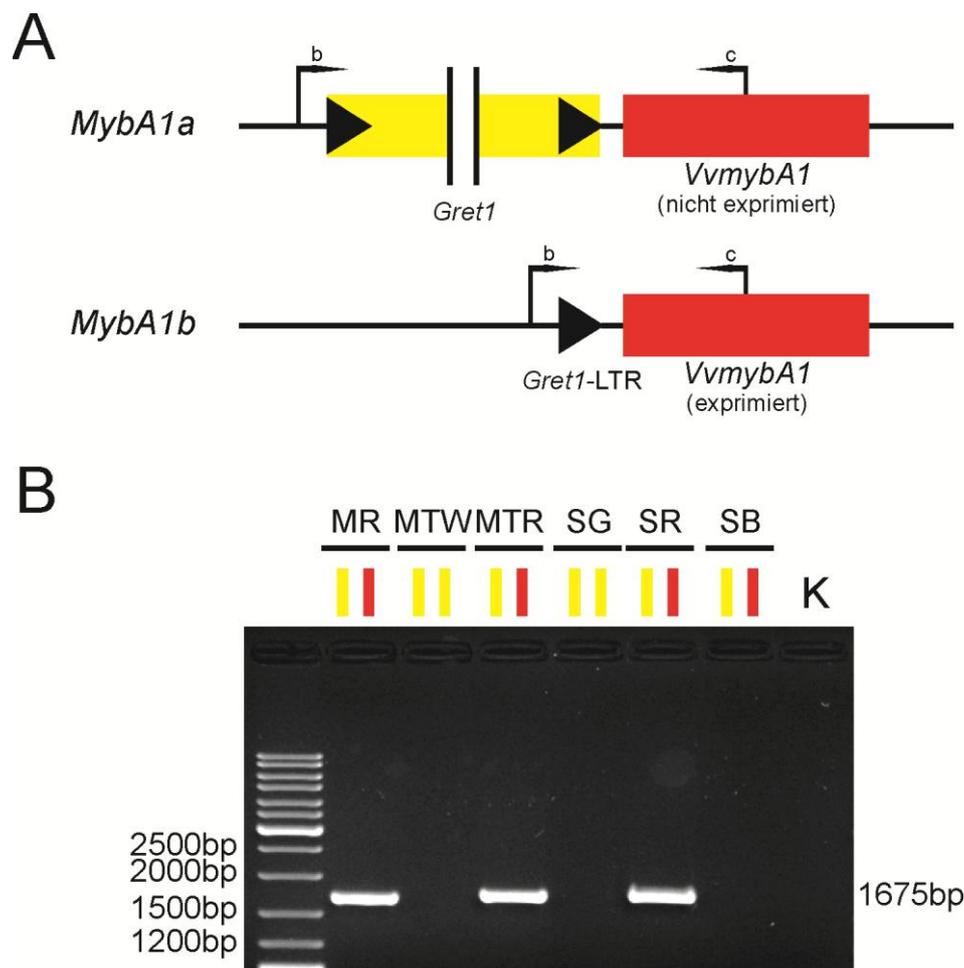


Abbildung 16: Die Mutation von `Müller-Thurgau Rot` und `Silvaner Rot`. (A) Schematische Darstellung des nicht funktionellen Allels *MybA1a* und des funktionellen Allels *MybA1b* mit den zum Nachweis verwendeten Primern nach Kobayashi *et al.* (2004). (B) Positives *MybA1b*-PCR-Ergebnis für `Müller-Thurgau Rot` und `Silvaner Rot`. Als Positivkontrolle für das *MybA1b*-Allel wurde `Muskateller Rot` (Giannetto *et al.*, 2008) verwendet. MR = `Muskateller Rot`; MTW = `Müller-Thurgau Weiß`; MTR = `Müller-Thurgau Rot`; SG = `Silvaner Grün`; SR = `Silvaner Rot`; SB = `Silvaner Blau`; K = Kontrolle ohne DNA; Balken geben jeweils die Haplotypen am Farblokus wieder (gelb = weißes Allel, rot = rotes Allel).

Der Primer b bindet dabei vor (5') dem Retrotransposon *Gret1* und der Primer c ungefähr in der Mitte von *VvmybA1*. Auf dem weißen Allel würde diese Primerkombination zu einem Produkt von über 11 kb führen und ist folglich in einer

normalen PCR nicht darstellbar. Auf dem mutierten *MybA1b*-Allel (*Gret1* wurde herausgeschnitten) befindet sich jedoch nur noch das 824 bp große LTR (Long Terminal Repeat) und ermöglicht den Nachweis in einer PCR (Bandengröße: 1675 bp). Da sich somit der getrennte *VvmybA1*-Promotor wieder in räumlicher Nähe zum Strukturgen befindet, ermöglicht diese Konstitution die Expression von *VvmybA1* und folglich die Farbbildung. 'Silvaner Blau' und die anderen Farbmутanten hingegen besitzen diese Mutation sowie die anderen in der Literatur beschriebenen Mutationen nicht.

3.1.3.2. 'Elbling Rot'

Nachdem bisherige Arbeiten sich hauptsächlich auf die Analyse von *VvmybA1* bezogen, wurde zur Charakterisierung der Mutation auch *VvmybA3* untersucht, da schon für die Sorte 'Benitaka' (Farbmутante von 'Italia') eine Farbmутation mit Beteiligung von *VvmybA3* (Rekombination mit *VvmybA1*) nachgewiesen werden konnte (Azuma *et al.*, 2009). Die Amplifikation von *VvmybA3* mittels PCR führte im Falle von 'Elbling Rot' zu einer Doppelbande (siehe Abbildung 17). Die obere neue Bande lag dabei etwa 250 bp über der erwarteten Bande für *VvmybA3*.

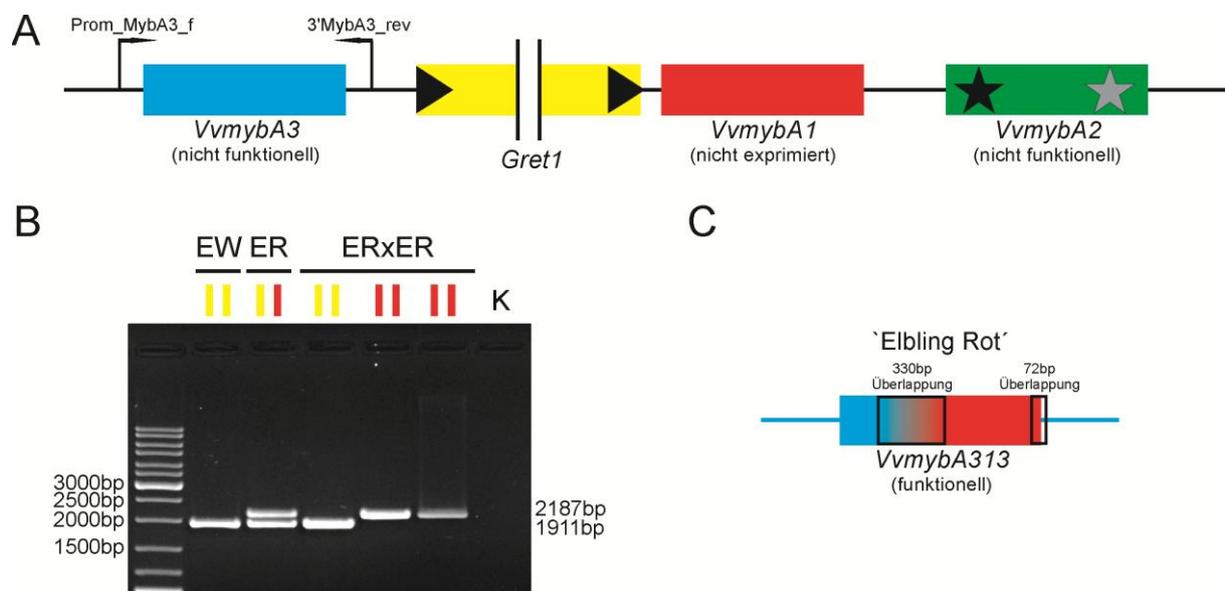


Abbildung 17: Die Mutation von 'Elbling Rot'. (A) Schematische Darstellung des ursprünglichen weißen Farblokus mit den zum Screening von *VvmybA3* verwendeten Primern. (B) PCR-Ergebnis für 'Elbling Rot' sowie der homozygoten Selbstungslinie. EW = 'Elbling Weiß'; ER = 'Elbling Rot'; ERxER = homozygote Selbstungslinie von 'Elbling Rot'; K = Kontrolle ohne DNA; Balken geben jeweils die Haplotypen am Farblokus wieder (gelb = weißes Allel, rot = rotes Allel). (C) Schematische Darstellung der in 'Elbling Rot' gefundenen *mybA*-Genvariante *VvmybA313* anhand Amplikon-Sequenzierung.

Anhand der Amplifikation in den homozygoten Selbstungen wurde das Fragment sequenziert (2187 bp), und konnte als eine neue *mybA*-Genvariante identifiziert werden (siehe Abbildung 17C). Durch Rekombination großer Teile des funktionellen ORF von *VvmybA1* mit dem nicht funktionellen Bereich von *VvmybA3* wurde ein größerer Bereich ersetzt. Hierbei können zwei überlappende Bereiche (jeweils 330 bp und 72 bp) aufgrund der identischen Sequenz von *VvmybA1* und *VvmybA3* in dem Bereich nicht eindeutig einem Genursprung zugewiesen werden. Das in *VvmybA3* auftretende frühe Stopcodon ist in dieser Variante nicht mehr vorhanden, so dass hier ein funktionelles Protein entstehen kann, um anschließend die Anthocyanbildung über die Induktion von *VvUFGT* einzuleiten.

3.1.3.3. `Kernling` und `Räuschling Rot`

In den Sorten `Kernling` und `Räuschling Rot` konnten rein anhand von Größenunterschieden mittels PCR keine Unterschiede am Farblokus identifiziert werden, jedoch führte die Sequenzierung des *VvmybA2*-Amplikons zur Identifikation zweier neuer *VvmybA2*-Allelvarianten (siehe Abbildung 18). Die Sequenzierung des Allels von `Räuschling Rot` erfolgte auch hier über die homozygote Selbstungslinie.

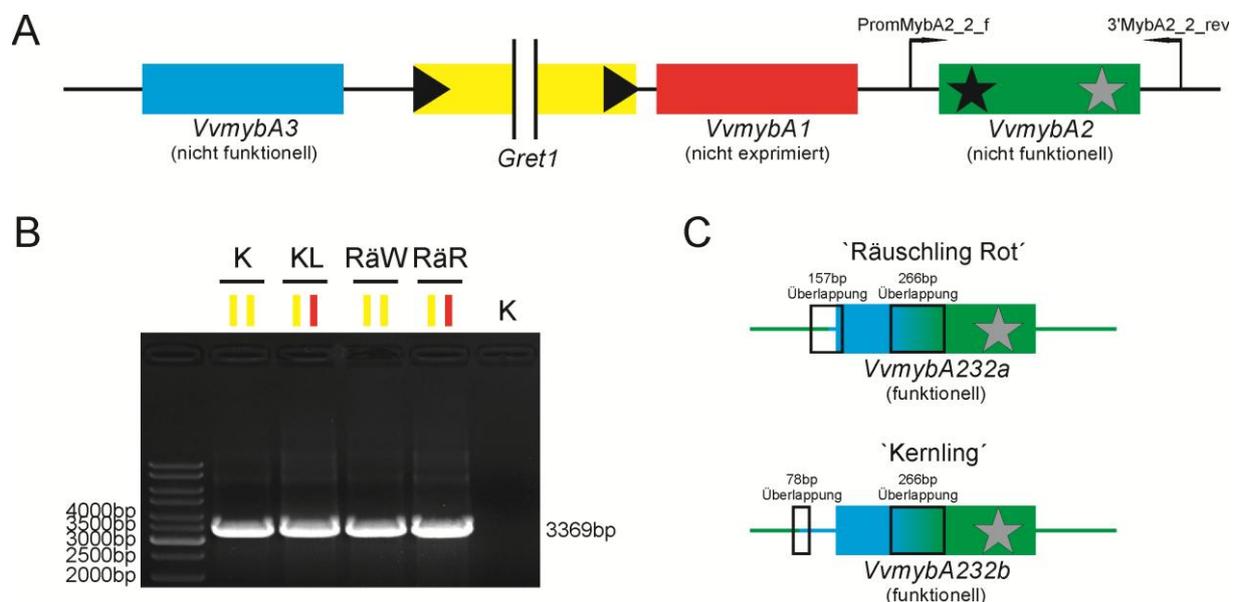


Abbildung 18: Die Mutation von `Kernling` und `Räuschling Rot`. (A) Schematische Darstellung des ursprünglichen weißen Farblokus mit den zum Screening von *VvmybA2* verwendeten Primern. (B) PCR-Ergebnis für `Kernling` und `Räuschling Rot`. K = `Kerner`; KL = `Kernling`; RÄW = `Räuschling Weiß`; RÄR = `Räuschling Rot`; K = Kontrolle ohne DNA; Balken geben jeweils die Haplotypen am Farblokus wieder (gelb = weißes Allel, rot = rotes Allel). (C) Schematische Darstellung der in `Kernling` und `Räuschling Rot` gefundenen *mybA*-Genvarianten *VvmybA232a* und *VvmybA232b* anhand Amplikon-Sequenzierung.

Da für 'Kernling' keine Selbstungslinie erstellt wurde, erfolgte die Identifikation der Sequenz des Allels über Secondary peak calling anhand des sequenzierten Amplikons beider Haplophasen. Da sich beide Sequenzen kaum unterscheiden (siehe Anhang 4) und die ursprüngliche Sequenz bekannt war, konnte ohne Schwierigkeiten die genaue Sequenz bestimmt werden. Beide Allelvarianten (*MybA232a* und *MybA232b*) entstanden vermutlich durch einen vergleichbaren Mechanismus des für 'Elbling Rot' gefundenen Allels. Ein 5'-Fragment des *VvmybA3*-ORFs mit einem Teil des Promotors ersetzte durch Rekombination einen Bereich der nicht funktionellen *VvmybA2*-Variante. Wie schon in Walker *et al.* (2007) beschrieben, führen im Falle der nicht funktionellen Variante von *VvmybA2* beide Mutationen wahrscheinlich in Kombination zu einem nicht funktionellen Protein. Durch die Mutation in 'Kernling' und 'Räuschling Rot' wird nur die Mutation im 5'-Bereich komplementiert, so dass hier wahrscheinlich ein teilfunktionelles Protein entstehen kann. Generell unterscheiden sich beide Allele dabei nur durch die Länge des ersetzten Bereiches des Promotors. In der 'Kernling'-Sequenz befindet sich dabei eindeutig ein *VvmybA3*-Fragment. In 'Räuschling Rot' hingegen ist aufgrund der großen Sequenzhomologie von *VvmybA2* und *VvmybA3* im Promotorbereich ein *VvmybA3*-Fragment nicht zwingend vorhanden. Die komplette Sequenz des ORFs beider Allele ist dabei identisch.

3.1.3.4. 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau'

Zu Beginn konnte für 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' trotz der Analyse von *VvmybA1*, *VvmybA2* und *VvmybA3* keine Mutation am Farblokus gefunden werden. Jedoch konnten durch die gleiche Analyse der homozygoten Selbstungslinien Bereiche am Farblokus identifiziert werden, die in einer Haplophase nicht mehr nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 19B Primerkombination 1+2 sowie 3+4). Es fehlte jeweils der hintere 3'-Bereich von *VvmybA3* sowie der vordere *Gret1*-bezogene 5'-Bereich von *VvmybA1*. Da gerade bei einem Gen der vordere und bei einem anderen Gen der hintere Bereich nicht nachweisbar waren, wurde mit der Primerkombination 5+6 auf eine komplette Rekombination beider Varianten innerhalb des Lokus getestet (siehe Abbildung 19B Primerkombination 5+6). Diese Primerkombination liegt auf der Referenzsequenz PN40024 (12x) ca. 70 kb auseinander und führte aber in 'Riesling Rot', 'Silvaner Blau' sowie den

homozygoten Selbstungen jeweils in einer Haplophase zu einem PCR-Produkt. Aufgrund der großen Homologie der *VvmybA*-Gene innerhalb des Farblokus, wurde durch diese Primerkombination auch das *MybA1b*-Allel von `Silvaner Rot` amplifiziert, was jedoch durch die Größenunterschiede differenziert werden kann (siehe Abbildung 19B Primerkombination 5+6).

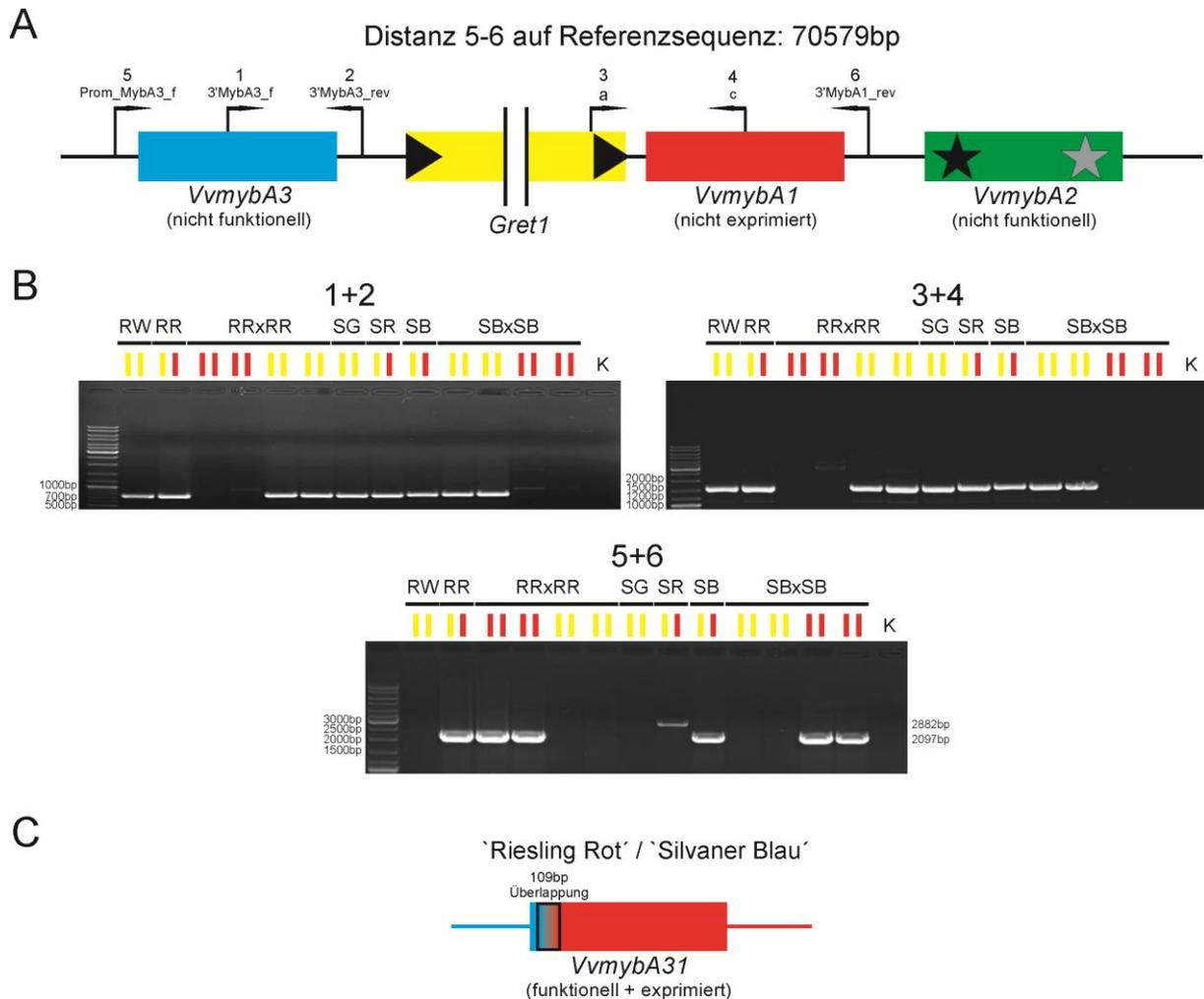


Abbildung 19: Die Mutation von `Riesling Rot` und `Silvaner Blau`. (A) Schematische Darstellung des ursprünglichen weißen Farblokus mit den zum Screening verwendeten Primern 1-6. (B) PCR-Ergebnisse für `Riesling Rot` und `Silvaner Blau` sowie den homozygoten Selbstungslinien für die PCR-Kombinationen 1+2, 3+4 sowie 5+6. RW = `Riesling Weiß`; RR = `Riesling Rot`; RRxRR = homozygote Selbstungslinie von `Riesling Rot`; SG = `Silvaner Grün`; SR = `Silvaner Rot`; SB = `Silvaner Blau`; SBxSB = homozygote Selbstungslinie von `Silvaner Blau`; K = Kontrolle ohne DNA; Balken geben jeweils die Haplotypen am Farblokus wieder (gelb = weißes Allel, rot = rotes Allel). (C) Schematische Darstellung der in `Riesling Rot` und `Silvaner Blau` gefundenen *mybA*-Genvariante *VvmybA31* anhand der Sequenzierung des Amplikons der Primerkombination 5+6.

Die Sequenzierung der Amplikons (2097 bp) aus `Riesling Rot` und `Silvaner Blau` führte jeweils zur gleichen neuen *mybA*-Genvariante, die aufgrund ihrer Struktur *VvmybA31* genannt wurde. Durch komplette Rekombination von *VvmybA1* und *VvmybA3* entstand hier eine Allelvariante bei der sich der ORF nur durch eine

Punktmutation vom ursprünglichen *VvmybA1*-ORF unterscheidet (siehe Anhang 3). Der komplette Promotorbereich stammt jedoch von *VvmybA3*. Da nachweislich bestimmte Bereiche der mutierten Haplophase in beiden Farbmутanten fehlten, wurden SSR-Marker entwickelt, die speziell den Bereich zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* abdeckten. Die Analyse ergab, dass in beiden Sorten der komplette Bereich zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* zu fehlen schien (siehe Tabelle 9). Alle vier Marker (GF2-68, GF2-69, GF2-70, GF2-72) die zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* amplifiziert werden, konnten jeweils in den homozygoten Selbstungen mit Mutation nicht nachgewiesen werden. Da 'Riesling Rot' sowie 'Silvaner Blau' jeweils noch heterozygot die nicht funktionelle Variante besitzen, konnte dies folglich dort nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass in der Selbstungslinie der 'Riesling Rot'-Rückmutante der fehlende Bereich wieder nachweisbar ist. Deshalb ist davon auszugehen, dass durch die Rückmutation zu weiß die ursprüngliche Konstitution am Farblokus wieder hergestellt wurde.

Tabelle 9: Überprüfung des in 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' nicht mehr vorhandenen Bereichs (= Deletion) des roten Allels mittels SSR-Markern. SSR-Marker von links nach rechts geben die relative Position entlang des Farblokus wieder.

Homozygote Selbstungslinie von	Genotyp	GF02-61	GF02-62	<i>VvmybA31</i>	<i>VvmybA1a</i>	GF02-68	GF02-69	GF02-70	GF02-72	<i>VvmybA3</i>	VVNTM5	VVNTM6
	Riesling Weiß	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	Riesling Rot	286	385	x	x	390	451	424	248	x	294	148
Riesling Rot	2013-322-05	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2013-322-06	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2013-322-07	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2013-322-08	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2013-322-09	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2013-322-10	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2013-322-11	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2013-322-12	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
Riesling Rot Rückmutante	2014-271-1	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-2	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-3	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-4	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-5	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-6	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-7	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-271-8	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	Silvaner Grün	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	Silvaner Blau	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	Silvaner Rot	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
Silvaner Blau	2014-269-1	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-269-2	286	385	-	x	390	451	424	248	x	294	148
	2014-269-3	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2014-269-4	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2014-269-5	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148
	2014-269-6	286	385	x	-	-	-	-	-	-	294	148

Um das komplette mutierte Allel auf Sequenzebene darzustellen, wurde eine BAC-Bank für 'Riesling Rot' erstellt, BAC-Klone mit den entsprechenden Haplophasen (rot und weiß) wurden am Farblokus selektiert und mit MiSeq (2x250 bp paired-end reads, ca. 100x Coverage) sequenziert. Die Sequenzierung des „roten“ BACs bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse. Der komplette Bereich zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* fehlt in der mutierten Haplophase in 'Riesling Rot' (siehe Abbildung 20).

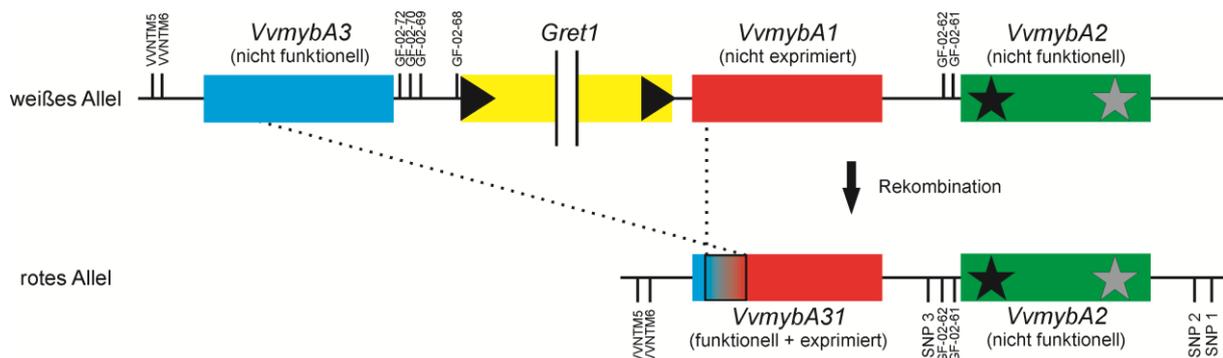


Abbildung 20: Schematische Darstellung der beiden Haplophasen am Farblokus von 'Riesling Rot' anhand einer BAC-Sequenzierung. Die zum Screening verwendeten SSR-Marker sowie SNPs im Vergleich zur Referenzsequenz PN40024 (12x) sind angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen die eventuelle Rekombinationsstelle an.

Die genaue Lage sowie die Positionen der gefundenen SNPs im Vergleich zur Referenzsequenz PN40024 (12x) ist in Anhang 2 aufgeführt. Für 'Silvaner Blau' liegt hierzu keine Sequenzinformation vor, jedoch zeigte 'Silvaner Blau' die gleiche Mutation sowie die gleichen, durch SSR-Marker zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3*, nachgewiesenen Lücken, so dass auch hier von einer identischen Struktur des Lokus ausgegangen werden kann. Die Sequenzierung des „weißen“ BACs zeigte keine Unterschiede im Vergleich zur Referenzsequenz PN40024 (12x) (siehe Anhang 1). Die zwei gefundenen Mutationen befinden sich beide in repetitiven Elementen, die durch die Verrechnung der MiSeq-Rohdaten zustande gekommen sein könnten, und wurden deshalb nicht weiter beachtet. Zusammenfassend ist zu sagen, dass im Gegensatz zu den bisher gefundenen Mutationen es im Falle von 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' zu einer kompletten Neustrukturierung des Farblokus kam, der nun ca. 69 kb kürzer ist im Vergleich zur ursprünglichen Haplophase, was möglicherweise in Zusammenhang mit den beobachteten Rückmutationen steht.

3.1.3.5. Vergleichende Sequenzanalysen

Die gefundenen Allele der Farbmутanten konnten anhand des Hauptanteils des ORFs in *VvmybA1*- sowie *VvmybA2*-bedingte Mutationen gruppiert werden. So ist die putative Aminosäuresequenz des *MybA313*-Allels aus 'Elbling Rot' identisch zu dem in 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' gefundenen *MybA31*-Allel (siehe Abbildung 21A), obwohl der Mutationsursprung verschieden ist und die komplette Gensequenz deutlich mehr Mutationen aufweist (siehe Anhang 3).

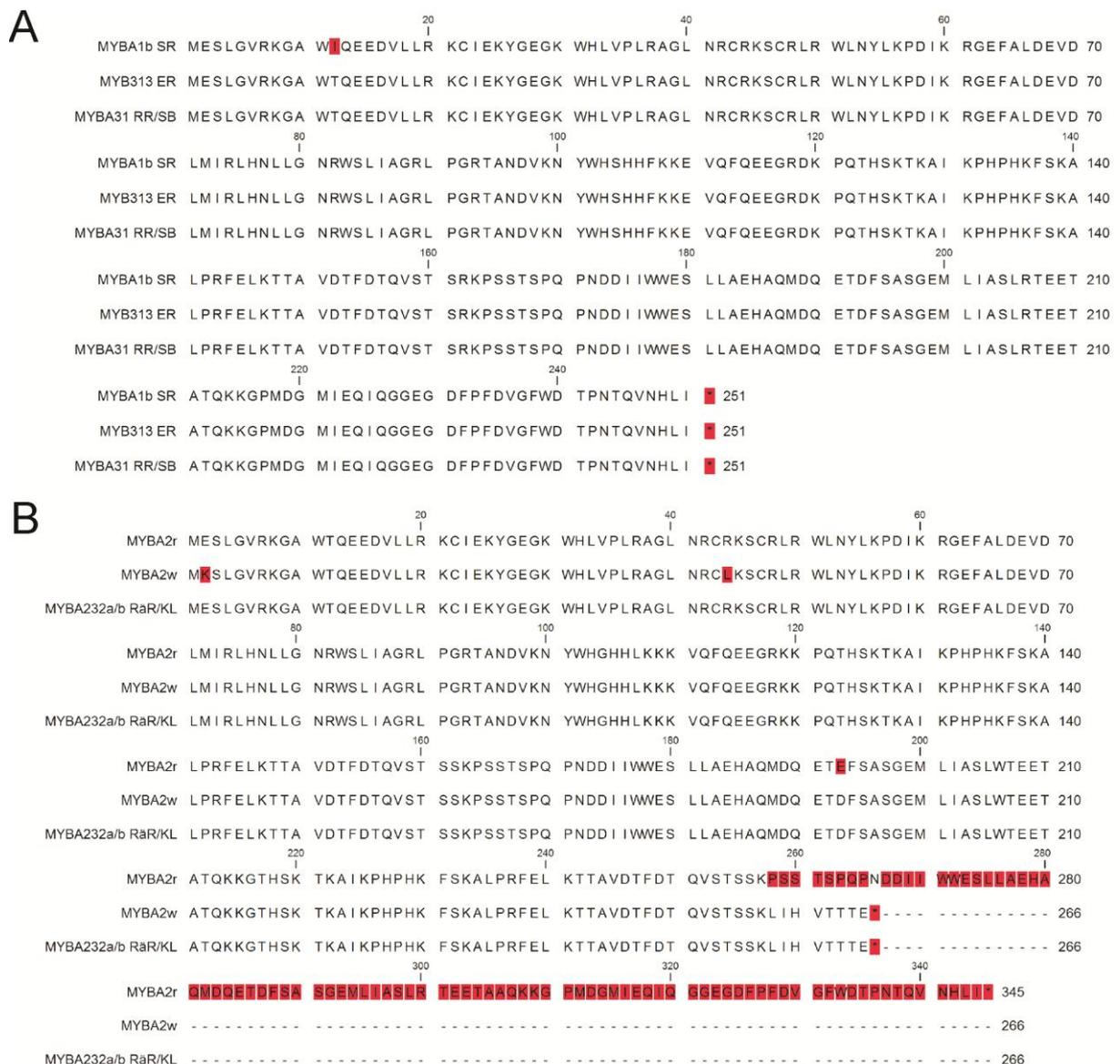


Abbildung 21: Aminosäuresequenz-Alignments der mutierten *mybA*-Genvarianten. Intron-Exon-Strukturbestimmung anhand Kobayashi *et al.* (2004) und Wong *et al.* (2016). Unterschiede sowie Stopcodons sind rot hinterlegt. (A) Alignment der *mybA1*-Genvarianten aus 'Silvaner Rot' (SR), 'Elbling Rot' (ER), 'Riesling Rot' (RR) und 'Silvaner Blau' (SB). (B) Alignment der *mybA2*-Genvarianten aus 'Räuschling Rot' (RÄR) und 'Kernling' (KL) im Vergleich zur nicht funktionellen Variante MYBA2w und zur funktionellen Variante MYBA2r (Walker *et al.*, 2006).

Beide Sequenzen weisen im Verhältnis zur MYBA1b-Sequenz aus 'Silvaner Rot' nur eine Mutation auf. An Position 12 der Aminosäuresequenz befindet sich bedingt durch eine Punktmutation ein T (Threonin) anstatt eines I (Isoleucin). Da diese Mutation in der R2-Domäne auch in der funktionellen MYBA2r-Variante von 'Cabernet Sauvignon' zu finden ist (siehe Abbildung 21B), sollte diese Mutation keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben. Die gefundenen *VvmybA2*-bezogenen Mutationen aus 'Räuschling Rot' (*VvmybA232a*) und 'Kernling' (*VvmybA232b*) weisen in ihrer Aminosäuresequenz zueinander keine Veränderungen auf, jedoch unterscheiden sie sich an zwei Stellen zur Sequenz von der ursprünglichen Variante MYBA2w. An Position 2 E (Glutaminsäure) zu K (Lysin) sowie an Position 44 L (Leucin) zu R (Arginin). Letztere Mutation steht in Zusammenhang mit der nicht-Funktionalität von MYBA2w (Walker *et al.*, 2007). Beide Veränderungen sind auch in der funktionellen MYBA2r-Variante von 'Cabernet Sauvignon' zu finden und stehen folglich in direktem Zusammenhang mit der Wiederherstellung der Funktionalität von MYBA232a und MYBA232b. Zur MYBA2r-Variante gibt es, bis auf den Verlust der C-terminalen Domäne (CR2), nur einen Unterschied in der Aminosäuresequenz an der Position 193 E (Glutaminsäure) zu D (Asparaginsäure).

3.1.3.6. Haplophasenzusammensetzung

In den vorangegangenen Analysen wurde jeweils direkt nach Mutationen am Farblokus gesucht, die in Zusammenhang mit der Farbbildung standen. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche unentdeckte SNPs oder kleinere Indels, besonders im Falle von *VvmybA2* und *VvmybA3*, die zur Funktionalität hätten führen können, zusätzlich auftreten. Deshalb wurden mit Hilfe der homozygoten Selbstungslinien die drei *mybA*-Gene beider Haplophasen sequenziert, um so die kompletten Haplotypen darstellen zu können (Abbildung 22). Dabei konnte bestätigt werden, dass alle untersuchten Farbmutanten keine zusätzlichen Mutationen in den *mybA*-Genen des Farblokus besitzen. Lediglich für 'Kernling' und 'Müller-Thurgau Rot' kann, da keine homozygoten Selbstungslinien erstellt wurden, nicht ausgeschlossen werden, dass auf einer Haplophase gewisse Bereiche (analog zu 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau') fehlen. Jedoch ist nicht davon

auszugehen, da die jeweils vergleichbaren Mutationen in 'Räuschling Rot' und 'Silvaner Rot' auch zu keiner strukturellen Veränderung des Lokus geführt haben.

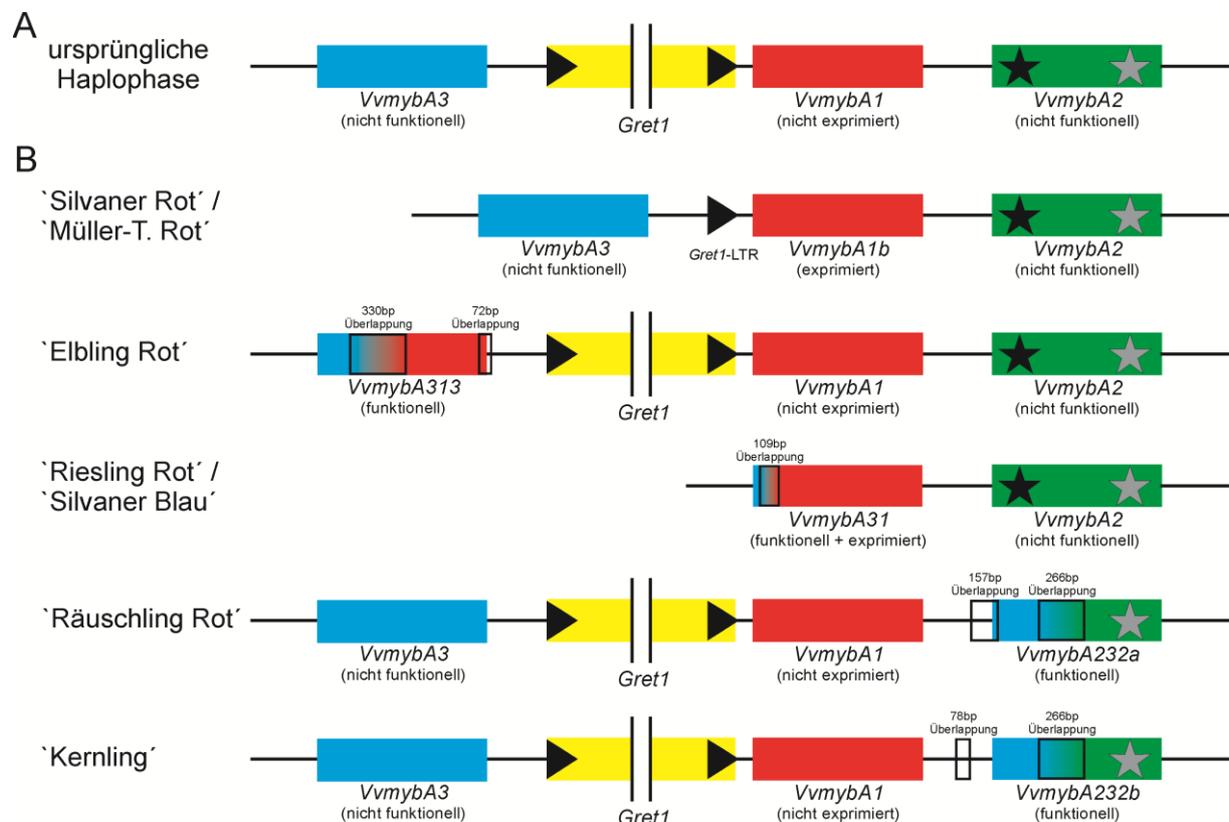


Abbildung 22: Übersicht der kompletten Haplophasen in den untersuchten Farbmутanten anhand Amplikon-Sequenzierungen. (A) Ursprüngliche Haplophase die in allen Farbmутanten noch heterozygot vorhanden ist. (B) Schematische Darstellung der mutierten Haplophasen.

3.1.4. Abstammungsrichtungen

Eine zentrale Frage, die es in diesem Projekt zu beantworten galt, war die Klärung der Abstammungsrichtungen, im Besonderen, aufgrund der Relevanz im deutschen Weinbau, die der beiden 'Riesling'-Varianten. Wohingegen bei den Neuzüchtungen 'Kerner' und 'Müller-Thurgau Weiß' eindeutig klar ist, dass die weißen Formen zuerst da waren, da die roten Formen erst Ende des letzten Jahrhunderts selektiert wurden, war vor allem bei 'Riesling Rot', bedingt durch die häufig vorkommenden Rückmutationen zu weiß, die Abstammungsrichtung unklar. Durch die eindeutige Zuweisung der jeweiligen Mutationen zu einer Haplophase war es möglich in den untersuchten Sorten zu bestimmen, von welchem Elternteil diese Haplophasen ursprünglich abstammen. Dazu wurden die SSR-Markerergebnisse, die für das Screening bzgl. der Überprüfung der Homozygotie am Farblokus erhoben wurden, auch in den Eltern überprüft, um eindeutig zu bestimmen, welche Haplophase jeweils

von welchem Elternteil vererbt wurde. Außer für 'Räuschling Rot' konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Mutations-tragenden Haplophasen ursprünglich von den bekannten weißbeerigen Vorfahren abstammen. Folglich mussten die weißen Varianten zuerst da gewesen sein, da für die Elternsorten keine Farbmutanten mit vergleichbaren Mutationen beschrieben sind, die durch Kreuzung die Mutationen hätten vererben können (siehe Abbildung 23).

A

SSR-Marker	'Heunisch Weiß'		'Elbling Rot'		'Räuschling Rot'		'Riesling Rot'	
	Haplophase 1	Haplophase 2	Haplophase 1	Haplophase 2	Haplophase 1	Haplophase 2	Haplophase 1	Haplophase 2
VMC6B11	104	104	104	89	89	104	104	89
VMC5G7	198	198	198	216	216	198	198	216
GF02-55	217	217	217	215	215	217	217	215
GF02-50	160	182	160	160	160	182	182	160
VMC8C2	147	143	147	147	147	143	143	147
VMC7G3	114	136	114	114	114	136	136	114
Haplophasen Herkunft	-	-	'Heunisch Weiß'	2. Elter	2. Elter	'Heunisch Weiß'	'Heunisch Weiß'	2. Elter

SSR-Marker	'Österreichisch Weiß'		'Traminer Weiß'		'Silvaner Blau'		'Silvaner Rot'	
	Haplophase 1	Haplophase 2	Haplophase 1	Haplophase 2	Haplophase 1	Haplophase 2	Haplophase 1	Haplophase 2
VMC6B11	104	104	89	89	104	89	104	89
VMC5G7	198	198	216	216	198	216	198	216
GF02-55	217	217	215	215	217	215	217	215
GF02-50	160	160	160	160	160	160	160	160
VMC8C2	147	147	147	147	147	147	147	147
VMC7G3	114	114	114	114	114	114	114	114
Haplophasen Herkunft	-	-	-	-	'Ö. Weiß'	'Traminer Weiß'	'Ö. Weiß'	'Traminer Weiß'

Haplophase mit Mutation Haplophase ohne Mutation

B

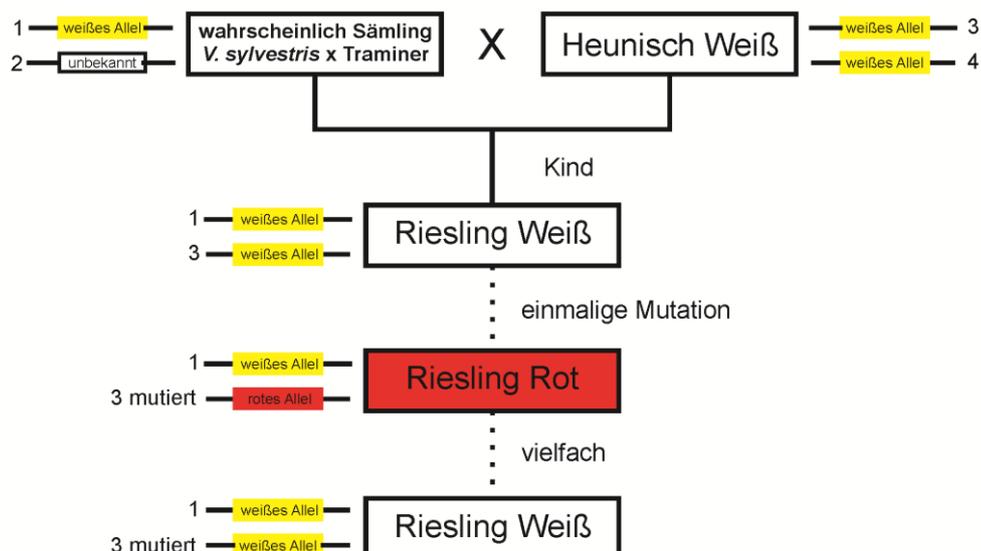


Abbildung 23: Bestimmung der Abstammungsrichtungen der untersuchten Farbmutanten. (A) Haplophasenzuordnung anhand der homozygoten Selbstungslinien mittels SSR-Markerdaten entlang Chromosom 2. (B) Schematische Darstellung des 'Riesling'-Stammbaums anhand der bisherigen Ergebnisse.

Hätte z.B. in 'Riesling Rot' die mutierte Haplophase vom zweiten unbekanntem Elternteil abstammt, hätte nicht ausgeschlossen werden können, dass die Mutation vererbt worden wäre und folglich 'Riesling Rot' zuerst dagewesen wäre. Obwohl die Abstammungsrichtung für 'Räuschling Rot' nicht eindeutig geklärt werden konnte, da die mutierte Haplophase vom unbekanntem zweiten Elternteil abstammt, ist jedoch im Verlauf der letzten Jahrhunderte ausschließlich von der weißbeerigen Form die Rede (Babo, 1844; Bock, 1595; Viala & Vermorel, 1905), so dass auch hier davon auszugehen ist, dass die rote Form, analog zu 'Kernling', erst deutlich später entstand.

3.1.5. Genexpressionanalyse des Anthocyan-Biosynthesewegs

Zur Charakterisierung der jeweiligen Farbmutanten wurde überprüft, ob die gefundenen mutierten *mybA*-Genvarianten eine Reife-bedingte Expression zeigen und wie sich die Expression auf weitere im Anthocyan-Biosyntheseweg befindliche Gene auswirkt. Dazu wurden vier Wochen nach *Véraison* (erwartete maximale Expression der *mybA*-Gene abgeleitet von Czermel *et al.* (2012)) Beerenhautproben der Farbmutanten und ihren weißen Ursprungssorten genommen, RNA extrahiert und mittels qRT-PCR die relative Expression bestimmt. Für die *VvmybA1*-bezogenen Allele *MybA1b*, *MybA31* und *MybA313* wurde ein Primerpaar entwickelt, das spezifisch an alle drei *VvmybA1*-Varianten bindet. So konnte in einem Ansatz bestätigt werden, dass vier Wochen nach *Véraison* in den Farbmutanten 'Riesling Rot', 'Elbling Rot', 'Silvaner Blau' und 'Silvaner Rot' die mutierten Allele im Vergleich zu den weißen Ursprungssorten exprimiert werden (siehe Abbildung 24A). Zur Analyse der *VvmybA2*-bezogenen Allele aus 'Kernling' und 'Räuschling Rot' wurde ein Primerpaar entwickelt, das im 5'-Bereich an *VvmybA3* und im 3'-Bereich an *VvmybA2* bindet und folglich spezifisch für den Expressionsnachweis dieser Allelvarianten genutzt werden kann (siehe Abbildung 24B). In allen Fällen zeigten die Farbmutanten eine signifikant erhöhte Expression der jeweiligen mutierten *mybA*-Allele im Vergleich zu ihren weißen Ursprungssorten. Dies spiegelte sich auch in der relativen Expression von *VvUGT* wieder, die auch in allen Farbmutanten signifikant erhöht war (siehe Abbildung 25) und mit der Expression der jeweiligen mutierten Allele korrelierte ($R^2 = 0,6739$). Die Expression von *VvmybA2* und *VvmybA3* war dabei stark sortenabhängig. Jedoch konnte im Falle von *VvmybA3* in den

Farbmutanten `Riesling Rot` und `Elbling Rot` eine signifikant geringere Expression festgestellt werden. Da beide Farbmutanten bedingt durch ihre Mutation bzgl. der ursprünglichen *VvmybA3*-Variante heterozygot sind, ist dieses Ergebnis kohärent. Für `Silvaner Blau` hingegen konnte diese Korrelation nicht nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf die niedrige Expression von `Silvaner Grün` im Verhältnis zu `Silvaner Rot` zurückzuführen. Für `Kernling` und `Räuschling Rot` wäre auch, im Verhältnis zu den weißen Ursprungsorten, eine verringerte *VvmybA2*-Expression zu erwarten gewesen, jedoch amplifiziert die verwendete Primerkombination als „off-target“ auch die *VvmybA232*-Varianten beider Sorten.

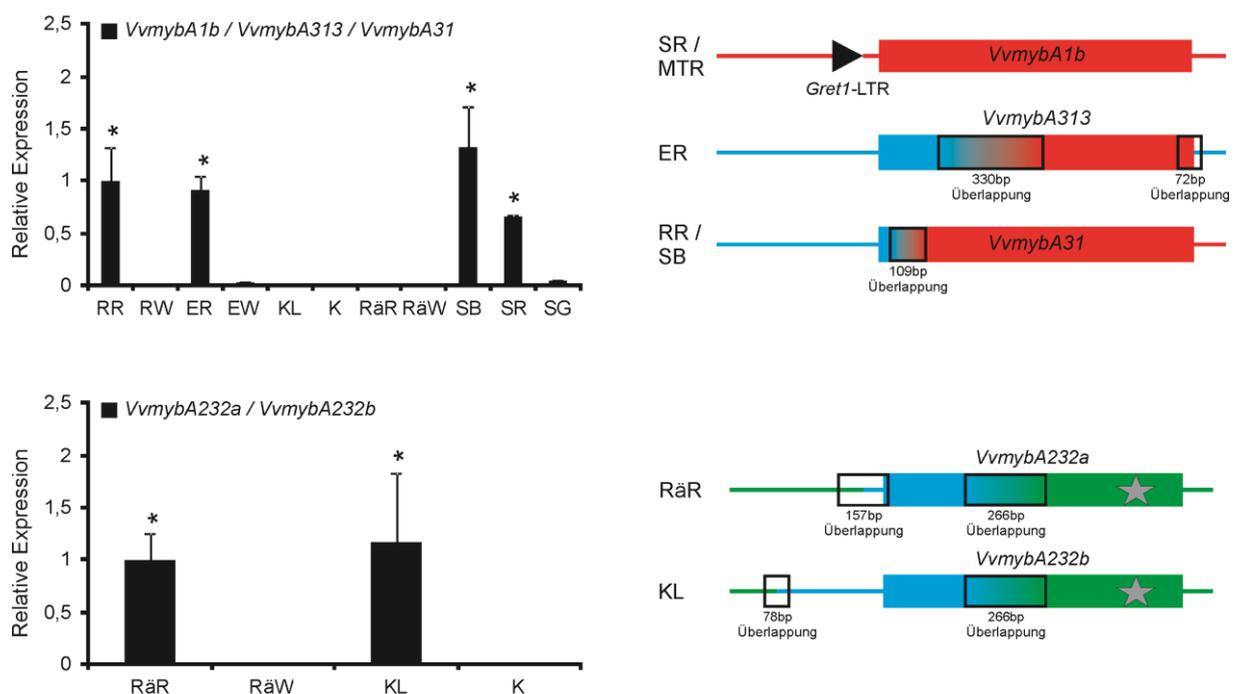


Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der mutierten Allelvarianten durch qRT-PCR in der Beerenhaut vier Wochen nach Véraison. Angegeben ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von `Riesling Rot` (oben) und `Räuschling Rot` (unten). Ein Stern gibt die Signifikanz zwischen Farbmutante und weißbeeriger Ursprungsorte an. Die Bestimmung erfolgte anhand eines nichtparametrischen Permutationstests mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. RR = `Riesling Rot`; RW = `Riesling Weiß`; ER = `Elbling Rot`; EW = `Elbling Weiß`; KL = `Kernling`; K = `Kerner`; RäR = `Räuschling Rot`; RäW = `Räuschling Weiß`; SB = `Silvaner Blau`; SR = `Silvaner Rot`; SG = `Silvaner Grün`.

Betrachtet man die Expression von *VvF3'H*, so konnte, wie in Bogs *et al.* (2006) beschrieben, bestätigt werden, dass dieser Teil des Anthocyan-Biosynthesewegs, der zu den helleren 3'-OH-Anthocyanen Cyanidin-3-O-glucosid und Peonidin-3-O-glucosid führt, auch in weißen Sorten aktiv war und die Expression sortenabhängig deutlich variierte. Im Gegensatz dazu war die Expression von *VvF3'5'H*, die zu den

drei dunkleren 3'5'-OH-Anthocyanen führt, nicht in den weißen Sorten sowie 'Elbling Rot', 'Kernling' und 'Räuschling Rot' nachzuweisen. So war nur bei 'Riesling Rot', 'Silvaner Blau' und 'Silvaner Rot' eine Expression feststellbar. Die Expression der O-Methyltransferasen (*VvOMT*) hingegen, die den Umbau von Cyanidin-3-O-glucosid zu Peonidin-3-O-glucosid sowie Delphinidin-3-O-glucosid zu Petunidin-3-O-glucosid und Malvidin-3-O-glucosid bewerkstelligen, war nur in 'Riesling Rot', 'Silvaner Blau' und schwach in 'Elbling Rot' und 'Silvaner Rot' nachweisbar jedoch nicht in 'Kernling' und 'Räuschling Rot'.

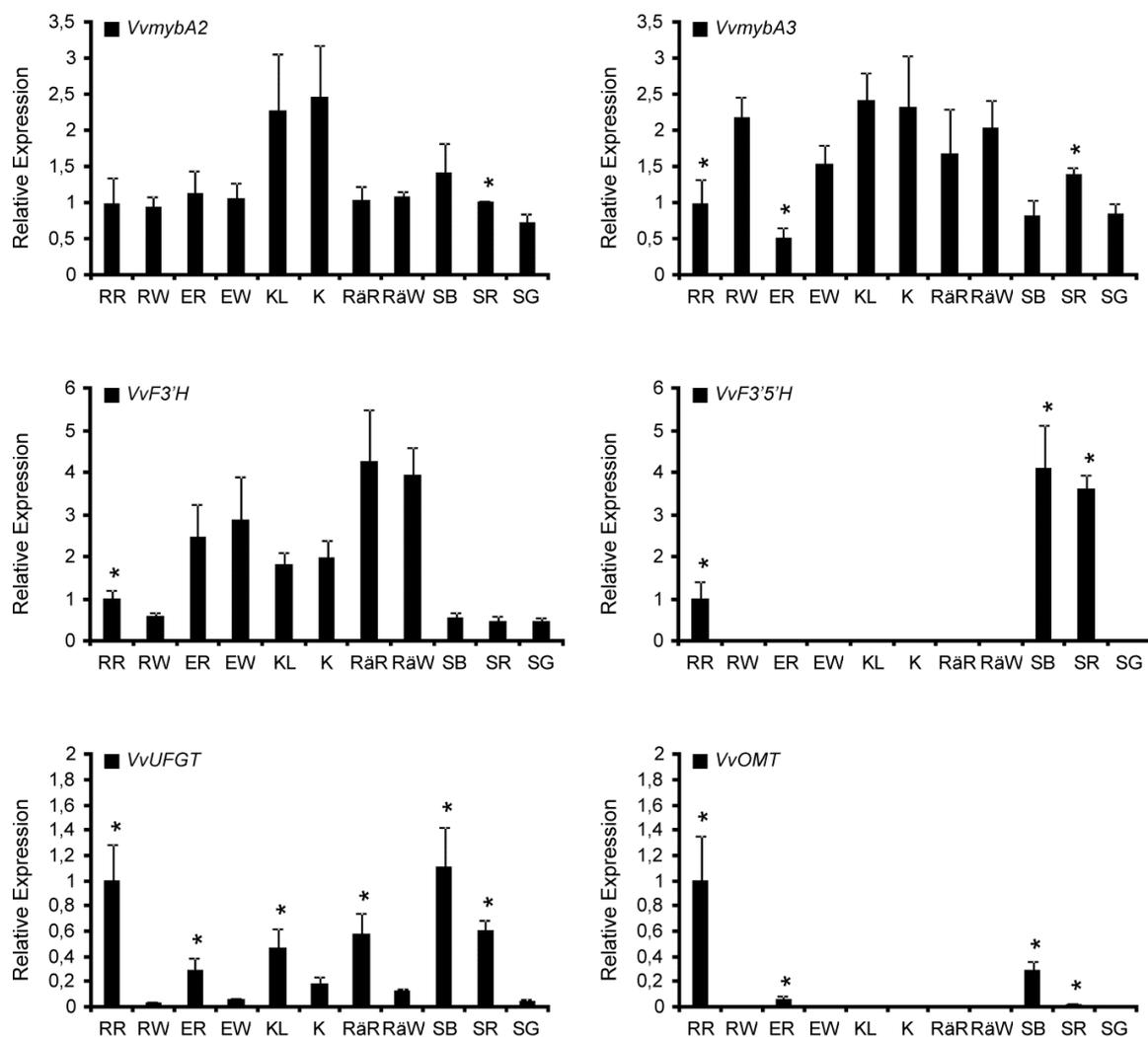


Abbildung 25: Genexpressionsanalyse des Anthocyan-Biosynthesewegs durch qRT-PCR in der Beerenhaut vier Wochen nach Véraison. Angegeben ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von 'Riesling Rot'. Ein Stern gibt die Signifikanz zwischen Farbmutter und weißbeeriger Ursprungsorte an. Die Bestimmung erfolgte anhand eines nichtparametrischen Permutationstests mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. RR = 'Riesling Rot'; RW = 'Riesling Weiß'; ER = 'Elbling Rot'; EW = 'Elbling Weiß'; KL = 'Kernling'; K = 'Kerner'; RÄR = 'Räuschling Rot'; RÄW = 'Räuschling Weiß'; SB = 'Silvaner Blau'; SR = 'Silvaner Rot'; SG = 'Silvaner Grün'.

3.1.6. Anthocyankonzentrationen und -profile

Schon vorangegangene Arbeiten zeigten, dass sich Rebsorten stark in den Anthocyankonzentrationen sowie -kompositionen unterscheiden können (Balík *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2008; Mattivi *et al.*, 2006). Gerade die roten Sorten wiesen dabei eine große Diversität auf, jedoch konnten keine Korrelationen bzgl. der jeweiligen Mutationen gezogen werden. In dieser Arbeit ließen sich die gefundenen Mutationen, aufgrund ihrer Struktur, grob in *VvmybA1*- oder *VvmybA2*-bezogene Mutationen unterteilen. Anhand der Anthocyankonzentrationen sowie -kompositionen ließen sich beide Mutationstypen eindeutig unterscheiden (siehe Abbildung 26).

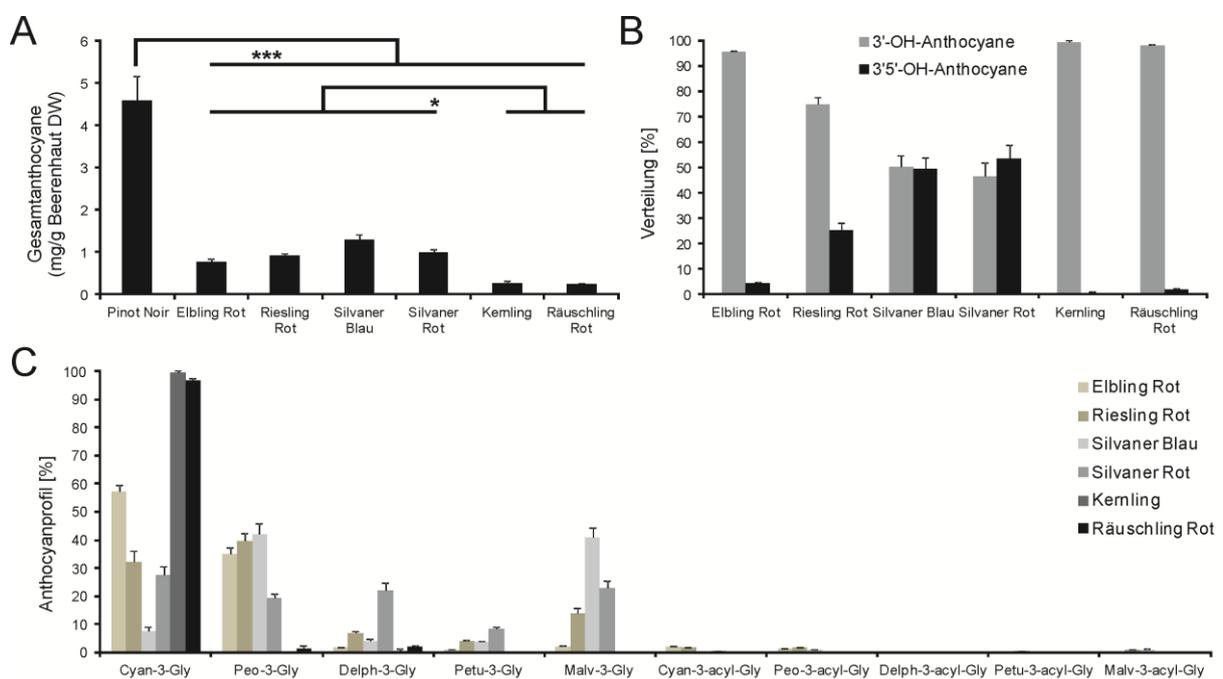


Abbildung 26: Anthocyananalysen der Beerenfarbmutanten lesereifer Beeren (mindestens 70 °Oe). (A) Anthocyankonzentration mit 'Pinot Noir' als Rotweinsorte zum Vergleich. Angegeben ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen mit der Standardabweichung. Signifikanzbestimmung anhand Student's T-Test und TukeyHSD (Tukey's Honest Significant Difference method) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. DW = Dry Weight (Trockengewicht). (B) Prozentuale Verteilung der Gesamtanthocyane in 3'-OH-Anthocyane und 3'5'-OH-Anthocyane. (C) Anthocyanprofil. Cyan-3-Gly = Cyanidin-3-O-glucosid; Peo-3-Gly = Peonidin-3-O-glucosid; Delph-3-Gly = Delphinidin-3-O-glucosid; Petu-3-Gly = Petunidin-3-O-glucosid; Malv-3-Gly = Malvidin-3-O-glucosid; acyl = acylierte Anthocyane (acetyliert oder coumaryliert).

Generell lagen die Anthocyankonzentrationen der Farbmutanten ca. um den Faktor fünf bis zehn niedriger im Vergleich zur Rotweinsorte 'Pinot Noir'. Jedoch zeigten alle Farbmutanten mit *VvmybA1*-bezogenen Mutationen ('Elbling Rot', 'Riesling Rot', 'Silvaner Blau', 'Silvaner Rot') eine signifikant erhöhte Anthocyankonzentration im Vergleich zu den *VvmybA2*-bezogenen Typen 'Kernling' und 'Rauschling Rot' (siehe Abbildung 26A). Dies spiegelte sich auch deutlich im Anthocyanprofil wieder. Die

Beerenhautproben von `Kernling` sowie `Räuschling Rot` zeigten beide einen Anteil von ca. 95% Cyanidin-3-O-glucosid und konnten folglich deutlich von den anderen Farbmутanten unterschieden werden (siehe Abbildung 26C). Dies scheint für diesen Mutationstyp ein Alleinstellungsmerkmal zu sein und könnte zur Identifizierung dieses Mutationstyps gezielt eingesetzt werden.

Wie in Mu *et al.* (2014) beschrieben, korreliert die Expression von *VvF3'5'H* mit dem Verhältnis von 3'-OH-Anthocyanen zu 3'5'-OH-Anthocyanen. So steigt mit zunehmender Expression von *VvF3'5'H* der Anteil an 3'5'-OH-Anthocyanen. Diese Korrelation ($R^2 = 0,8599$) konnte auch für die Farbmутanten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25: Relative Expression von *VvF3'5'H* sowie Abbildung 26B).

3.1.7. Herbstlaubfärbung durch das *MybA1b*-Allel

Schon Trummer (1841) berichtete von der Herbstlaubfärbung von `Silvaner Rot` und führte es als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal neben der Beerenfarbe auf, um den Farbklon eindeutig von `Silvaner Grün` unterscheiden zu können. Anhand der Herbstlaubbonitur verschiedener Farbmутanten stellte sich heraus, dass alle Farbmутanten, die das *MybA1b*-Allel tragen, rotgefärbtes Herbstlaub besaßen (siehe Abbildung 27). Dies scheint für diesen Mutationstyp ein Alleinstellungsmerkmal zu sein, so dass neben den *VvmybA2*-bedingten Mutationen aus `Kernling` und `Räuschling Rot`, die sich anhand des Anthocyanprofils eindeutig unterscheiden ließen, auch diese Mutation relativ einfach erkannt werden kann. Sorten, die zwar *VvmybA1*-bezogene Mutationen aufweisen, jedoch nicht das *MybA1b*-Allel, färbten das Laub nicht. So lässt sich `Silvaner Blau` eindeutig von `Silvaner Rot` unterscheiden. Da dieses Merkmal zuvor nicht bekannt war, kam es zu zwei Falschbenennungen der gefärbten `Silvaner`-Klone innerhalb der deutschen Sortimente. Im Zuge dieses Projektes konnten jedoch alle gefärbten `Silvaner` richtig zugeordnet werden (siehe Anhang 6). Zurückzuführen ist die rote Herbstlaubfärbung auf die *MybA1b*-bedingte *VvmybA1*-Expression, die z.B. in `Silvaner Blau` nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 27C). Da das *MybA1b*-Allel aus `Silvaner Rot` im Gegensatz zur *MybA31*-Variante aus `Silvaner Blau` den *VvmybA1*-Promotor aufweist, lässt sich daraus schließen, dass der *VvmybA3*-Promotor der *MybA31*-Variante im Herbstlaub die Expression nicht induzieren kann.

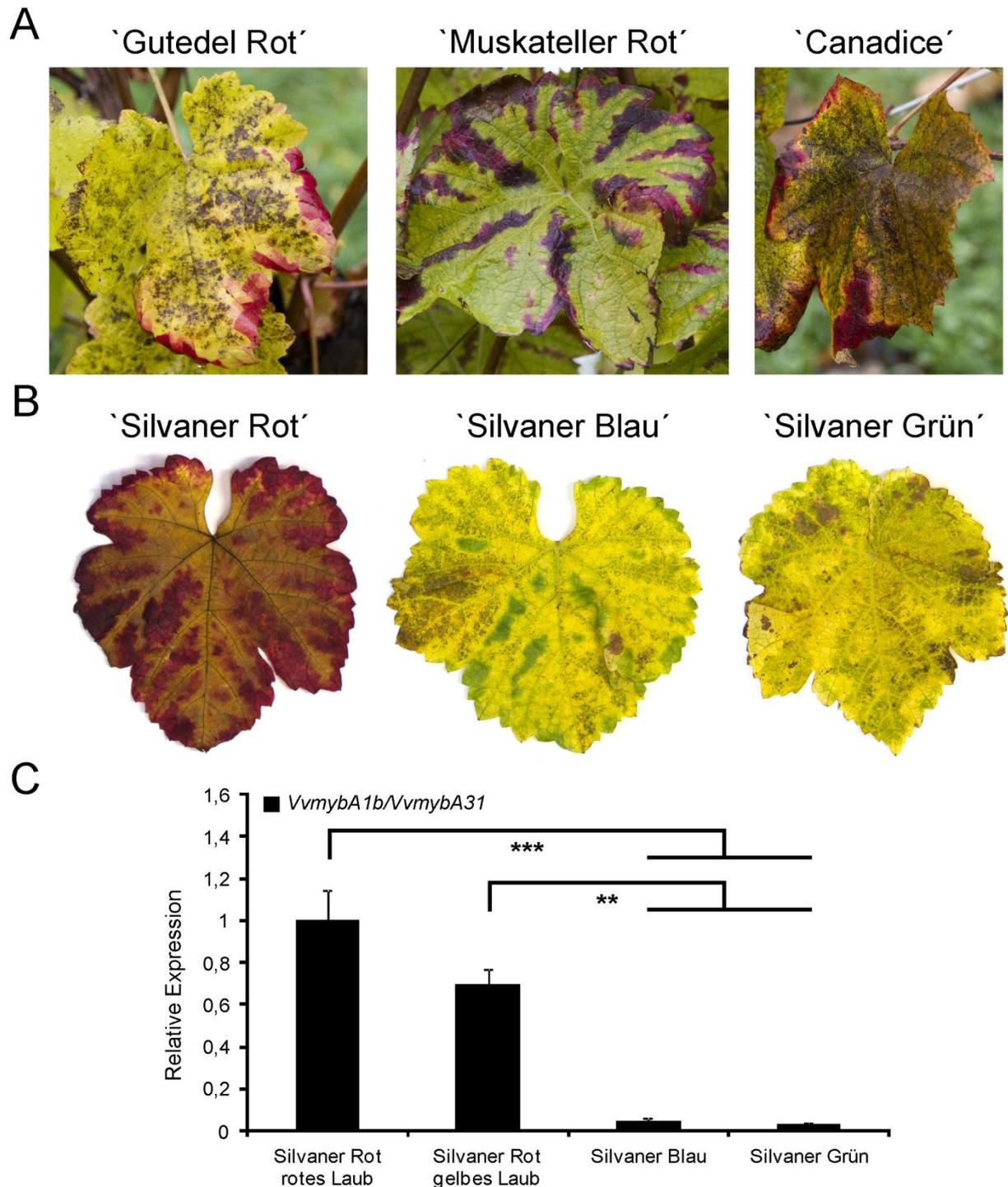


Abbildung 27: Rote Herbstlaubfärbung der Rebsorten mit *MybA1b*-Allel. (A) Herbstlaubfärbung bekannter Sorten, die das *MybA1b*-Allel besitzen. (B) Herbstlaubfärbung von ‘Silvaner Rot’ im Vergleich zu ‘Silvaner Blau’ und ‘Silvaner Grün’. (C) *VvmybA1*-Expression im Herbstlaub von ‘Silvaner Rot’ im Vergleich zu ‘Silvaner Blau’ und ‘Silvaner Grün’. Angegeben ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von ‘Silvaner Rot’ rotes Laub. Signifikanzbestimmung anhand Student’s T-Test und TukeyHSD (Tukey’s Honest Significant Difference method) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$.**

3.2. Färberreben (Teinturiers)

3.2.1. Mutation und Abstammung

Die als Färberreben bezeichneten Rebsorten zeichnen sich durch eine Rotfärbung sowohl der Blätter als auch des Fruchtfleisches aus. Im Unterschied zu üblichen Rotweinsorten, die ein ungefärbtes Fruchtfleisch aufweisen, führen diese Sorten zu einem verhältnismäßig stark gefärbten Most, der später als sogenannter „Deckwein“ zur Farbvertiefung bei farbschwachen Rotweinen eingesetzt werden kann. Die Ursprünge der Färberreben gehen auf die französische Sorte `Teinturier (du Cher)` zurück, die im 17. Jahrhundert im Gebiet um Orléans erstmals erwähnt wurde. Schon Jeong *et al.* (2006) beschrieb, dass der Ursprung der Mutation wahrscheinlich mit dem Verlust der Gewebe-spezifischen Expression von *VvmybA1* einher geht, jedoch ohne eine konkrete Mutation gefunden zu haben. Da auch schon Galet (2000) erwähnte, dass es mindestens zwei verschieden stark gefärbte `Teinturier`-Klone gibt, wurden zur genetischen Untersuchung Blattproben von 15 Akzessionen aus den deutschen sowie französischen Sortimenten bzgl. ihrer *VvmybA1*-Allele am Farblokus analysiert. Dazu wurde eine Primerkombination verwendet, die neben dem kompletten ORF auch ein größeres Fragment des Promotors amplifiziert (siehe Abbildung 28A). Alle 15 getesteten `Teinturier`-Klone zeigten in Blatt-DNA-Proben drei verschiedene *VvmybA1*-Allele (siehe Abbildung 28B). Für alle Klone konnte jeweils das nicht funktionelle *MybA1a*-Allel sowie das funktionelle *MybA1c*-Allel und ein drittes unbekanntes Allel, das zudem innerhalb der Klone drei verschiedene Größen im Agarose-Gel zeigte, nachgewiesen werden. Das Auftreten von drei anstatt von zwei Allelen am Farblokus wies dabei direkt auf eine periklinale Chimäre hin, wie schon für `Pinot Gris` (Hocquigny *et al.*, 2004) oder `Malian` beschrieben (Walker *et al.*, 2006). Deshalb wurden zur Überprüfung von drei verschiedenen `Teinturier`-Klonen Stecklinge hergestellt und der Test mit Wurzel-DNA wiederholt, da Blätter aus beiden Zellschichten (L1 und L2) bestehen und Wurzeln nur aus L2-Material. In allen getesteten Wurzelproben konnte jeweils nicht das *MybA1c*-Allel nachgewiesen werden, so dass hier nur das *MybA1a*-Allel sowie jeweils eine der unbekanntenen Varianten zu finden waren (siehe Abbildung 28B). Die ursprüngliche Vermutung konnte folglich bestätigt werden, so dass alle getesteten `Teinturier`-Klone als periklinale L2-Chimären mit zwei genetisch verschiedenen Zellschichten identifiziert werden konnten.

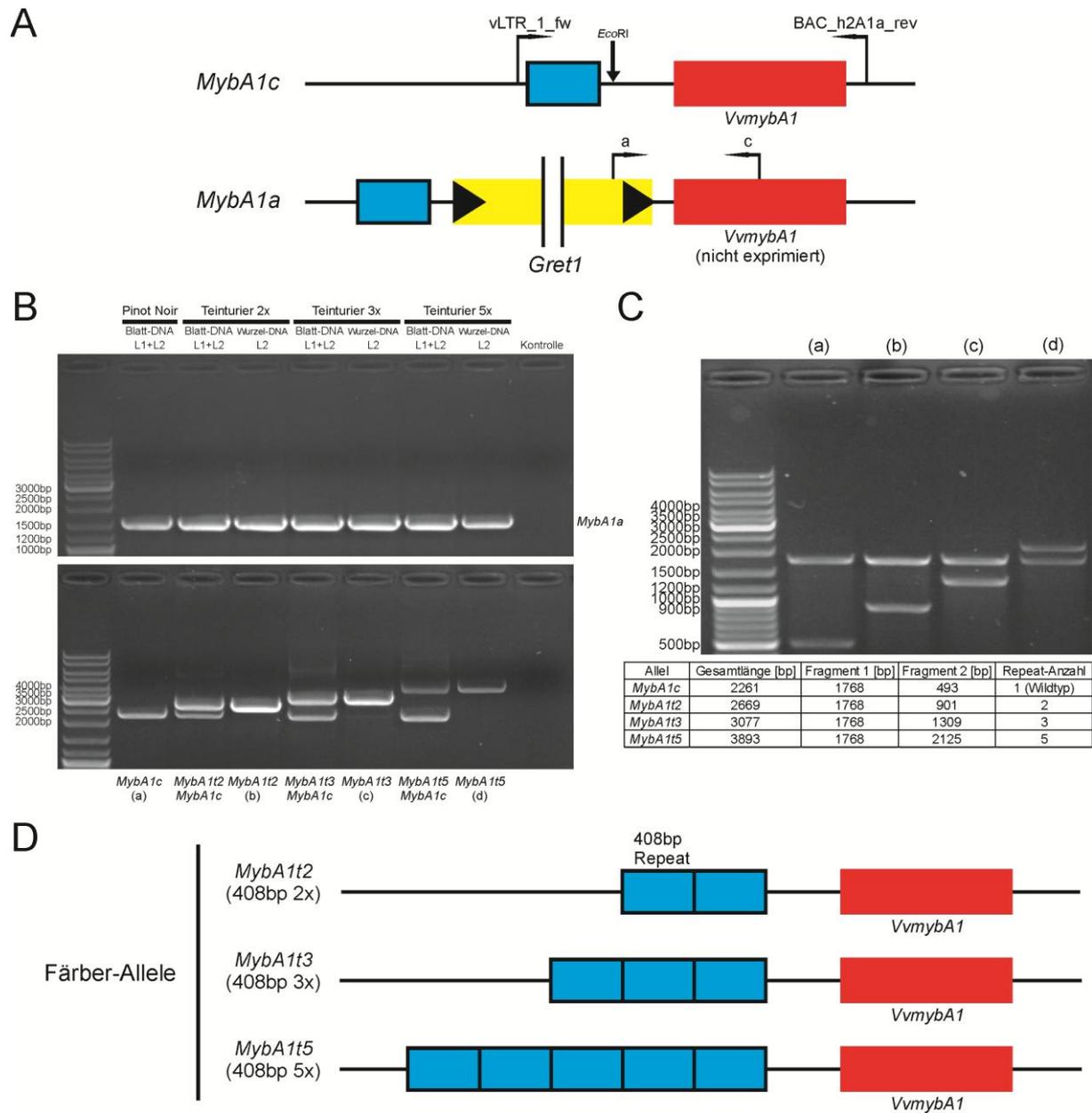


Abbildung 28: Die Mutation der Färberreben. (A) Schematische Darstellung des funktionellen Allels *MybA1c* sowie des nicht funktionellen Allels *MybA1a* mit den zum Nachweis verwendeten Primern sowie der Restriktionsschnittstelle *EcoRI*. **(B)** PCR-Ergebnis für *MybA1a* (oben) und *MybA1c* (unten) drei genetisch verschiedener `Teinturier`-Klone (siehe Tabelle 10). Im Vergleich jeweils Blatt-DNA (besteht aus L1 und L2) und Wurzel-DNA (besteht nur aus L2). `Pinot Noir` als Referenz. **(C)** Restriktionsanalyse mittels *EcoRI* der in (B) gezeigten Amplikons. Exakte Fragmentgrößenbestimmung anhand Amplikon-Sequenzierung. **(D)** Schematische Darstellung der drei gefundenen Färber-Allele benannt nach ihrer Repeat-Anzahl (*MybA1t2*, *MybA1t3* und *MybA1t5*).

Die drei unbekanntes Allelvarianten der `Teinturier`-Klone, die in Zusammenhang mit dem Färberreben-Phänotyp standen, wurden anhand der Wurzel-DNA-Proben sequenziert. Dabei konnte für alle drei Allele ein zum Teil mehrfach wiederholendes 408 bp Tandem-Repeat (Position im Vergleich zum ATG-Startcodon: -338 bis -745 bp) im Promotor von *VvmybA1* identifiziert werden (siehe Abbildung 28D). Die drei gefundenen Allelvarianten wurden anhand der Anzahl des Repeats (2-fach, 3-fach

und 5-fach) *MybA1t2*, *MybA1t3* und *MybA1t5* (t = Teinturier) und das Element generell als GCE (Grapevine color enhancer) benannt. Da mit der Sanger-Sequenzierung nur ca. eine Lesereichweite von 1100 bp erreicht werden konnte, wurde zur genauen Bestimmung der Repeat-Anzahl von *MybA1t3* und *MybA1t5* zusätzlich eine Restriktionsanalyse mittels *EcoRI* durchgeführt (siehe Abbildung 28C), um anhand der besseren Auflösung die Bandengröße im Agarose-Gel abschätzen zu können. Zehn der untersuchten `Teinturier`-Klone zeigten das *MybA1t2*-Allel, drei das *MybA1t3*-Allel und zwei das *MybA1t5*-Allel (siehe Tabelle 10). Jeweils eine *MybA1t*-Variante konnte in allen `Teinturier`-Nachkommen mit Färberreben-Phänotyp gefunden werden, so dass direkt ein Zusammenhang zum Phänotyp bestätigt werden konnte, da auch nicht näher verwandte Klone (z.B. `Gamay Teinturier de Bouze`) mit gefärbtem Fruchtfleisch sowie klassische Rotweinsorten keine dieser Allelvarianten aufwiesen. Die detaillierten genetischen Profile zur Sortenechtheitsüberprüfung der jeweiligen Klone und Nachkommen sind in Anhang 7 aufgelistet. Zusätzlich konnte in den Nachkommen nur jeweils eine weitere Allelvariante *MybA1a* oder *MybA1c* nachgewiesen werden, so dass, wie zu erwarten war, der Chimären-Status über die sexuelle Reproduktion verloren ging.

Tabelle 10: Haplophasenverteilung am Farblokus und Repeat-Anzahl aller untersuchten `Teinturier`-Klone sowie der im Zuge dieses Projektes untersuchten Färberreben. `Pinot Noir` und `Pinot Gris` als Referenz.

Leitname	Akzessionsname	Akzessionsnummer / Herkunft	<i>MybA1a</i> weiß	<i>MybA1c</i> rot	<i>MybA1t</i> Repeat-Anzahl	Bezeichnung
Pinot Noir	Spätburgunder M242	DEU098-1980-006	x	x	1 (Wildtyp)	
Pinot Gris	Pinot Gris Cl. Dunkelgrau	DEU098-1980-058	x	x	1 (Wildtyp)	
Pinot Teinturier	Pinot Teinturier	DEU454-L-28-4-2	x	x	1 (Wildtyp)	
Gamay Teinturier de Bouze	Gamay Teinturier de Bouze	DEU098-1980-196	x	x	1 (Wildtyp)	
Teinturier	Teinturier	DEU098-1993-213	x	x	2	Teinturier 2x
Teinturier	Farbtraube	DEU098-2002-003	x	x	2	
Teinturier	Farbtraube	DEU098-2011-063	x	x	2	
Teinturier	Farbtraube	DEU363-282	x	x	2	
Teinturier	Färbertraube	DEU454-L-9-4-2	x	x	2	
Teinturier	Teinturier mâle	DEU456-1068	x	x	2	
Teinturier	Färbertraube	Bundessortenamt	x	x	2	
Teinturier	Farbtraube (Fröhlich)	Bundessortenamt	x	x	2	
Teinturier	Plant rouge femelle	FRA139-303Mtp2	x	x	2	
Teinturier	Serzial	FRA139-303Mtp6	x	x	2	
Teinturier	Teinturier	Bundessortenamt	x	x	3	Teinturier 3x
Teinturier	Plant rouge mâle	FRA139-303Mtp1	x	x	3	
Teinturier	Teinturier du Cher PVM	FRA139-0Mtp1749	x	x	3	

Leitname	Akzessionsname	Akzessionsnummer / Herkunft	MybA1a weiß	MybA1c rot	MybA1t Repeat-Anzahl	Bezeichnung
Teinturier	Rubindraube	DEU456-880	x	x	5	Teinturier 5x
Teinturier	Teinturier du Cher	FRA139-303Mtp7	x	x	5	
Dunkelfelder	Dunkelfelder	DEU098-1980-014	x	-	2	
Rubired	Rubired	DEU098-1991-123	x	-	2	
Titan	Titan	DEU098-1980-459	x	-	2	
Teinturier Luebeck	Teinturier male	DEU098-1995-052	x	-	2	
Seibel 5437	Seibel 5437	DEU098-2003-093	x	-	2	
Golubok	Golubok	DEU098-1988-077	x	-	2	
Farbfraenkisch	Farbfraenkisch	DEU454-L-27-5-2	x	-	2	
Alicante Henri Bouschet	Alicante Henri Bouschet	DEU098-1990-007	-	x	2	
Bouschet Petit	Bouschet Petit	DEU098-2001-016	-	x	2	
Karmin	Karmin	DEU098-1991-143	-	x	2	
Biborkadarka	Biborkadarka	DEU098-1991-136	-	x	2	
Kurucver	Kurucver	DEU098-1991-149	-	x	2	
Bailey Alicante A	Bailey Alicane A	DEU098-1980-536	-	x	2	
Royalty	Royalty	DEU098-1991-119	-	x	2	
Flot Rouge	Flot Rouge	DEU098-1980-642	-	x	2	
Grand Noir	Grand Noir	DEU098-1980-125	-	x	2	
Karmrahyut	Karmrahyut	DEU098-1988-079	-	x	2	
Morrastel Bouschet	Morrastel Bouschet	DEU098-1980-268	-	x	2	
Kolor	Kolor	DEU098-1980-033	x	-	3	
Deckrot	Deckrot	DEU098-1980-010	x	-	3	
Teinturier femelle (non identified)	Teinturier femelle	DEU456-1127	x	-	3	
Accent	Accent	DEU098-2013-031	x	-	3	
Dakapo	Dakapo	DEU098-2011-046	-	x	3	
Cabernet Mitos	Cabernet Mitos	DEU098-2010-046	x	-	5	
Palas	Palas	DEU098-2010-049	x	-	5	

Vergleicht man die Sequenz der MybA1t-Allele mit der Sequenz des eigenen MybA1c-Allels aus der Blatt-DNA sowie der Referenzsequenz des MybA1c-Allels aus 'Pinot Noir', so fällt auf, dass alle Sequenzen bis auf das GCE-Element identisch sind (ein Alignment des MybA1t-Allels und des MybA1c-Allels aus 'Pinot Noir' ist in Anhang 9 aufgeführt). Das legte die Vermutung nahe, dass sehr wahrscheinlich die MybA1t-Allele durch eine Mutation des eigenen MybA1c-Allels innerhalb von L2 entstanden und folglich die Sorte 'Teinturier' ursprünglich eine klassische Rotweinsorte war. Da die MybA1t-Sequenzen zu 'Pinot Noir' identisch waren und auch zusätzlich die SSR-Marker entlang der zweiten Hälfte von Chromosom 2 um den Farblokus keine Unterschiede aufwiesen (siehe Anhang 8), wurde eine enge Verwandtschaft von 'Teinturier' und 'Pinot Noir' vermutet. Beiden Sorten konnte

auch eine Eltern-Kind-Beziehung mit 'Traminer Weiß' nachgewiesen werden (Lacombe et al., 2013). Zur Überprüfung der Verwandtschaft wurde dazu ein Likelihood Ratio Test für zwei a priori festgelegte Beziehungen (Vollgeschwister gegen Halbgeschwister) mit der Software ML-Relate (Kalinowski et al., 2006) durchgeführt. Dazu wurden 22 über das Genom verteilte SSR-Marker von ca. 300 Akzessionen der Instituts-internen Markerdatenbank verwendet, um die entsprechenden Allelfrequenzen für den statistischen Test innerhalb einer *Vitis vinifera*-Population zu berechnen. Mit einem p-Wert von 0,0054 bestätigte der Test, dass 'Teinturier' und 'Pinot Noir' sehr wahrscheinlich Vollgeschwister mit dem gemeinsamen Elternteil 'Traminer Weiß' sind. Da 'Traminer Weiß' keinen funktionellen Farblokus besitzt, würde folglich der funktionelle Farblokus beider Sorten von dem zweiten unbekanntem Elternteil abstammen.

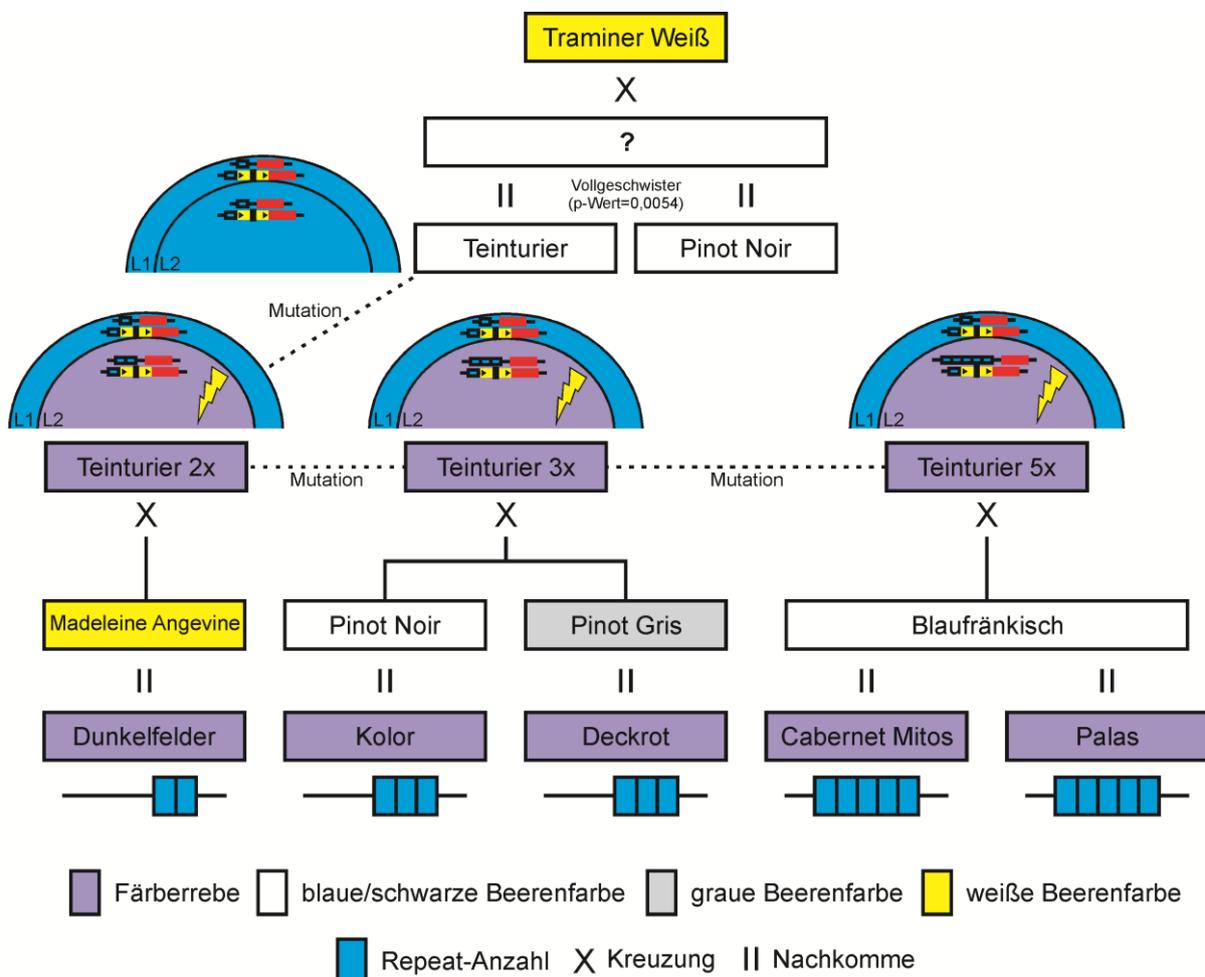


Abbildung 29: Putativer Stammbaum der Färberreben-Ursorte 'Teinturier' sowie der in diesem Projektteil untersuchten Färberreben aus Deutschland.

Da speziell für 'Cabernet Mitos' und 'Palas' (beide *MybA1t5*, siehe Tabelle 10) überliefert ist, dass beide direkt von der 'Teinturier'-Akzession 'Rubintraube' (auch

MybA1t5) abstammen (Dr. Jürgen Sturm, LVWO Weinsberg, persönliche Mitteilung) und auch sonst alle drei *MybA1t*-Varianten in den Nachkommen zu finden waren, konnte daraus geschlossen werden, dass alle gefundenen *MybA1t*-Varianten vermutlich in der Ursprungsorte entstanden sind und je nach Klon, der für die Züchtung verwendet wurde, die entsprechende Repeat-Anzahl an die nächste Generation weitergegeben wurde. Der putative Stammbaum der Ursorte 'Teinturier' sowie ein Modell zur Mutation der Zellschichten, basierend auf den bisherigen Ergebnissen, ist in Abbildung 29 dargestellt. Die vertiefend in dem Projekt untersuchten Färberreben-Nachkommen wurden exemplarisch mit aufgeführt.

3.2.2. Die Korrelation der Repeat-Anzahl mit der Anthocyanfärbung

3.2.2.1. 'Teinturier'-Klone

Galet (2000) beschrieb zwei verschiedene 'Teinturier'-Klone in den französischen Sortimenten, die sich nur durch die Intensität der Rotfärbung unterscheiden lassen. Den schwächer gefärbten Klon nannten sie 'Teinturier femelle' (auch 'Plant rouge femelle' oder 'Teinturier cinq fois coloré'; fünffach gefärbt; FRA139-303Mtp2) und den stärker gefärbten Klon 'Teinturier mâle' (auch 'Plant rouge mâle' oder 'Teinturier dix fois coloré'; zehnfach gefärbt; FRA139-303Mtp1). Beide sollten laut Namensgebung jeweils das schwache weibliche sowie das starke männliche Geschlecht repräsentieren. Da sich in der Analyse der Repeat-Anzahl zeigte, dass der schwächer gefärbte Klon zwei und der stärker gefärbte Klon drei Repeats besitzt (siehe Tabelle 10), konnte daraus geschlossen werden, dass sehr wahrscheinlich ein Zusammenhang von der Repeat-Anzahl zur Intensität der Anthocyanfärbung besteht, denn schon für Äpfel mit gefärbtem Fruchtfleisch, die eine vergleichbare Mutation aufweisen, konnte diese Korrelation gezeigt werden (Espley *et al.*, 2009). Deshalb wurden 'Teinturier'-Klone mit aufsteigender Repeat-Anzahl bzgl. ihres Anthocyan Gehaltes und *VvmybA1*-bedingter Genexpression untersucht. Da sich nur 'Teinturier'-Klone mit zwei Repeats im Sortiment des Geilweilerhofs befanden, konnte nicht auf reifes Beerenmaterial zurückgegriffen werden. Deshalb wurde das Blattmaterial der zuvor erstellten Stecklinge analysiert. Aber auch schon am Blattmaterial der verhältnismäßig kleinen Gewächshauspflanzen konnte ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Färbung festgestellt werden (siehe Abbildung 30A). Dies spiegelte sich auch in der Anthocyankonzentration sowie der

Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* wieder. Mit steigender Repeat-Anzahl stieg der Anthocyangehalt sowie die Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* von 2x nach 3x und sogar weiter von 3x nach 5x an. Folglich konnte die in Galet (2000) beschriebene Beobachtung bestätigt werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass es bedingt durch das GCE-Element im Promotor von *VvmybA1* zu einer ektopischen Expression von *VvmybA1* in den Blättern, unabhängig von der Reife, kam. In der Kontrollsorte 'Pinot Gris', die auch eine Chimäre ist, konnte keine Expression festgestellt werden. Zusätzlich stieg mit steigender Repeat-Anzahl die relative Expression von *VvmybA1* und folglich, im Anthocyan-Biosyntheseweg nachfolgend, das Expressionsniveau von *VvUFGT* ($R^2 = 0,9048$) und letztlich die Anthocyankonzentration ($R^2 = 0,6231$) an.

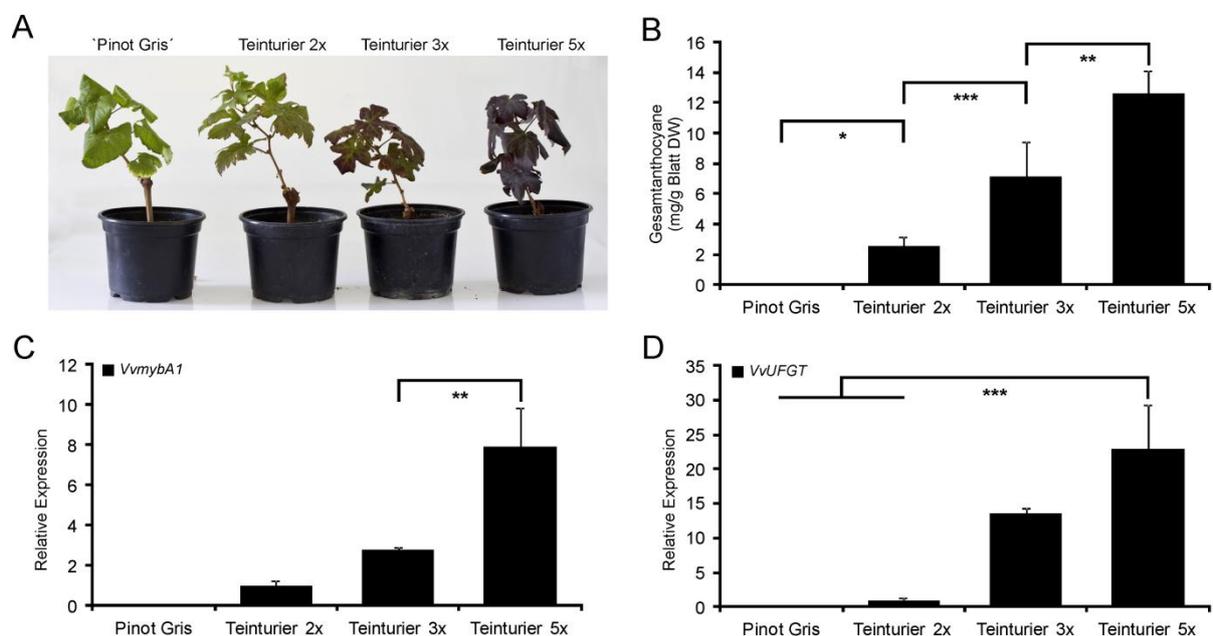


Abbildung 30: Gesamtanthocyane in Blättern sowie *VvmybA1*- und *VvUFGT*-Expression drei verschiedener 'Teinturier'-Klone mit ansteigender Repeat-Anzahl. (A) Gewächshauspflanzen der drei 'Teinturier'-Klone im Vergleich zu 'Pinot Gris'. (B) Gesamtanthocyane in Blättern. Angegeben ist der Mittelwert von sechs biologischen Wiederholungen mit der Standardabweichung. DW = Dry Weight (Trockengewicht). (C) + (D) Relative Expression von jeweils *VvmybA1* und *VvUFGT*. Angegeben ist der Mittelwert von sechs biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von Teinturier 2x. Signifikanzbestimmung in (B) – (D) anhand Student's T-Test und TukeyHSD (Tukey's Honest Significant Difference method) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$.**

Zusätzlich zum ansteigenden Expressionslevel von *VvmybA1* und *VvUFGT* in den jeweiligen 'Teinturier'-Klonen konnte auch eine deutliche Steigerung der relativen Expression von *VvF3'H* und *VvF3'5'H* festgestellt werden (siehe Abbildung 31A+B). Die Expression von *VvF3'H* schien noch relativ linear anzusteigen, wohingegen die relative Expression von *VvF3'5'H* ca. 30x höher in Teinturier 3x sowie Teinturier 5x

im Vergleich zu Teinturier 2x war. Dies spiegelte sich auch im Verhältnis von 3'-OH-Anthocyanen zu 3',5'-OH-Anthocyanen wieder (siehe Abbildung 31D). Mit steigender Repeat-Anzahl stieg der Anteil an 3',5'-OH-Anthocyanen von ca. 30% (Teinturier 2x) über ca. 40% (Teinturier 3x) auf ca. 50% (Teinturier 5x). Zurückzuführen ist dies auf den in gleichem Maße sinkenden Anteil an Cyanidin-basierenden Anthocyanen wie dem steigenden Anteil an Malvidin-basierenden Anthocyanen von Teinturier 2x zu Teinturier 5x (siehe Abbildung 31C).

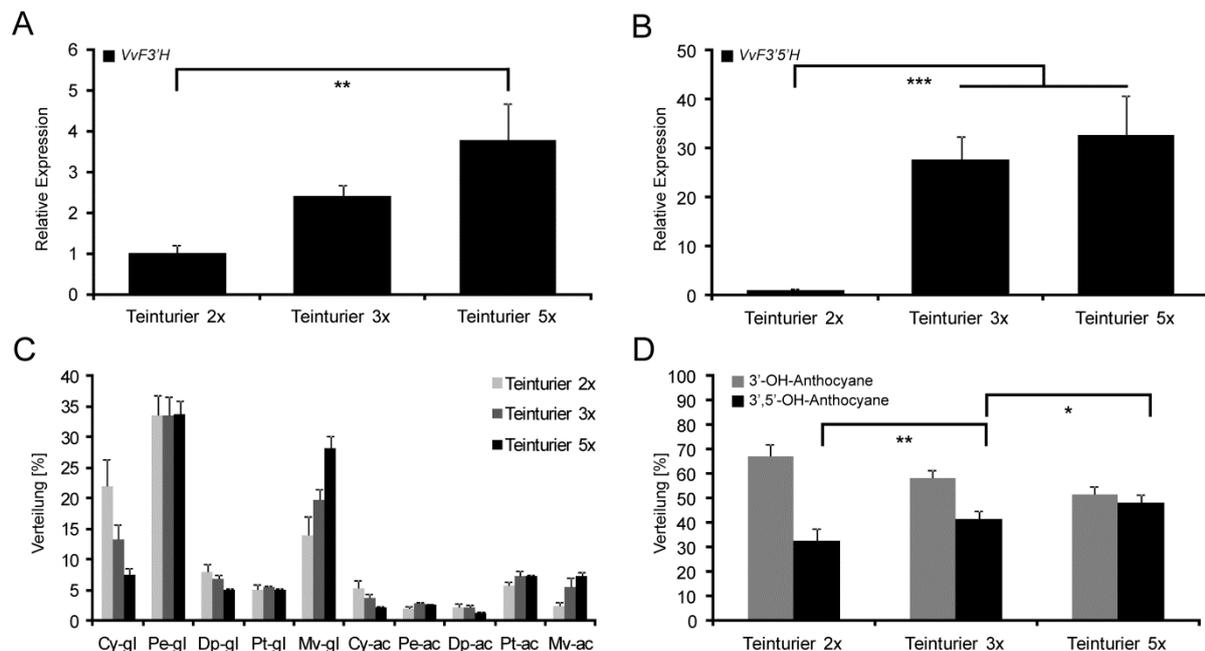


Abbildung 31: Anthocyanprofil in Blättern in Relation zur Expression von *VvF3'H* und *VvF3'5'H* drei verschiedener Teinturier-Klone mit ansteigender Repeat-Anzahl. (A) + (B) Relative Expression von jeweils *VvF3'H* und *VvF3'5'H*. Angegeben ist der Mittelwert von sechs biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von Teinturier 2x. Signifikanzbestimmung anhand Student's T-Test und TukeyHSD (Tukey's Honest Significant Difference method) mit * p < 0,05, ** p < 0,01 und * p < 0,001. (C) Anthocyanprofil. Cy-gl = Cyanidin-3-O-glucosid; Pe-gl = Peonidin-3-O-glucosid; Dp-gl = Delphinidin-3-O-glucosid; Pt-gl = Petunidin-3-O-glucosid; Mv-gl = Malvidin-3-O-glucosid; ac = acylierte Anthocyane (acetyliert oder coumaryliert). Angegeben ist der Mittelwert von sechs biologischen Wiederholungen mit der Standardabweichung. (D) Prozentuale Verteilung der Gesamtanthocyanen in 3'-OH-Anthocyanen und 3',5'-OH-Anthocyanen.**

3.2.2.2. F₁-Nachkommen

Die meisten Färbertrauben wurden speziell dafür gezüchtet, tiefdunkle Rotweine zu liefern, die zum Färben von farbschwachen Rotweinen eingesetzt werden können. Deshalb ist es im Besonderen für die Rebenzüchtung von großer Bedeutung, dunkle Färberreben Typen zu selektionieren. Um zu überprüfen, ob die Korrelation von

Repeat-Anzahl und Anthocyankonzentration neben den 'Teinturier'-Klonen auch in der genetisch diversen Nachkommenschaft zu finden ist, wurden die Anthocyankonzentrationen reifer Beeren sowie des Fruchtfleisches von fünf Nachkommen erhoben. Dabei wurde darauf geachtet, Sorten auszuwählen, die sich zum einen in ihrer Repeat-Anzahl unterscheiden ('Dunkelfelder' 2x; 'Kolor' und 'Deckrot' 3x; 'Cabernet MitoS' und 'Palas' 5x) und zum anderen keinen weiteren funktionellen Farblokus besitzen, um eventuelle Nebeneffekte auszuschließen (siehe Tabelle 10). Zusätzlich wurden jeweils ganze Trauben gepresst, um Reifeparameter zu erheben und die Farbstärke im Most mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR, WineScan, Foss) zu bestimmen. In allen drei getrennten Ansätzen konnte das gleiche Phänomen bestätigt werden (siehe Abbildung 32).

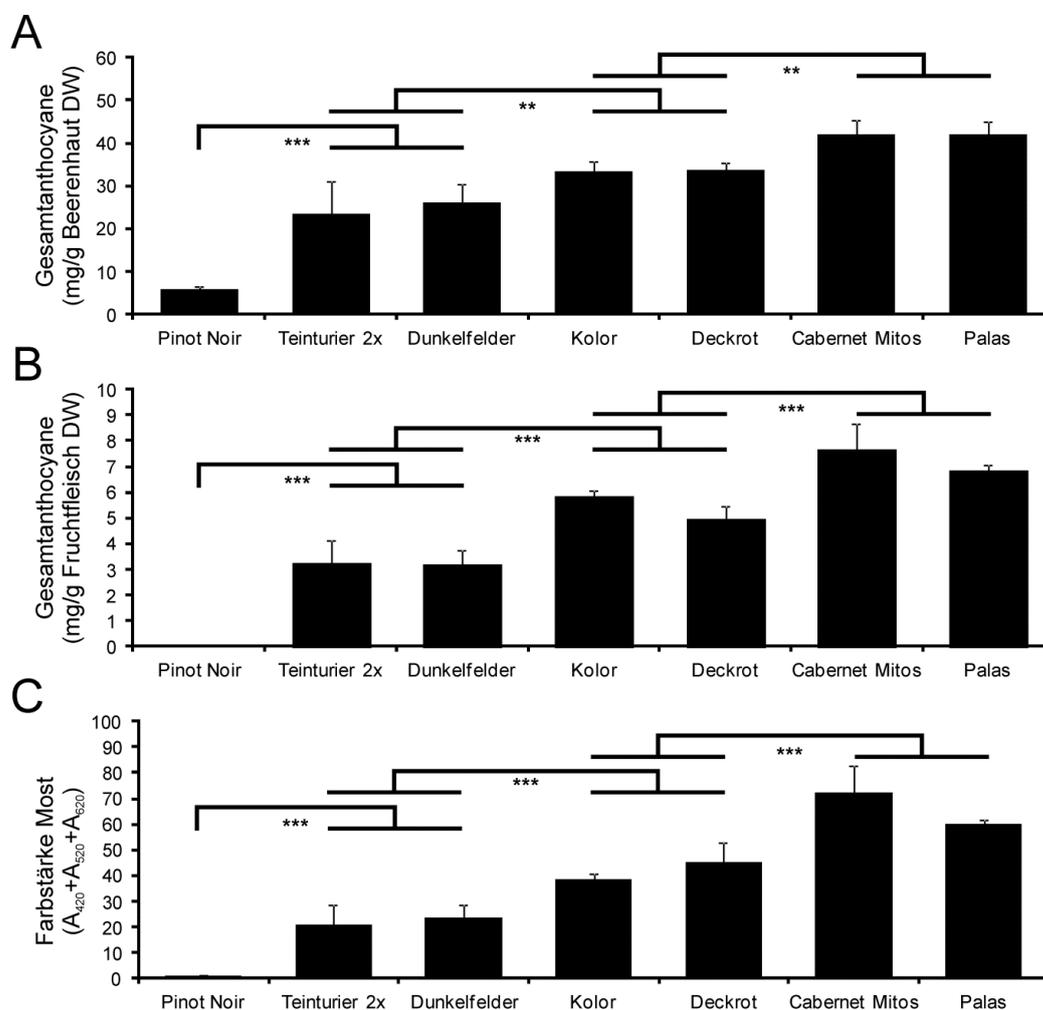


Abbildung 32: Gesamtanthocyane von Beerenhaut, Fruchtfleisch sowie Farbstärke im Most lesereifer Beeren (mindestens 70 °Oe) von 'Teinturier'-Nachkommen mit ansteigender Repeat-Anzahl. 'Pinot Noir' und Teinturier 2x als Referenz. DW = Dry Weight (Trockengewicht). (A) Gesamtanthocyane der Beerenhaut. (B) Gesamtanthocyane im Fruchtfleisch. (C) Farbstärke im Most anhand Bosenko & Eder (2011). $A_{420}+A_{520}+A_{620}$ = Summe der Absorption bei den Wellenlängen 420 nm, 520 nm und 620 nm.

Mit zunehmender Repeat-Anzahl stiegen der Anthocyangehalt sowie die Farbstärke reifer Beeren signifikant an. Sorten mit gleicher Repeat-Anzahl wiesen dabei keine signifikanten Unterschiede zueinander auf, so dass in allen drei Ansätzen die *MybA1t5*-besitzenden Sorten 'Cabernet Mitoš' und 'Palas' die intensivste Färbung aufwiesen, gefolgt von 'Kolor' und Deckrot' (beide *MybA1t3*) sowie Teinturier 2x und 'Dunkelfelder' (beide *MybA1t2*). Die Referenzsorte 'Pinot Noir' wies dabei, wie erwartet, nur in der Beerenhaut Anthocyane auf und erwies sich als deutlich schwächer in der Rotfärbung verglichen mit den Färberreben.

Zusätzlich zur Anthocyananalyse reifer Beeren wurde auch eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden jeweils vier Wochen vor und nach der *Véraison* Beerenhaut- sowie Fruchtfleischproben getrennt präpariert, da schon aus vorangegangenen Arbeiten bekannt war, dass die Expression in beiden Gewebetypen stark variieren kann (He *et al.*, 2010). Die Zeitpunkte wurden dabei so gewählt, dass, trotz sortenspezifischer Reifeverläufe, eine gemeinsame Probennahme aller getesteten Sorten möglich war, da in diesen Stadien kaum Reifebedingte Unterschiede in der Expression von *VvmybA1* zu finden sein sollten. Dabei stellte die Probennahme vier Wochen vor *Véraison* eine Nullreferenz dar und vier Wochen nach *Véraison* sollte die Expression von *VvmybA1* annähernd am Maximum liegen. Der theoretische Verlauf der *VvmybA1*-Expression wurde anhand des in Czemmel *et al.* (2012) beschriebenen Anthocyan-Verlaufs für Rotweinsorten abgeleitet. Aber dennoch zeigten schon im sogenannten Erbsenstadium vier Wochen vor *Véraison* die Färberreben eine deutliche Rotfärbung (siehe Abbildung 33A). Die Korrelation von Repeat-Anzahl und *VvmybA1*-Expression und folglich der Expression von *VvUFGT* konnte auch schon in diesem frühen Entwicklungsstadium für die Beerenhaut nachgewiesen werden (siehe Abbildung 33B). Die Sorten mit dem *MybA1t2*- sowie *MybA1t3*-Allel zeigten zwar eine Tendenz, jedoch war nur die Expression der *MybA1t5*-besitzenden Sorten 'Cabernet Mitoš' und 'Palas' signifikant erhöht. In den Fruchtfleisch-Proben zeigte diese Korrelation nur die Sorte 'Palas', denn das Fruchtfleisch von 'Cabernet Mitoš' war zu diesem Zeitpunkt, im Gegensatz zur Beerenhaut, noch deutlich weniger intensiv gefärbt (siehe Abbildung 34). Vier Wochen nach *Véraison* jedoch zeigten die Färberreben diese Korrelation nicht mehr. Die Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* in der Beerenhaut war für alle untersuchten Färberreben ungefähr auf einem Niveau, so dass nur noch eine statistische Unterscheidung zur Referenz 'Pinot Noir' erfolgen konnte (siehe

Abbildung 33B). In den Fruchtfleischproben konnte zusätzlich ein signifikanter Unterschied zu Teinturier 2x und 'Dunkelfelder' (beide *MybA1t2*) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 34B).

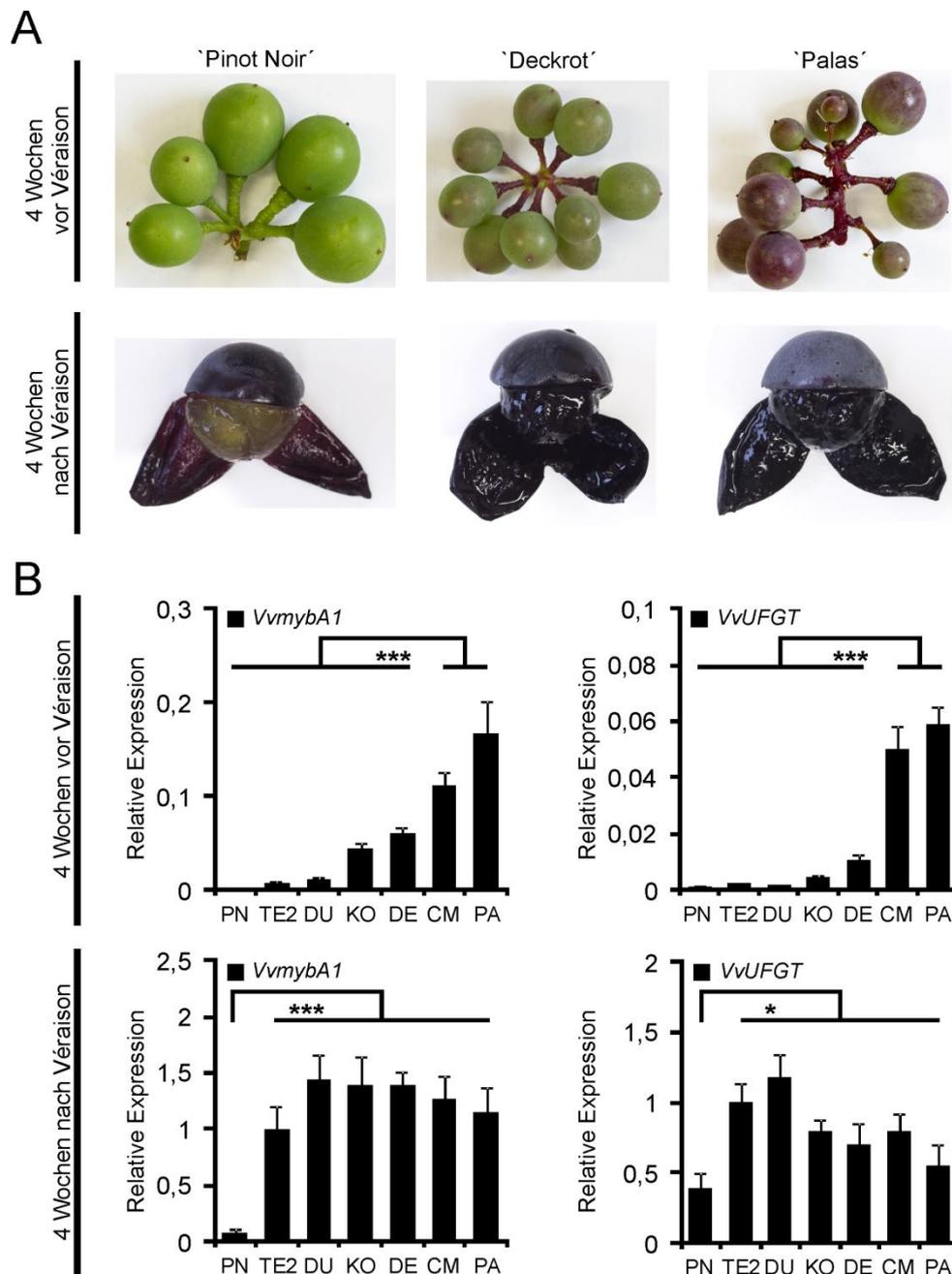


Abbildung 33: Relative Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* vier Wochen vor und nach Véraison in der Beerenhaut von 'Teinturier'-Nachkommen mit ansteigender Repeat-Anzahl. 'Pinot Noir' und Teinturier 2x als Referenz. (A) Exemplarische Beerenbilder von 'Pinot Noir' (*MybA1c*), 'Deckrot' (*MybA1t3*) und 'Palas' (*MybA1t5*). (B) Relative Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* vier Wochen vor und nach Véraison. Angegeben ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von Teinturier 2x vier Wochen nach Véraison. Signifikanzbestimmung anhand Student's T-Test und TukeyHSD (Tukey's Honest Significant Difference method) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

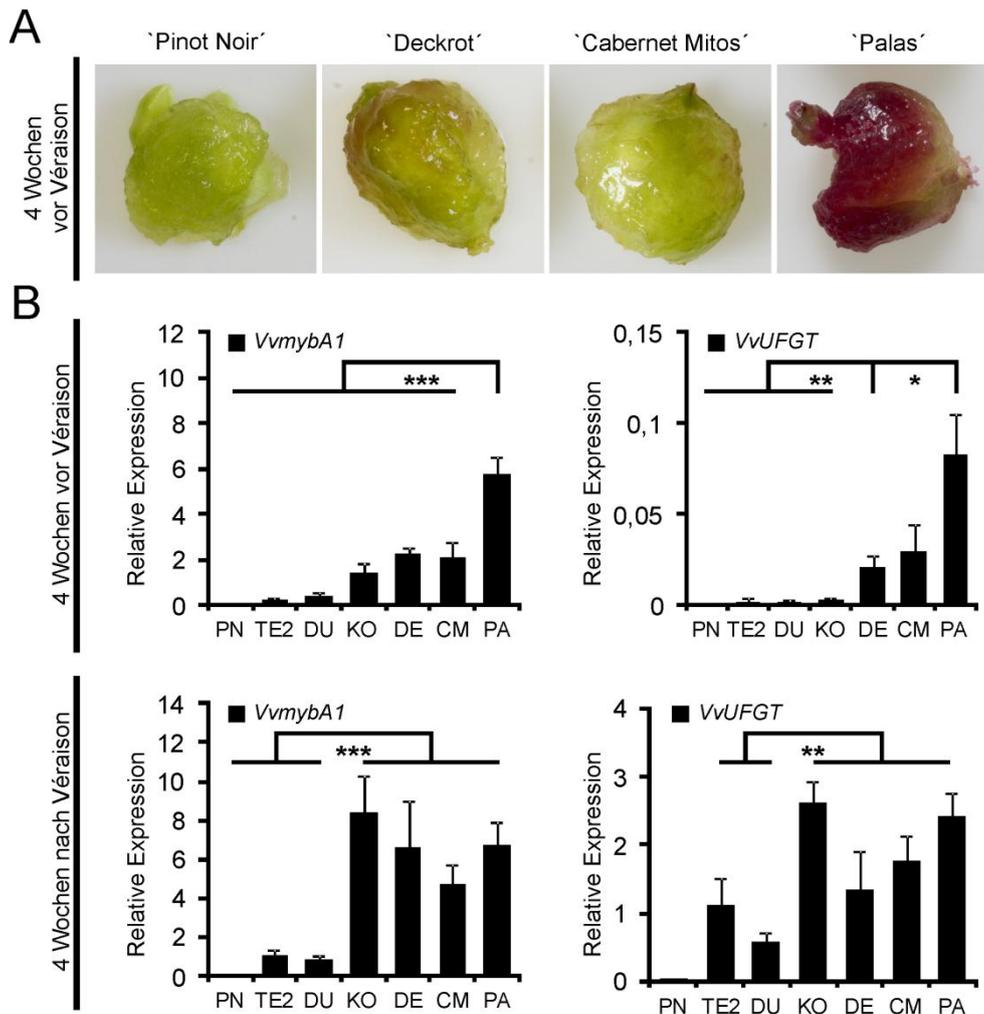


Abbildung 34: Relative Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* vier Wochen vor und nach Véraison im Fruchtfleisch von Teinturier-Nachkommen mit ansteigender Repeat-Anzahl. Pinot Noir und Teinturier 2x als Referenz. (A) Präparierte Fruchtfleischproben von Pinot Noir (*MybA1c*), Deckrot (*MybA1t3*), Cabernet Mito (*MybA1t5*) und Palas (*MybA1t5*). (B) Relative Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* vier Wochen vor und nach Véraison. Angegeben ist der Mittelwert von drei biologischen Wiederholungen (jeweils zwei technische Wiederholungen) mit dem Standardfehler. Eine Normierung erfolgte auf das Referenzgen *VvGAPDH* sowie die relative Expression von Teinturier 2x vier Wochen nach Véraison. Signifikanzbestimmung anhand Student's T-Test und TukeyHSD (Tukey's Honest Significant Difference method) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

4. Diskussion

Anthocyane stellen die größte Gruppe an wasserlöslichen Farbpigmenten im Pflanzenreich dar und führen zur Färbung von Früchten, Blüten, Blättern, Triebspitzen und Speicherorganen (Harborne & Grayer, 1980). Das Farbspektrum reicht dabei von rot-orange bis blau-schwarz. Mutationen in Genen des Anthocyan-Biosynthesewegs können dabei zu einer Vielzahl von phänotypischen Veränderungen führen, die vor allem bei der Färbung von Blüten und Früchten, aufgrund möglicher sich ändernder Selektionskriterien für Bestäuber und Samenverbreiter, eine wichtige Rolle spielen. So führen zum Beispiel zwei unabhängige Mutationen in *LsMYB12* und *LsDFR* jeweils zu weißen Blüten in *Lilium speciosum* (Suzuki *et al.*, 2015) oder die konstitutive Aktivierung von *PcMYB10.6* zu Pflaumen mit violett gefärbten Blättern (Gu *et al.*, 2015). Gerade anhand der vielen natürlich vorkommenden Farbmutanten bestand für viele Forscher über die genetische Variation der Zugang zur Entschlüsselung des Anthocyan-Biosynthesewegs. Viele Blütenfarbmutationen stehen dabei direkt in Zusammenhang mit der Insertion von transposablen Elementen in Gene wie *DFR* (Inagaki *et al.*, 1994), *LDOX* (Hisatomi *et al.*, 1997) oder *CHS* (Habu *et al.*, 1998), deren Entdeckung in Mais durch Barbara McClintock (McClintock, 1950) 1983 zur Verleihung des Nobelpreises führte. Aufgrund der Vielzahl von möglichen Genen entlang des Anthocyan-Biosynthesewegs, die durch Mutationen das Farbspektrum verändern können, wurden speziell in den USA transgene Pflanzen mit besonderem Anthocyan-Phänotyp (z.B. zur Nahrungsmittelproduktion) entwickelt und zum Patent angemeldet (Kayesh *et al.*, 2013). Dagegen ist trotz mehrerer Feldversuche von gentechnisch veränderten Weinreben (Pazzi, 2008) die Akzeptanz in Deutschland momentan gering, so dass zur Entwicklung neuer Rebsorten derzeit besonders auf klassische Züchtungsmethoden zurückgegriffen wird (Töpfer *et al.*, 2011). Deshalb könnten die in dieser Arbeit nachgewiesenen mutierten *VvmybA*-Allele in der nahen Zukunft wohl ausschließlich in der Kreuzungszüchtung oder zum funktionellen Nachweis eingesetzt werden. Anbieten würde sich hierzu ein Luciferase-Assay (Bogs *et al.*, 2007; Horstmann *et al.*, 2004), das CRISPR/Cas-System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated) (Ren *et al.*, 2016) oder die stabile Transformation in eine weiße Rebsorte über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer entsprechend Harst *et al.* (2000).

4.1. Die Farbmутanten weißbeeriger Qualitätsrebsorten

4.1.1. Mögliche Ursachen der *VvmybA*-bedingten Mutationen

Schon erste Untersuchungen des Anthocyan-Biosynthesewegs in Weinreben zeigten, dass der Unterschied von weißen zu gefärbten Rebsorten wahrscheinlich auf den Verlust der *VvUFGT*-Expression zurückzuführen ist (Boss *et al.*, 1996b). Auch eine weitere Studie von Kobayashi *et al.* (2001), die eine ausführliche Sequenzanalyse von *VvUFGT* in verschiedenen Sorten beinhaltete (keine nennenswerte Mutationen im Vergleich von weißen zu gefärbten Rebsorten), führte zu der Vermutung, dass wahrscheinlich mutierte MYB Transkriptionsfaktoren für die Unterschiede in der Beerenhautfärbung verantwortlich sind. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte anschließend zeigen, dass die Insertion eines Retrotransposons (*Gret1*) in den Promotorbereich von *VvmybA1* durch Inhibierung der Expression in Zusammenhang mit dem Verlust der Farbbildung in weißen Rebsorten steht (Kobayashi *et al.*, 2004).

In der gleichen Arbeit konnte auch schon für 'Ruby Okuyama' (Farbmутante von 'Italia blanc') und 'Flame Muscat' (Farbmутante von 'Muscat of Alexandria') das *MybA1b*-Allel beschrieben werden, das in dieser Arbeit für 'Silvaner Rot' und 'Müller-Thurgau Rot' nachgewiesen werden konnte und zur roten Beerenfarbe führt (siehe Kapitel 3.1.3.1). Dabei ging die Sequenz von *Gret1* verloren und nur ein LTR (Long Terminal Repeat), umschlossen von einer 5 bp duplizierten „Target-site“, blieb erhalten. So wurden ursprünglich die vermutlich zur Transkription von *VvmybA1* benötigten ABRE-ähnlichen Sequenzen (ABA-Responsive Element) durch *Gret1* getrennt, die sich aber durch den Verlust (Excision von *Gret1*) wieder in räumlicher Nähe zueinander befinden und eine Transkription ermöglichen (Azuma *et al.*, 2009). Ein Modell, das ein Auftreten von einzelnen LTRs im Genom erklären kann, wurde dabei durch Puchta (2005) beschrieben. So könnte es, bedingt durch weitere aktive Transposons (Xiao *et al.*, 2000) oder irrtümliche Integrationsversuche anderer Retrotransposons (SanMiguel *et al.*, 1996), zu einem Doppelstrangbruch (DSB) gekommen sein, der dann durch Rekombination (Single-strand annealing-Mechanismus (SSA), nachfolgend anhand der Entstehung des *VvmybA31*-Allels erläutert) den Verlust der Sequenz des Transposons sowie eines LTRs zur Folge hatte. Generell scheint diese Mutation die häufigste zu sein, denn sie konnte schon für eine Vielzahl von Farbmутanten beschrieben werden (De Lorenzis *et al.*, 2015;

Giannetto *et al.*, 2008; This *et al.*, 2007). Da sich aber vorangegangene Studien hauptsächlich auf die Analyse von *VvmybA1* und *Gret1* bezogen (Giannetto *et al.*, 2008; Pelsy, 2010; This *et al.*, 2007), lässt sich folglich vermuten, dass einige Mutationen mit Sicherheit unentdeckt geblieben sind. So wurde in Kerekes *et al.* (2015) zwar anhand eines SNP-Assays *VvmybA2* in Farbmutanten untersucht, jedoch ohne die entsprechenden Sequenzen zu analysieren, so dass keine Rückschlüsse auf rekombinante *VvmybA*-Varianten gezogen werden konnten.

Die Mutationen von 'Elbling Rot', 'Kernling' und 'Räuschling Rot' sind vermutlich durch einen vergleichbaren Mechanismus entstanden. 'Elbling Rot' besitzt das *VvmybA313*-Allel, das durch partielle Integration des funktionellen Bereiches von *VvmybA1* in den nicht funktionellen Bereich von *VvmybA3* entstand. 'Räuschling Rot' (*VvmybA232a*) sowie 'Kernling' (*VvmybA232b*) besitzen hingegen jeweils eine *VvmybA2*-Variante, die durch die partielle Integration des funktionellen Bereiches von *VvmybA3* in den nicht funktionellen 5'-Bereich von *VvmybA2* wahrscheinlich zu einer Teilfunktionalität führte. Der Ursprung aller drei Mutationen lässt sich dabei vermutlich auf homologe Rekombination durch den Synthesis-dependant strand annealing-Mechanismus (SDSA) zurückführen (siehe Abbildung 35A), der z.B. für die Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (Puchta, 1998; Roth *et al.*, 2012) und *Drosophila melanogaster* (McVey *et al.*, 2004; Sekelsky, 2017) ausführlich beschrieben wurde. Nach einem Doppelstrangbruch, der z.B. durch ionisierende Strahlung oder anhand Oxidation durch freie Radikale entstehen kann (Chu, 1997), kommt es dabei zuerst zur Resektion der 5'-Enden durch eine Exonuklease zusammen mit einer Helikase (Lyndaker & Alani, 2009; Mimitou & Symington, 2009). Falls nachfolgend ein homologer Sequenzabschnitt vorliegt, kann ein freier Einzelstrang in diesen Sequenzbereich invadieren und den vorliegenden Doppelstrang partiell auflösen. Diese neu entstandene Struktur wird als Displacement loop (D-loop) bezeichnet und ist Voraussetzung für die Neusynthese des invadierten Stranges. Der aufgelöste, homologe Doppelstrang dient dabei als Matrize, der nach Beendigung wieder freigesetzt wird. Anschließend kann dann der synthetisierte Einzelstrang auf der anderen Seite des DSB wieder hybridisieren, wobei durch Ligation von Lücken und Auffüllen der einzelsträngigen Bereiche die Stelle letztendlich repariert wird. Ist der zur Reparatur herangezogene Bereich dabei, wie im Falle von 'Elbling Rot', 'Kernling' und 'Räuschling Rot', nicht zu 100% identisch sondern homöolog, ändert sich entsprechend die Sequenz und kann

folglich zum Verlust oder Gewinn von Funktionalität führen. Allgemein wird dieser Vorgang als Genkonversion bezeichnet und führte in allen drei Fällen zu einer funktionellen *VvmybA*-Variante.

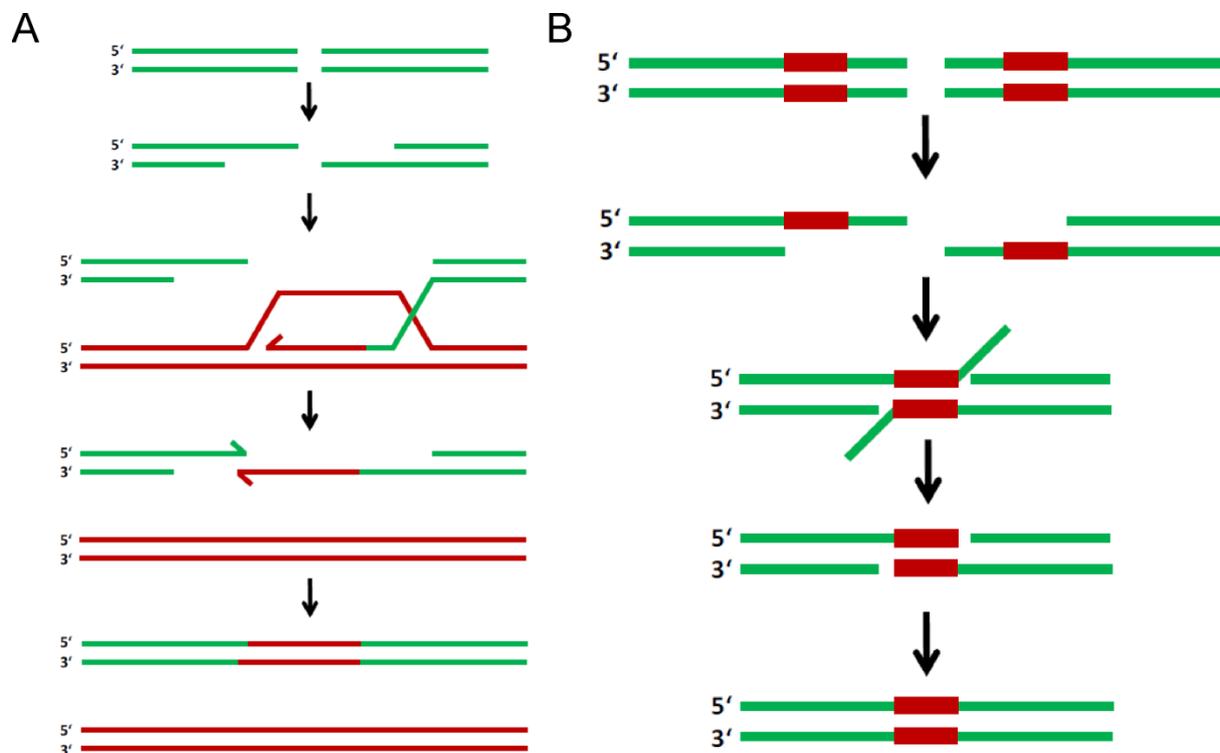


Abbildung 35: Synthesis-dependent strand annealing (SDSA) und Single-strand annealing (SSA) Pfad der homologen Rekombination als wahrscheinliche Ursachen der gefundenen mutierten *VvmybA*-Allele. (A) Schematische Darstellung des SDSA-Mechanismus. (B) Schematische Darstellung des SSA-Mechanismus. (Quelle: Steinert *et al.* (2016)).

Für somatisches Pflanzengewebe sind mehrere Mechanismen der homologen Rekombination beschrieben, von denen zwei als besonders wichtig erachtet werden. Neben dem SDSA, der zu den konservativen Mechanismen (keine Sequenzinformation geht verloren) gehört, spielt der nicht konservative (Sequenzinformation geht verloren) Single-strand annealing-Mechanismus (SSA) eine wichtige Rolle (Lin *et al.*, 1984; Pfeiffer *et al.*, 2000) (siehe Abbildung 35B). Auch hier werden nach einem DSB zunächst die 5'-Enden resektiert. Befinden sich nun längere, sich wiederholende Sequenzabschnitte innerhalb der freien 3'-Enden, können diese hybridisieren. Eventuelle Lücken im DNA-Rückgrat werden geschlossen und überhängende 3'-Enden abgebaut. Dabei geht der komplette Bereich zwischen den homologen Bereichen sowie eine der beiden Sequenzwiederholungen verloren. SSA spielt vor allem in genomischen Bereichen mit näher beieinander liegenden Sequenzwiederholungen eine Rolle (Siebert & Puchta, 2002), jedoch konnte auch gezeigt werden, dass trotz größerer Abstände

zwischen den Wiederholungen eine Deletion durch SSA stattfinden kann (Vaze *et al.*, 2002). Ein Beispiel hierzu ist vermutlich die gefundene Mutation von `Riesling Rot` und `Silvaner Blau` (*VvmybA31*, siehe Kapitel 3.1.3.4), denn die SSR-Analyse beider Sorten und die BAC-Sequenzierung von `Riesling Rot` zeigte, dass der komplette Bereich zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* fehlt. So kam es wahrscheinlich im Bereich dazwischen zu einem DSB, eventuell auch in *Gret1*, der in diesem Fall aber durch SSA zu einer homologen Rekombination von *VvmybA1* und *VvmybA3* führte und den Verlust von ca. 70 kb Sequenzinformation zur Folge hatte. Zusätzlich ist für `Riesling Rot` (Röckel *et al.*, 2017) bekannt, dass, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Farbmутanten, gehäuft eine Rückmutation zu weiß beobachtet werden kann. Da durch die homozygote Linie einer `Riesling Rot`-Rückmutante anhand SSR-Markern nachgewiesen werden konnte, dass der fehlende Bereich wieder komplett vorhanden zu sein scheint (siehe Tabelle 9), muss davon ausgegangen werden, dass dieser Bereich komplett vom homologen Chromosom (nicht mutiert) abstammt. Als mögliche Ursachen kommen hier der SDSA-Mechanismus sowie das Double-strand break repair-Modell (DSBR) in Frage (Puchta, 1998; Sung & Klein, 2006; Szostak *et al.*, 1983). Das Phänomen einer interchromosomalen homologen Rekombination wurde dabei schon z.B. für *Nicotinia tabacum* (Carlson, 1974), *Zea mays* (Hu *et al.*, 1998) oder *Arabidopsis thaliana* (Jelesko *et al.*, 1999) beschrieben und spielt bei der DNA-Reparatur in somatischen Zellen eine wichtige Rolle. Da auch meistens nur ein paar endständige Trauben oder nur gewisse Teile einer Traube mutiert sind, lässt sich vermuten, dass die Rückmutationen im apikalen Meristem während der Knospenentwicklung entstehen. Weitere Rückmutationen von rot nach weiß sind auch von den zwei Farbmутanten der Sorte `Italia blanc` (`Ruby Okuyama` und `Benitaka`) (Collet *et al.*, 2005) und `Gewürztraminer` (Erika Maul, persönliche Mitteilung) bekannt, die alle drei unterschiedliche Mutationen besitzen. `Ruby Okuyama` besitzt dabei das *MybA1b*-Allel, das auch für `Silvaner Rot` und `Müller-Thurgau Rot` nachgewiesen wurde, jedoch sind für beide Farbkclone keine Rückmutationen bekannt. Da zusätzlich für `Riesling Rot` bekannt ist, dass es Klone mit unterschiedlicher Rückmutationsrate gibt (Hubert Konrad, Hochschule Geisenheim, persönliche Mitteilung) und für `Silvaner Blau` trotz gleicher Mutation keine Rückmutationen bekannt sind (Petra Steinmann, Erhaltungszüchterin, persönliche Mitteilung), muss davon ausgegangen werden, dass die Rückmutationen Sorten-spezifisch und nicht Mutations-spezifisch sind. So wurde zwar schon in Collet

et al. (2005) vermutet, dass wahrscheinlich das Retrotransposon *Gret1* vor *VvmybA1* in Zusammenhang mit der Rückmutation steht, da im Allgemeinen Retrotransposons „Hotspots“ für Rekombinationen darstellen können (Kumar & Bennetzen, 1999; Wessler *et al.*, 1995), jedoch ist speziell in ‚Riesling Rot‘ *Gret1*, vermutlich bedingt durch den nicht konservativen SSA-Mechanismus, nicht mehr vorhanden. Lediglich mehrere repetitive Elemente befinden sich in der näheren Umgebung, die schon bei der *De Novo*-Assemblierung der BAC-Sequenzen zu Contig-Abbrüchen geführt haben und als mögliche Ursachen für eventuelle Rekombinationen in Frage kommen. Zusätzlich könnten, bedingt durch den Verlust der ca. 70 kb Sequenzinformation und der damit einhergehenden Neustrukturierung des Lokus, Veränderungen der DNA-Topologie oder epigenetische Modifikationen eine Rolle spielen. Warum jedoch ‚Silvaner Blau‘ trotz der gleichen Mutation keine Rückmutationen aufweist, bleibt unklar.

Anhand der homozygoten Selbstungslinien konnten die gefundenen Mutationen jeweils einer Haplophase zugeordnet werden. Durch Bestimmung des SSR-Markerprofils der Elternsorten (sofern bekannt) entlang Chromosom 2, konnte anschließend ermittelt werden, durch welche Elternteile die ursprünglichen Haplophasen vererbt wurden. So konnte, falls die Haplophase eindeutig von einem weißbeerigen Elternteil abstammt, daraus geschlossen werden, dass die weiße Variante die ursprüngliche gewesen sein muss, da der jeweilige Elternteil die Mutation nicht hätte vererben können. Jedoch lässt sich nicht vollkommen ausschließen, obwohl davon nicht auszugehen ist, dass in der Vergangenheit Farbmutanten in den weißbeerigen Elternsorten entstanden, die das entsprechende mutierte Allel an die nächste Generation vererbten und anschließend wieder verloren gingen. Deshalb müsste man nachweisen können, dass die entstehenden Rückmutanten sich von den weißbeerigen Ursprungsvarianten genetisch unterscheiden. Im Falle von ‚Riesling Rot‘ wurde erst der komplette Bereich zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* deletiert, aber anschließend, vermutlich durch Rekombination mit dem homologen Chromosom, wieder hergestellt. Dadurch sollte aber der Bereich zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3* nun homozygot vorliegen und zumindest SNPs im Vergleich zur ursprünglichen Haplophase aus ‚Riesling Weiß‘ aufweisen. Durch eine Sequenzierung der entsprechenden Bereiche und Identifizierung von Mutationen in ‚Riesling Weiß‘ und einer Rückmutante könnte so der eindeutige Beweis geliefert

werden, dass die entstehenden Rückmutanten sich genetisch von der Ursprungsorte unterscheiden.

4.1.2. Unterscheidungsmerkmale der Farbmutationen

Schon durch die Analyse der beiden Farbmutanten 'Ruby Okuyama' und 'Benitaka', die beide von der weißen Rebsorte 'Italia blanc' abstammen, aber dennoch unterschiedliche Mutationen aufweisen, konnte gezeigt werden, dass sich beide Farbkclone deutlich in der Expression der Gene des Anthocyan-Biosynthesewegs, der Anthocyankonzentration und im Anthocyanprofil unterscheiden (Azuma *et al.*, 2009). Deshalb wurde im Zuge dieses Projektes versucht, Unterscheidungsmerkmale zu finden, die sich eindeutig auf einen Mutationstyp unabhängig vom Genotyp zurückführen lassen.

Als ein Alleinstellungsmerkmal der *VvmybA2*-bezogenen Mutationen aus 'Räuschling Rot' (*MybA232a*) und 'Kernling' (*MybA232b*) konnte ein Cyanidin-3-O-glucosid-Anteil von ca. 95% identifiziert werden (siehe Kapitel 3.1.6). Wie durch die Expressionsanalyse der Gene des Anthocyan-Biosynthesewegs (beschrieben in Boss *et al.* (1996b)) nachgewiesen werden konnte, war eine Expression der O-Methyltransferasen (*VvOMT*, Umbau von Cyanidin-3-O-glucosid zu Peonidin-3-O-glucosid sowie Delphinidin-3-O-glucosid zu Petunidin-3-O-glucosid und Malvidin-3-O-glucosid) sowie der Flavonoid-3',5'-Hydroxylasen (*VvF3'5'H*, führt zu den dunkleren 3'5'-OH-Anthocyanen Delphinidin-3-O-glucosid, Petunidin-3-O-glucosid und Malvidin-3-O-glucosid) in beiden Sorten nicht feststellbar. Diese Tatsache steht somit in direktem Zusammenhang mit dem hohen Cyanidin-3-O-glucosid-Anteil. Da, wie schon in Kapitel 3.1.3.3 beschrieben, durch die spezifische Rekombination mit *VvmybA3* nur die Mutation im 5'-Bereich (L44R) komplementiert wurde, entsteht ein teilfunktionelles Protein, das in *in vitro* Versuchen kaum mehr in der Lage war, die Anthocyanbildung einzuleiten (Walker *et al.*, 2007). Die Teilfunktionalität beruht dabei vermutlich auf einer verringerten Interaktionsfähigkeit zu einem bHLH-Protein wie z.B. MYC1 (Hichri *et al.*, 2010), so dass die Entstehung des MYB-bHLH-WD40-Komplexes, der zur Funktionalität nötig ist (Grotewold *et al.*, 2000; Jaakola, 2013), nicht optimal funktioniert. Deshalb lässt sich vermuten, dass MYBA232a sowie MYBA232b die Expression von *VvF3'5'H* und *VvOMT* nicht (oder zu schwach für einen Nachweis) induzieren können. Beide Sorten besitzen auch im Verhältnis zu den anderen Farbmutanten einen signifikant geringeren Anthocyan Gehalt, so dass

auch hier die Beerenfarbe im Allgemeinen als rosa und nicht als rot beschrieben wird. Ein vergleichbar hoher Anteil an Cyanidin-3-O-glucosid konnte auch für die Sorten 'Gewürztraminer' und 'Muscat Rouge de Madère' nachgewiesen werden (Mattivi *et al.*, 2006). Für 'Muscat Rouge de Madère' ist keine Mutation beschrieben, jedoch wurde für 'Gewürztraminer' eine einzigartige *VvmybA1*-bedingte Mutation gefunden (This *et al.*, 2007). Da dies ein Widerspruch zu dem Alleinstellungsmerkmal der *VvmybA2*-bezogenen Mutationen aus 'Räuschling Rot' (*MybA232a*) und 'Kernling' (*MybA232b*) darstellt, wurde versucht, das beschriebene Allel aus 'Gewürztraminer' nachzuweisen, jedoch konnte das Ergebnis nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man aber den in This *et al.* (2007) angegebenen Promotorbereich für das Allel im Detail, fällt auf, dass dieser Bereich wahrscheinlich *VvmybA3*-bedingt ist und folglich die Angabe vermutlich auf einer Fehlinterpretation der Sequenzdaten beruht, da auch nur der vordere Bereich des Allels sequenziert wurde und folglich die Mutation im 3'-Bereich, die zu einem verkürzten Protein führt, nicht betrachtet wurde. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass auch 'Gewürztraminer' eine vergleichbare Mutation besitzt, die jedoch noch nachgewiesen werden muss.

Als zweites Alleinstellungsmerkmal innerhalb der untersuchten Farbmутanten konnte die Herbstlaubfärbung, bedingt durch das *MybA1b*-Allel, identifiziert werden (siehe Kapitel 3.1.7). So kann dieses Merkmal direkt zur Unterscheidung von 'Silvaner Rot' (*MybA1b*) und 'Silvaner Blau' (*MybA31*) genutzt werden, ohne eine molekularbiologische Untersuchung durchführen zu müssen, da alle anderen untersuchten Farbmутanten keine Herbstlaubfärbung aufwiesen. Durch bekannte *MybA1b*-Träger wie z.B. 'Gutedel Rot', 'Muskateller Rot' und 'Canadice', die alle gefärbtes Herbstlaub besitzen, konnte dies verifiziert werden. Warum jedoch der *VvmybA1b*-Promotor, auch trotz LTR-Überrest, in der Lage ist, die Expression im Herbst zu induzieren und die *VvmybA3* / *VvmybA2*-Promotoren der anderen *VvmybA*-Varianten nicht, muss weiter untersucht werden.

4.2. Färberreben (Teinturiers)

4.2.1. Die Entstehung der Mutation

Alle beerentragenden Rebsorten können prinzipiell anhand des Vorhandenseins oder Fehlens von Anthocyanen in der Beerenhaut in zwei Gruppen unterteilt werden. Da Weinreben aus praktischen Gründen zur Erhaltung der Weinqualität vegetativ vermehrt werden, kann eine Vielzahl von somatischen Mutationen auftreten, von denen nur wenige den Phänotyp und im Besonderen die Beerenfarbe beeinflussen. Demnach konnten die unterschiedlichsten Farbmutationen, die mit bloßem Auge leicht zu erkennen sind, seit Beginn des Weinbaus selektiert werden. Die molekularen Ursachen konnten dabei für eine Vielzahl von Mutanten am Beerenfarbokus gefunden werden, so dass kaum ein Merkmal so gut untersucht und verstanden ist (Pelsy, 2010). So beschäftigen sich auch schon vorangegangene Arbeiten mit den Eigenschaften und Besonderheiten der Färberreben, jedoch wurde die spezifische Mutation bisher noch nicht beschrieben (Falginella *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2006). Weitere Arbeiten fokussierten sich dabei auf Anthocyananalysen und untersuchten nicht die genetischen Ursachen (He *et al.*, 2010) oder verwendeten eine Primerkombination, die ein zu kurzes Fragment des *VvmybA1*-Promotors amplifizierte, so dass die Mutation unentdeckt blieb (Fournier-Level *et al.*, 2010). Jedoch konnte im Zuge dieser Arbeit eine sich wiederholende 408 bp Einheit (GCE) im Promotor-Bereich von *VvmybA1* identifiziert werden, die jeweils 2-fach, 3-fach oder 5-fach (entsprechende Allelnamen *MybA1t2*, *MybA1t3* und *MybA1t5*) in der Urfärberrebe 'Teinturier' sowie den entsprechenden Nachkommen nachgewiesen werden konnte und folglich als Ursache des Phänotyps angesehen werden muss. Ein Abgleich mit der BLAST-Datenbank (Daten nicht gezeigt) bestätigte dabei, dass die 408 bp Sequenz exklusiv vor *VvmybA1* und mit wenigen Mutation vor *VvmybA2* sowie *VvmybA3* vorkommt, so dass als Herkunft die Gattung *Vitis* angesehen werden kann. Zusätzlich konnte das GCE-Element dabei weder in nicht direkt verwandten Färberklonen mit deutlich schwächerer Farbausprägung wie 'Gamay Teinturier de Bouze' oder 'Pinot Teinturier' noch in klassischen Rotweinsorten (408 bp jeweils 1-fach) nachgewiesen werden. Demnach konnte daraus geschlossen werden, dass diese einzigartige Mutation in der Ursorte 'Teinturier' entstand und durch Kreuzung an die nächste Generation weitergegeben wurde.

Generell kann repetitive DNA in „zufällig“ eingestreute Repeats wie Retrotransposons und lokale Tandem-Repeats wie SSRs eingeteilt werden (Graw, 2015a). Wohingegen SSRs (auch Mikrosatelliten) wiederholende Einheiten von 1 bis 13 bp beschreiben, kann die Länge von sogenannten Minisatelliten bis zu 500 bp betragen (Vergnaud & Denoeud, 2000). Basierend auf dieser Definition kann das gefundene GCE-Element der Färberreben als Minisatellit bezeichnet werden. Seit der Erstbeschreibung für Menschen (Wyman & White, 1980) und Pflanzen (Dallas, 1988), konnten Minisatelliten als nützliche Werkzeuge für DNA fingerprinting (Jeffreys *et al.*, 1985), Gene mapping (Nakamura *et al.*, 1987) oder Evolutionsstudien (Sykorova *et al.*, 2006) eingesetzt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Minisatelliten die transkriptionelle Aktivität sowie das Splicing beeinflussen können. So führt in *Caenorhabditis elegans* ein Minisatellit, der in einem spezifischen Intron lokalisiert ist, zu einem veränderten alternativen Splicing (Glauser, 2014) und ein Minisatellit im Promotorbereich des menschlichen Insulins zu einer veränderten Genexpression in Abhängigkeit von der Größe (Kennedy *et al.*, 1995). Als Ursprung von Duplikationen in eukaryotischen Genomen konnten allgemein transposable Elemente (Ma & Bennetzen, 2004; Woodhouse *et al.*, 2010), der ungleiche Schwesterchromatidaustausch während einer Meiose oder intrachromosomale, allelische oder ektopische Rekombination nach einem DSB (Puchta, 2005) angesehen werden. Dahingegen kann im Speziellen die Entstehung eines Tandem-Repeats, anhand der fehlerhaften NHEJ-bedingten (Non-homologous end joining) Reparatur von DSBs (Messer & Arndt, 2007), der Reparatur von benachbarten Einzelstrangbrüchen (Schiml *et al.*, 2016) oder Replication slippage (Chen *et al.*, 2005; Levinson & Gutman, 1987) erklärt werden. Auch die dafür notwendigen Mikrohomologien (jeweils TCA vor und nach dem Repeat; siehe Anhang 9) wären dafür vorhanden. Wohingegen angenommen wird, dass SSRs sich durch Replication slippage, Rekombination und Reparatur erweitern oder verkürzen, wird für Minisatelliten, bedingt durch die Größe, ausschließlich die Rekombination als Ursache für eine eventuelle Erweiterung oder Verkürzung angenommen (Thomas, 2005). Da es auch weltweit viele weitere 'Teinturier'-Klone oder generell Färberrebsorten gibt, lässt sich auch nicht ausschließen, dass es, zusätzlich zu den drei gefundenen Allelen (*MybA1t2*, *MybA1t3* und *MybA1t5*), weitere Typen gibt oder entstehen können. So ist folglich denkbar, dass Sorten / Klone mit mehr als fünf Repeats entstehen könnten, die dann sogar eine noch stärkere Anthocyanfärbung

aufweisen würden, jedoch ist anzunehmen, dass es ein metabolisches Limit geben dürfte, da u.a. auch transgene *MybA*-Überexpressionslinien starke Fitnessdefizite aufweisen (Margit Harst, Julius Kühn-Institut, persönliche Mitteilung).

Aufgrund der zum Teil Jahrhunderte langen vegetativen Vermehrung von Reben im Weinbau, ist das Level an klonalen Variationen innerhalb einer Sorte, die ursprünglich von einem einzigen Sämling abstammten, relativ hoch (Pelsy, 2010). Somatische Mutationen können dabei entweder die komplette Pflanze betreffen oder eben nur eine Zellschicht. Befinden sich die Mutationen entsprechend nur in der L1- oder L2-Zellschicht, entstehen periklinale Chimären, die sich in der Weinqualität im Verhältnis zur Ursprungssorte unterscheiden können. So zeigt zum Beispiel 'Pinot Meunier', eine periklinale Chimäre von 'Pinot Noir', eine deutlich stärkere Behaarung der Triebe (Franks *et al.*, 2002), wohingegen 'Pinot Gris', eine weitere periklinale Chimäre von 'Pinot Noir', in L2 keine Anthocyane mehr produzieren kann und folglich aufgrund der grauen Beerenfarbe für die Rotweinproduktion ungeeignet ist (Vezzulli *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte für die 'Pinot'-Familie auch gezeigt werden, dass periklinale Chimären wie 'Pinot Gris' sowie homogenisierte Klone wie 'Pinot blanc' nicht einmalig entstanden sind, sondern sich genetisch zum Teil deutlich unterscheiden können (Pelsy *et al.*, 2015).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Urfärbersorte 'Teinturier' als eine periklinale Chimäre aus zwei genetisch unterschiedlichen Zelllinien identifiziert werden. Die äußere L1-Schicht wies dabei die nicht funktionelle *MybA1a*-Variante sowie das funktionelle *MybA1c*-Allel auf und sollte die ursprüngliche Konstitution am Farblokus bzgl. der Beerenfarbe widerspiegeln. L2 hingegen zeigte das nicht funktionelle *MybA1a*-Allel sowie jeweils eine der drei gefundenen *MybA1t*-Varianten. Da Gameten bei Dikotyledonen aus der L2-Zelllinie entstehen (Marcotrigiano & Bernatzky, 1995), konnte so 'Teinturier' den Färberreben-Phänotyp an die nächste Generation vererben, war aber im Gegensatz dazu nicht in der Lage das funktionelle *MybA1c*-Allel weiterzugeben. Jedoch kann es, bedingt durch zelluläre Rearrangements (Neuordnungen) der beiden Zellschichten, zu einer Homogenisierung der entsprechenden periklinale Chimäre kommen. Aufgrund des geringeren Grades an Organisation der Zellteilung in L2 sollte eine Verdrängung (Displacement) von L1 deutlich häufiger auftreten (Hocquigny *et al.*, 2004). Bei dem gegensätzlichen Phänomen hingegen, das deutlich seltener auftreten sollte, spricht man von Ersetzen (Replacement). Das Homogenisieren des Phänotyps durch L1

sollte im Falle von 'Teinturier' zu einem Klon ohne gefärbtes Fruchtfleisch führen, jedoch befindet sich die Ursorte kaum im Anbau, so dass, aufgrund der geringen Mutationsfrequenz, eine Selektion schwierig werden dürfte. Dennoch ist ein 'Teinturier'-Klon ohne gefärbtes Fruchtfleisch, durch die nahe Verwandtschaft zu 'Pinot Noir', aus züchterischen sowie wissenschaftlichen Aspekten von besonders großem Interesse.

4.2.2. Auswirkungen auf den Phänotyp

Wie in Espley *et al.* (2009) beschrieben, entsteht der Färber-Phänotyp bei Äpfeln, der vergleichbar zur Weinrebe ist, durch die Autoregulation des *Mdmyb10* Gens. In einem vorgeschlagenen Modell bindet das eigene MYB10-Protein an eine 23 bp wiederholende Einheit im Promotor und verstärkt dadurch die transkriptionelle Aktivität, die zu einer ektopischen Anthocyanakkumulation führt. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Anzahl der wiederholten Einheiten des 23 bp Repeats mit dem Level an Transaktivierung von *Mdmyb10* korreliert. Deswegen kann angenommen werden, dass das GCE-Element der Färberreben durch einen vergleichbaren Mechanismus wirkt, obwohl die wiederholende Einheit ca. 20-fach größer ist. Dazu führte ein Screening des 408 bp Fragments nach putativen MYB-Bindedomänen mit den Datenbanken PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002; Rombauts *et al.*, 1999) und PLACE (Higo *et al.*, 1999) zu vier möglichen Bindestellen (siehe Abbildung 36A). Die jeweiligen Motive wurden beschrieben für *Zea mays* (MYBPZM: Grotewold *et al.* (1994); MBS: Bodeau & Walbot (1996)), *Petunia* (MYBCORE: Solano *et al.* (1995)) und *Solanum tuberosum* (MYBST1: Baranowskij *et al.* (1994)) und müssten für *Vitis vinifera* erst noch experimentell bestätigt werden, jedoch befinden sich alle Motive (aufgrund variabler Basen im Motiv) auch im *VvUFGT*-Promotor (Daten nicht gezeigt), der ein natives MYBA1 „Target“ darstellt (Tipa-Umphon *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2006). Dazu würde sich ein EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) analog zu den Arbeiten von Espley *et al.* (2009) anbieten.

So ist es denkbar, dass eine dieser Bindedomänen (theoretisch auch weitere nicht beschriebene) alleine oder eine Kombination aus allen anhand der zusätzlichen MYB-Bindestellen in den *MybA1t*-Promotoren zu einer stärkeren Autoaktivierung von *VvmybA1* führen. Ein mögliches Modell anhand Espley *et al.* (2009) im Vergleich

zum Wildtyp *MybA1c* ist in Abbildung 36B dargestellt. Demnach steigt mit jedem zusätzlichen Repeat die Autoaktivierung des *VvmybA1*-Promotors durch zusätzliche Bindestellen für das MYBA1-Protein und würde den deutlich dunkleren Phänotyp der *MybA1t3*- bzw. *MybA1t5*-Träger erklären. Der Effekt, dass mit steigender Repeat-Anzahl auch die Anthocyankonzentration nachfolgend steigt, konnte anhand von Blattmaterial von 'Teinturier'-Klonen sowie anhand von Beerenmaterial von direkten Nachkommen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.2).

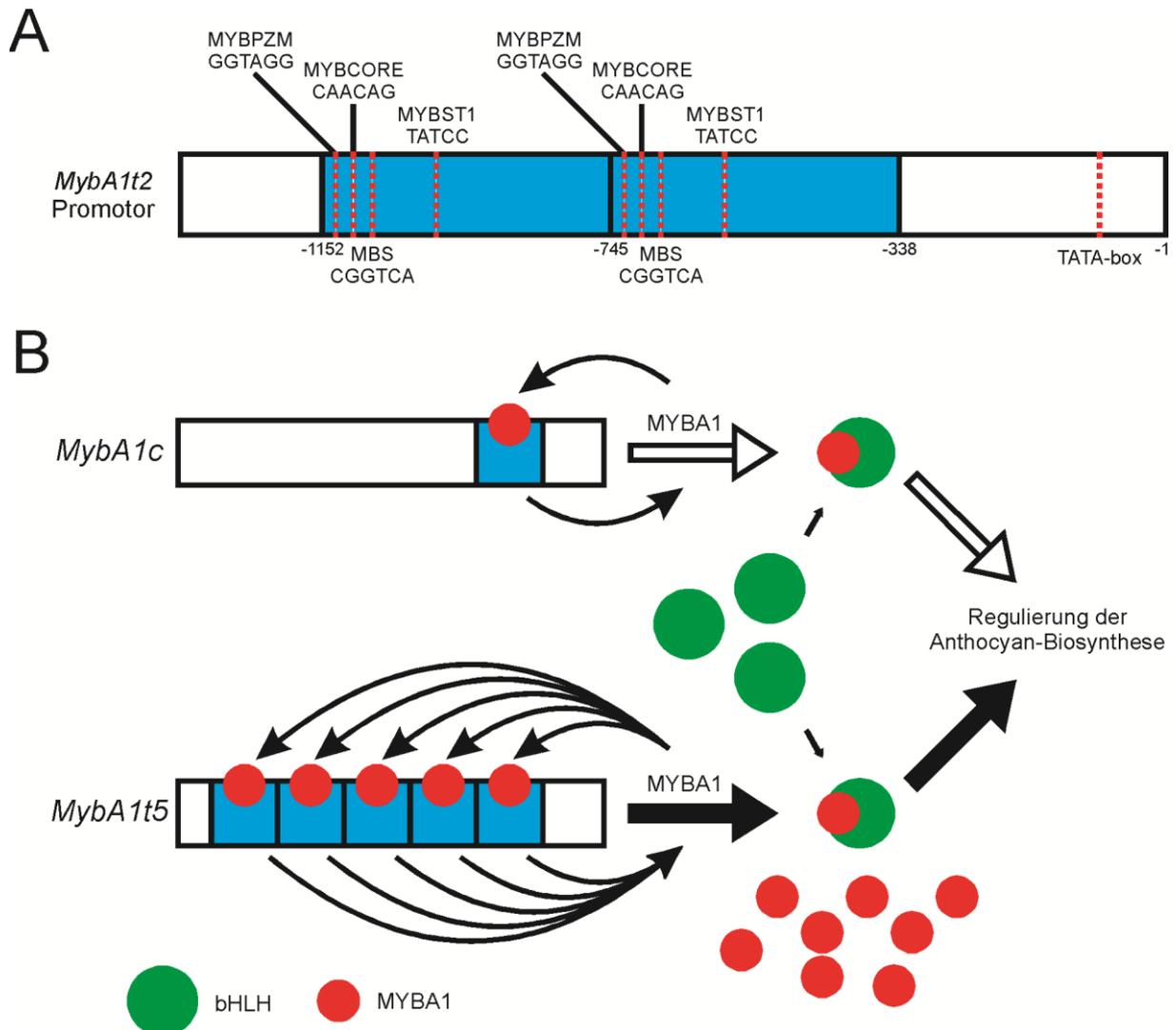


Abbildung 36: Modell zum Wirkmechanismus des 408 bp GCE-Elements. (A) Putative MYB-Bindedomänen innerhalb des 408 bp Repeat anhand der Datenbanken PlantCARE (Lescot et al., 2002; Rombauts et al., 1999) und PLACE (Higo et al., 1999) exemplarisch für den *MybA1t2*-Promotor. (B) Modell zur Autoaktivierung des *VvmybA1*-Promotors in Färbereben nach Espley et al. (2009).

Wohingegen bzgl. der Expression von *VvmybA1* und *VvUFGT* in den Beerenproben vier Wochen vor *Véraison* diese Korrelation noch festgestellt werden konnte, war vier Wochen nach *Véraison* nur noch ein genereller Unterschied der Färbereben zur

Pinot Noir'-Referenz festzustellen. Deshalb kann angenommen werden, dass trotz der zusätzlichen Repeats ein Limit der *VvmybA1* sowie *VvUFGT* Expression erreicht wird, so dass keine Unterscheidung zu diesem Zeitpunkt mehr erfolgen kann. Da jedoch vier Wochen vor *Véraison* dieser Unterschied noch nachzuweisen war, kann davon ausgegangen werden, dass das Limit von den *MybA1t5*-Trägern (entsprechend *MybA1t3*) vermutlich früher erreicht wird und dadurch die stärkere Färbung entsteht. Durch eine Genexpressionsanalyse von *VvmybA1* und *VvUFGT* im Verlauf beginnend mit dem Ansetzen der Beeren bis zur Lese mit relativ kurzen Probennahme-Intervallen sollte diese Frage geklärt werden können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten die Farbmutationen anhand der Analyse der sich am Beerenfarblokus der Weinrebe (Chr 2, ~14,2 Mb) befindenden Transkriptionsfaktorgene *VvmybA1*, *VvmybA2* und *VvmybA3* von sieben rotbeerigen Klonen weißer Qualitätssorten des deutschsprachigen Raums weitgehend geklärt werden. 'Silvaner Rot' und 'Müller-Thurgau Rot' zeigten dabei das in der Literatur meist beschriebene *MybA1b*-Allel, wohingegen die Mutationen der anderen untersuchten Farbmutanten bisher unbekannt waren. Die zur Farbe führenden *VvmybA*-Varianten von 'Elbling Rot' (*VvmybA313*, homologe Rekombination von *VvmybA3* mit *VvmybA1*) sowie 'Räuschling Rot' und 'Kernling' (*VvmybA232a* / *VvmybA232b*, in beiden Fällen homologe Rekombination von *VvmybA2* mit *VvmybA3*) sind vermutlich durch den konservativen Synthesis-dependant strand annealing-Mechanismus (SDSA) entstanden, bei dem jeweils nach einem Doppelstrangbruch (DSB) zur Reparatur ein homologer Abschnitt eines anderen *VvmybA*-Gens als Matrize verwendet wurde. Im Gegensatz dazu wiesen 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' die gleiche funktionelle Genvariante (*VvmybA31*) auf, die wahrscheinlich, analog zur Entstehung des *MybA1b*-Allels, durch den nicht konservativen Single-strand annealing-Mechanismus (SSA) entstanden ist. Wohingegen es im Falle des *MybA1b*-Allels den Verlust des Retrotransposons *Gret1* sowie eines LTRs zur Folge hatte, kam es in 'Riesling Rot' und 'Silvaner Blau' zu dem kompletten Verlust des Sequenzbereiches (ca. 70 kb) zwischen *VvmybA1* und *VvmybA3*.

Anhand der Zuweisung der Mutation zu einer spezifischen Haplophase mittels SSR-Markeranalyse der homozygoten Selbstungslinien konnte anschließend der entsprechende Elternteil bestimmt werden, der, unabhängig von der Mutation, die Haplophase vererbte. So konnte bei allen geselbsteten Farbmutanten außer 'Räuschling Rot' bestätigt werden, dass die Mutations-tragenden Haplophasen ursprünglich von weißbeerigen Elternteilen abstammen und folglich die Mutationen erst in den weißen Varianten entstanden sein müssen. Zusätzlich konnten durch eine umfangreiche Anthocyananalyse reifer Beeren und durch eine Herbstlaubbonitur phänotypische Alleinstellungsmerkmale einzelner Mutationen identifizieren werden. So färbte sich bei allen Sorten, die das *MybA1b*-Allel tragen, im Herbst das Laub rot und für Sorten die eine *VvmybA2*-bezogene Mutation besitzen ('Räuschling Rot' und 'Kernling'), konnte ein Cyanidin-3-O-glucosid-Anteil von ca. 95% in reifen Beeren als

Charakteristikum nachgewiesen werden. Beide gefundenen Merkmale können in zukünftigen Arbeiten sowie in der Züchtung zur Identifikation von Farbmutationen eingesetzt werden.

Des Weiteren konnte der molekulare Ursprung der Färberreben identifiziert und ein Bezug zu den Auswirkungen auf den Phänotyp hergestellt werden. Bedingt durch ein 408 bp Repeat (2-fach, 3-fach sowie 5-fach möglich) im Promotorbereich von *VvmybA1* kommt es vermutlich zur Autoregulation des Lokus und folglich zur ektopischen Anthocyanakkumulation unabhängig von der Reife. Der Ursprung der Mutation geht dabei auf die Sorte 'Teinturier' (eine periklinale Chimäre) zurück und wurde entsprechend an die nächste Generation weitergeben. In einem putativen Modell kann MYBA1, bedingt durch zusätzliche Bindedomänen innerhalb des 408 bp Repeats, an den eigenen Promotor verstärkt binden und somit die Expression durch Autoregulation steigern. So konnte in den Blättern von 'Teinturier'-Klonen sowie den reifen Beeren von direkten Nachkommen gezeigt werden, dass die Repeat-Anzahl direkt mit der Anthocyankonzentration korreliert.

Vermutlich bedingt durch das Retrotransposon *Gret1* und weitere repetitive DNA-Elemente ist der Bereich des Beerenfarblokus von *Vitis vinifera* ein Hotspot für homologe Rekombinationen, die zu den unterschiedlichsten funktionellen *VvmybA*-Varianten führen können und folglich die Evolution des Beerenfarblokus kontinuierlich vorantreiben.

6. Summary

In this work, the color mutations of seven red clones of famous grapevine varieties from the German-speaking area were identified by analyzing the transcription factor genes located at the berry color locus (Chr 2, ~14,2 Mb) *VvmybA1*, *VvmybA2* and *VvmybA3*. Both, 'Silvaner Rot' and 'Müller-Thurgau Rot' showed the most commonly found allele *MybA1b*, whereas the other color mutations were not described in literature so far. The color-related mutations in 'Elbling Rot' (*VvmybA313*, homologous recombination of *VvmybA3* and *VvmybA1*) as 'Räuschling Rot' and 'Kernling' (*VvmybA232a* / *VvmybA232b*, both homologous recombination of *VvmybA2* and *VvmybA3*) most likely arose via the conservative synthesis-dependant strand annealing mechanism (SDSA) that uses a homologous region as template for the repair of a double strand break (DSB). In contrast, 'Riesling Rot' and 'Silvaner Blau' showed the same functional gene variant (*VvmybA31*) that putatively arose by means of the non-conservative single-strand annealing mechanism (SSA) analogous to the *MybA1b* allele. Whereas in the case of the *MybA1b* allele the retrotransposon *Gret1* and one LTR are just missing, 'Riesling Rot' and 'Silvaner Blau' both show a deletion of the complete area (~ 70 kb) between *VvmybA1* and *VvmybA3*.

Based on the SSR-marker analysis of the homozygous selfed lines, the specific mutations could be linked to the haplophases inherited by their respective parents. Hence, it was possible to show that for all analyzed color mutants, except 'Räuschling Rot', a white ancestor inherited the mutation-bearing haplophase and therefore the mutation had to have arisen in the white clones. Additionally, by analyzing the anthocyanin composition in ripe berries and by evaluating the coloration of autumn leaves, two unique characteristics linked to specific mutations could be identified. All cultivars bearing the *MybA1b* allele exclusively showed red coloration of the autumn leaves whereas the color mutants with the *VvmybA2*-related mutations ('Räuschling Rot' and 'Kernling') possessed a 95% proportion of cyanidin-3-O-glucoside in ripe berry skins.

Furthermore, the molecular origin of the teinturier grapes could be identified and the effects of the mutation on the phenotype were evaluated. A 408 bp repeat (2x, 3x and 5x possible) in the promoter region of *VvmybA1* is putatively leading to the autoregulation of the locus and therefore to ectopic formation of anthocyanins independently of ripening. The origin of the mutation goes back to the variety 'Teinturier' (a periclinal chimera) and was then passed on to the next generation. In a

putative model, the MYBA1 protein can bind on its own promoter due to additional MYB binding sites in the repeat and is therefore leading to an enhanced *VvmybA1* expression. Additionally, by analyzing the leaf samples of 'Teinturier' clones and berry samples of the direct progeny, it was possible to show that the repeat number is strongly correlating with an increase of the anthocyanin concentration.

Presumably due to the retrotransposon *Gret1* and further repetitive DNA elements, the berry color locus of *Vitis vinifera* displays a hotspot for homologous recombinations which can lead to plenty functional *VvmybA* variants and drive therefore the evolution of the berry color continuously forward.

Literaturverzeichnis

- Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003).** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **15**, 63-78.
- Aeberhard M. (2005).** Geschichte der alten Traubensorten. *Aercadia-Verlag Solothurn* 1.
- Ali M.B., Howard S., Chen S., Wang Y., Yu O., Kovacs L.G., Qiu W. (2011).** Berry skin development in Norton grape: distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis. *BMC Plant Biol* **11**, 7.
- Alleweldt G. (1965).** Über das Vorkommen von Wildreben in der Türkei. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* **53**, 380.
- Anderson K., Aryal N. (2013).** Where in the world are various winegrape varieties grown? Evidence from a new database. *OIV Bulletin* **86**, 461-484.
- Anderson K., Aryal N.R. (2015).** Which winegrape varieties are grown where? A global empirical picture. *University of Adelaide Press*.
- Azuma A., Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Shiraishi M., Mitani N., Yakushiji H., Koshita Y. (2009).** Color recovery in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) 'Benitaka', a bud sport of 'Italia', is caused by a novel allele at the *VvmybA1* locus. *Plant Science* **176**, 470-478.
- Babo L. (1844).** Der Weinstock und seine Varietäten. *Verlag Brönner, Frankfurt*.
- Babo L.J.L., Metzger J. (1851).** Wein-und Tafeltrauben der deutschen Weinberge und Gärten. *Verlag von Franz Köhler, Stuttgart*.
- Balaban A., Schroth W., Fischer G. (1969).** Pyrylium salts part I. Syntheses. *Advances in heterocyclic chemistry* **10**, 241-326.
- Balík J., Kumšta M., Rop O. (2013).** Comparison of anthocyanins present in grapes of *Vitis vinifera* L. varieties and interspecific hybrids grown in the Czech Republic. *Chemical Papers* **67**.
- Baranowskij N., Froberg C., Prat S., Willmitzer L. (1994).** A Novel DNA-Binding Protein with Homology to Myb Oncoproteins Containing Only One Repeat Can Function as a Transcriptional Activator. *Embo Journal* **13**, 5383-5392.
- Barber H. (1965).** Selection in natural populations. *Heredity (Edinb)* **20**, 1-72.
- Barnard H., Dooley A.N., Areshian G., Gasparyan B., Faull K.F. (2011).** Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of Archaeological Science* **38**, 977-984.
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B., Lepiniec L. (2004).** TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **39**, 366-380.
- Bock H. (1595).** Kreütterbuch. *Straßburg*.
- Bodeau J.P., Walbot V. (1996).** Structure and regulation of the maize *Bronze2* promoter. *Plant Molecular Biology* **32**, 599-609.

- Bogs J., Ebadi A., McDavid D., Robinson S.P. (2006).** Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology* **140**, 279-291.
- Bogs J., Jaffe F.W., Takos A.M., Walker A.R., Robinson S.P. (2007).** The grapevine transcription factor *VvMYBPA1* regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology* **143**, 1347-1361.
- Bosenko O., Eder R. (2011).** Zusammenhänge zwischen der chemischen Zusammensetzung und der objektiven beziehungsweise subjektiven Farbqualität von Rotweinen. *Mitteilungen Klosterneuburg* **61**, 166-178.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. (1996a).** Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2**, 163–170.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. (1996b).** Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* **32**, 565-569.
- Britsch L., Heller W., Grisebach H. (1981).** Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Zeitschrift für Naturforschung C* **36**, 742-750.
- Bronner J.P. (1857).** Die wilden Trauben des Rheinthales. *Buchdruckerei von Georg Mohr*.
- Brouillard R., Markakis P. (1982).** Anthocyanin as Food Colors. *Academic Press, New York London* **1**.
- Burchett W.W., Ellis A.R., Harrar S.W., Bathke A.C. (2017).** Nonparametric Inference for Multivariate Data: The R Package nrmv. *Journal of Statistical Software* **76**.
- Büscher N., Zyprian E., Bachmann O., Blaich R. (1994).** On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis* **33**, 15-17.
- Carey C.C., Strahle J.T., Selinger D.A., Chandler V.L. (2004).** Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16**, 450-464.
- Carlson P.S. (1974).** Mitotic crossing-over in a higher plant. *Genetical Research* **24**, 109-112.
- Chandra A., Rana J., Li Y.Q. (2001).** Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3515-3521.
- Chen J.M., Chuzhanova N., Stenson P.D., Férec C., Cooper D.N. (2005).** Meta-Analysis of gross insertions causing human genetic disease: Novel mutational mechanisms and the role of replication slippage. *Human Mutation* **25**, 207-221.
- Chu G. (1997).** Double strand break repair. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 24097-24100.
- Chun O.K., Kim D.-O., Lee C.Y. (2003).** Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 8067-8072.

- Collet S.A.D., Collet M.A., Machado M.D.P.S. (2005).** Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 691-703.
- Cunningham Jr F., Gantt E. (1998).** Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* **49**, 557-583.
- Czemmel S., Heppel S.C., Bogs J. (2012).** R2R3 MYB transcription factors: key regulators of the flavonoid biosynthetic pathway in grapevine. *Protoplasma* **249**, 109-118.
- Dallas J.F. (1988).** Detection of DNA Fingerprints of Cultivated Rice by Hybridization with a Human Minisatellite DNA Probe. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6831-6835.
- Davies K.M. (2009).** An introduction to plant pigments in biology and commerce. *Plant pigments and their manipulation*, 1-22.
- Davies K.M., Schwinn K.E. (2003).** Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology* **30**, 913-925.
- De Lorenzis G., Squadrito M., Brancadoro L., Scienza A. (2015).** Zibibbo Nero characterization, a red-wine grape revertant of Muscat of Alexandria. *Mol Biotechnol* **57**, 265-274.
- De Rosso M., Tonidandel L., Larcher R., Nicolini G., Ruggeri V., Dalla Vedova A., De Marchi F., Gardiman M., Flamini R. (2012).** Study of anthocyanic profiles of twenty-one hybrid grape varieties by liquid chromatography and precursor-ion mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **732**, 120-129.
- Dettweiler E. (1991).** Genetic resources - Distinction and identification of cultivars. (Germplasm Repository for Grapevine. Newsletter 2). *Vitis* **30**, 45-47.
- Dettweiler E., Jung A. (2001).** Die Müller-Thurgau-Rebe, das Kreuzungsprodukt von Riesling x Madeleine Royale. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **52**, 101-104.
- Dixon R.A., Steele C.L. (1999).** Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **4**, 394-400.
- Doligez A., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Laucou V., Merdinoglu D., Meredith C.P., Riaz S., Roux C., This P., Di Gaspero G. (2006).** An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theoretical and applied genetics* **113**, 369-382.
- Eichelsbacher H.M. (1957).** Ein genetisch-züchterischer Vergleich der Rebensorten Riesling, Silvaner und Müller-Thurgau. *Die Gartenbauwissenschaft* **22**, 99-139.
- Espley R.V., Brendolise C., Chagne D., Kutty-Amma S., Green S., Volz R., Putterill J., Schouten H.J., Gardiner S.E., Hellens R.P., Allan A.C. (2009).** Multiple Repeats of a Promoter Segment Causes Transcription Factor Autoregulation in Red Apples. *Plant Cell* **21**, 168-183.
- Failla O., Ibáñez Marcos J., Montemayor M.I., Rustioni L. (2014).** First results of the European grapevine collections' collaborative network: Validation of a standard eno-carpological phenotyping method. *Vitis* **53**, 219-226.
- Falginella L., Di Gaspero G., Castellarin S.D. (2012).** Expression of flavonoid genes in the red grape berry of 'Alicante Bouschet' varies with the histological distribution of anthocyanins and their chemical composition. *Planta* **236**, 1037-1051.

- Fiehn O. (2002).** Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* **48**, 155-171.
- Fournier-Level A., Lacombe T., Le Cunff L., Boursiquot J.M., This P. (2010).** Evolution of the *VvMybA* gene family, the major determinant of berry colour in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Heredity (Edinb)* **104**, 351-362.
- Fournier-Level A., Le Cunff L., Gomez C., Doligez A., Ageorges A., Roux C., Bertrand Y., Souquet J.M., Cheynier V., This P. (2009).** Quantitative Genetic Bases of Anthocyanin Variation in Grape (*Vitis vinifera* L. ssp *sativa*) Berry: A Quantitative Trait Locus to Quantitative Trait Nucleotide Integrated Study. *Genetics* **183**, 1127-1139.
- Franks T., Botta R., Thomas M.R. (2002).** Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and applied genetics* **104**, 192-199.
- Galet P. (2000).** Encyclopedic dictionary of grapevine cultivars. *Hachette Livre, Paris*.
- Gerós H., Chaves M., Delrot S. (2012).** The biochemistry of the grape berry. *Bentham Science Publishers*.
- Giannetto S., Velasco R., Troggio M., Malacarne G., Storchi P., Cancellier S., De Nardi B., Crespan M. (2008).** A PCR-based diagnostic tool for distinguishing grape skin color mutants. *Plant Science* **175**, 402-409.
- Glauser D.A. (2014).** The multiplicity of alternative splicing decisions in *Caenorhabditis elegans* is linked to specific intronic regulatory motifs and minisatellites. *Bmc Genomics* **15**.
- Goldberg D.M., Hahn S.E., Parkes J.G. (1995).** Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clinica Chimica Acta* **237**, 155-187.
- Grassi F., Labra M., Imazio S., Spada A., Sgorbati S., Scienza A., Sala F. (2003).** Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Theoretical and applied genetics* **107**, 1315-1320.
- Graw J. (2015a).** Instabilität, Flexibilität und Variabilität des Genoms. *Genetik: Springer*, 339-398.
- Graw J. (2015b).** Molekulare Struktur und Regulation eukaryotischer Gene. *Genetik: Springer*, 261-290.
- Green B., Durnford D. (1996).** The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **47**, 685-714.
- Grotewold E. (2006).** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 761-780.
- Grotewold E., Drummond B.J., Bowen B., Peterson T. (1994).** The *myb*-Homologous P-Gene Controls Phlobaphene Pigmentation in Maize Floral Organs by Directly Activating a Flavonoid Biosynthetic Gene Subset. *Cell* **76**, 543-553.
- Grotewold E., Sainz M.B., Tagliani L., Hernandez J.M., Bowen B., Chandler V.L. (2000).** Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13579-13584.

- Gu C., Liao L., Zhou H., Wang L., Deng X., Han Y. (2015).** Constitutive Activation of an Anthocyanin Regulatory Gene *PcMYB10.6* Is Related to Red Coloration in Purple-Foliage Plum. *PLoS One* **10**, e0135159.
- Guasch-Jané M.R., Andrés-Lacueva C., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R.M. (2006).** First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun's tomb. *Journal of Archaeological Science* **33**, 1075-1080.
- Habu Y., Hisatomi Y., Iida S. (1998).** Molecular characterization of the mutable flaked allele for flower variegation in the common morning glory. *The Plant Journal* **16**, 371-376.
- Hall T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, Vol. 41: London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 95-98.
- Harborne J. (1976).** Functions of flavonoids in plants. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. TW Goodwin, ed.
- Harborne J.B., Grayer R.J. (1980).** The anthocyanins. *The flavonoids: advances in research since*, 1-20.
- Harst M., Bornhoff B.-A., Zyprian E., Töpfer R. (2000).** Influence of culture technique and genotype on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos (*Vitis vinifera*) and their conversion to transgenic plants. *Vitis* **39**, 99.
- He J.J., Liu Y.X., Pan Q.H., Cui X.Y., Duan C.Q. (2010).** Different Anthocyanin Profiles of the Skin and the Pulp of Yan73 (Muscat Hamburg x Alicante Bouschet) Grape Berries. *Molecules* **15**, 1141-1153.
- Hichri I., Heppel S.C., Pillet J., Leon C., Czemplin S., Delrot S., Lauvergeat V., Bogs J. (2010).** The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Mol Plant* **3**, 509-523.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. (1999).** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**, 297-300.
- Hillebrand W., Lott H., Pfaff F. (2003).** Taschenbuch der Rebsorten. *Fraund, Mainz*.
- Hinz U., Fivaz J., Girod P.-A., Zyrd J.-P. (1997).** The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Molecular and General Genetics MGG* **256**, 1-6.
- Hisatomi Y., Hanada K., Iida S. (1997).** The retrotransposon RTip1 is integrated into a novel type of minisatellite, MiniSip1, in the genome of the common morning glory and carries another new type of minisatellite, MiniSip2. *Theoretical and applied genetics* **95**, 1049-1056.
- Hocquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., Heloir M.C., Merdinoglu D. (2004).** Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* **47**, 579-589.
- Horstmann V., Huether C.M., Jost W., Reski R., Decker E.L. (2004).** Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC biotechnology* **4**, 13.
- Hort A. (1916).** Enquiry into plants and minor works on odours and weather signs. *W. Heinemann* 1.

- Howitt C.A., Pogson B.J. (2006).** Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* **29**, 435-445.
- Hu W., Timmermans M.C., Messing J. (1998).** Interchromosomal recombination in *Zea mays*. *Genetics* **150**, 1229-1237.
- Iandolino A.B., da Silva F.G., Lim H., Choi H., Williams L.E., Cook D.R. (2004).** High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter* **22**, 269-278.
- Inagaki Y., Hisatomi Y., Suzuki T., Kasahara K., Iida S. (1994).** Isolation of a Suppressor-mutator/Enhancer-like transposable element, Tpn1, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *The Plant Cell* **6**, 375-383.
- Jaakola L. (2013).** New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science* **18**, 477-483.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyere C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pe M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quetier F., Wincker P., Public F.-I. (2007).** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-465.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985).** Hypervariable Minisatellite Regions in Human DNA. *Nature* **314**, 67-73.
- Jelesko J.G., Harper R., Furuya M., Gruissem W. (1999).** Rare germinal unequal crossing-over leading to recombinant gene formation and gene duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 10302-10307.
- Jeong S.T., Goto-Yamamoto N., Hashizume K., Kobayashi S., Esaka M. (2006).** Expression of *VvmybA1* gene and anthocyanin accumulation in various grape organs. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**, 507-510.
- Jia L., Clegg M.T., Jiang T. (2004).** Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies indica and japonica genomes. *Plant Physiology* **134**, 575-585.
- Jin H., Martin C. (1999).** Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology* **41**, 577-585.
- Kalinowski S.T., Wagner A.P., Taper M.L. (2006).** ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* **6**, 576-579.
- Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Koide T., Umeda T., Yukawa T., Terabe K. (1995).** Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation* **13**, 590-594.
- Kammerer D., Kljusuric J.G., Carle R., Schieber A. (2005).** Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research and Technology* **220**, 431-437.

- Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M. (2003).** Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 68-75.
- Kayesh E., Shangguan L., Korir N.K., Sun X., Bilkish N., Zhang Y., Han J., Song C., Cheng Z.-M., Fang J. (2013).** Fruit skin color and the role of anthocyanin. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 2879-2890.
- Kennedy G.C., German M.S., Rutter W.J. (1995).** The Minisatellite in the Diabetes Susceptibility Locus Iddm2 Regulates Insulin Transcription. *Nat Genet* **9**, 293-298.
- Kerekes A., De Lorenzis G., Szoke A., Kiss E., Failla O. (2015).** Analysis of *VvMybA1* and *VvMybA2* genes in grape bud sports. *Vitis* **54**, 45-48.
- Kevan P., Baker H. (1983).** Insects as flower visitors and pollinators. *Annual review of entomology* **28**, 407-453.
- Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. (2004).** Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**, 982.
- Kobayashi S., Ishimaru M., Ding C.K., Yakushiji H., Goto N. (2001).** Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci* **160**, 543-550.
- Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. (2003).** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.
- Kubo H., Peeters A.J., Aarts M.G., Pereira A., Koornneef M. (1999).** ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **11**, 1217-1226.
- Kühnau J. (1976).** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World review of nutrition and dietetics: *Karger Publishers*, 117-191.
- Kumar A., Bennetzen J.L. (1999).** Plant retrotransposons. *Annual review of genetics* **33**, 479-532.
- Labra M., Failla O., Forni G., Ghiani A., Scienza A., Sala F. (2002).** Microsatellite analysis to define genetic diversity of grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in Central and Western Mediterranean countries. *OENO One* **36**, 11-20.
- Lacombe T., Boursiquot J.M., Laucou V., Di Vecchi-Staraz M., Peros J.P., This P. (2013).** Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theor Appl Genet* **126**, 401-414.
- Lee H.S., Hong V. (1992).** Chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography A* **624**, 221-234.
- Leprince D., Saule S., de Taisne C., Gegonne A., Begue A., Righi M., Stehelin D. (1983).** The human DNA locus related to the oncogene myb of avian myeloblastosis virus (AMV): molecular cloning and structural characterization. *Embo Journal* **2**, 1073-1078.
- Lescot M., Dehais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouze P., Rombauts S. (2002).** PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **30**, 325-327.

- Levadoux L. (1956).** Les populations sauvages et cultivées des *Vitis vinifera* L. *Institut national de la recherche agronomique* 1.
- Levinson G., Gutman G.A. (1987).** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4, 203-221.
- Liang Z., Wu B., Fan P., Yang C., Duan W., Zheng X., Liu C., Li S. (2008).** Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry* 111, 837-844.
- Lijavetzky D., Ruiz-Garcia L., Cabezas J.A., De Andres M.T., Bravo G., Ibanez A., Carreno J., Cabello F., Ibanez J., Martinez-Zapater J.M. (2006).** Molecular genetics of berry colour variation in table grape. *Mol Genet Genomics* 276, 427-435.
- Lin F., Sperle K., Sternberg N. (1984).** Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Molecular and cellular biology* 4, 1020-1034.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Luo M., Wang Y.-H., Frisch D., Joobeur T., Wing R.A., Dean R.A. (2001).** Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (Fom-2). *Genome* 44, 154-162.
- Lyndaker A.M., Alani E. (2009).** A tale of tails: insights into the coordination of 3' end processing during homologous recombination. *Bioessays* 31, 315-321.
- Ma J., Bennetzen J.L. (2004).** Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12404-12410.
- Macheix J.-J., Fleuriet A. (1990).** Fruit phenolics. *CRC press*.
- Marcotrigiano M., Bernatzky R. (1995).** Arrangement of Cell-Layers in the Shoot Apical Meristems of Periclinal Chimeras Influences Cell Fate. *Plant Journal* 7, 193-202.
- Markakis P., Jurd L. (1974).** Anthocyanins and their stability in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 4, 437-456.
- Martins W.S., Lucas D.C.S., Neves K.d.S., Bertioli D.J. (2009).** WebSat—a web software for microsatellite marker development. *Bioinformation* 3, 282-283.
- Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velasco R. (2006).** Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7692-7702.
- Maul E. (2005).** Die sehr alte Rebsorte Weißer Heunisch und ihre zum Teil berühmt gewordenen Kinder, wie z.B. Chardonnay. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* 56, 129-145.
- Maul E., Eibach R., Zyprian E., Topfer R. (2015).** The prolific grape variety (*Vitis vinifera* L.) 'Heunisch Weiss' (= 'Gouais blanc'): bud mutants, "colored" homonyms and further offspring. *Vitis* 54, 79-86.
- Maul E., Schumann F., Töpfer R. (2011).** Vom Spätburgunder zum Riesling - Ein Beitrag zur Entstehung unserer Rebsortenlandschaft. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* 62, 106-117.

- Mazza G., Kay C.D., Cottrell T., Holub B.J. (2002).** Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7731-7737.
- McClintock B. (1950).** The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **36**, 344-355.
- McGovern P.E. (2003).** Ancient Wine – The Search for the origins of Viniculture. *Princeton University Press*, 406 S.
- McVey M., Adams M., Staeva-Vieira E., Sekelsky J.J. (2004).** Evidence for multiple cycles of strand invasion during repair of double-strand gaps in *Drosophila*. *Genetics* **167**, 699-705.
- Messer P.W., Arndt P.F. (2007).** The majority of recent short DNA insertions in the human genome are tandem duplications. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1190-1197.
- Metzger J. (1827).** Der Rheinische Weinbau. *August Oßwald, Heidelberg*.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2009).** Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in biochemical sciences* **34**, 264-272.
- Mitani N., Azuma A., Fukai E., Hirochika H., Kobayashi S. (2009).** A retrotransposon-inserted *VvmybA1a* allele has been spread among cultivars of *Vitis vinifera* but not North American or East Asian *Vitis* species. *Vitis* **48**, 55-56.
- Mol J., Jenkins G., Schäfer E., Weiss D., Walbot V. (1996).** Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**, 525-557.
- Monaco M.K., Stein J., Naithani S., Wei S., Dharmawardhana P., Kumari S., Amarasinghe V., Youens-Clark K., Thomason J., Preece J. (2014).** Gramene 2013: comparative plant genomics resources. *Nucleic Acids Res* **42**, D1193-D1199.
- Mori K., Goto-Yamamoto N., Kitayama M., Hashizume K. (2007).** Effect of high temperature on anthocyanin composition and transcription of flavonoid hydroxylase genes in 'Pinot noir' grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **82**, 199-206.
- Mu L., He J.J., Pan Q.H., He F., Duan C.Q. (2014).** Tissue-specific Accumulation of Flavonoids in Grape Berries is Related to Transcriptional Expression of *VvF3 ' H* and *VvF3 ' 5 ' H*. *South African Journal of Enology and Viticulture* **35**, 68-81.
- Mullins M., Bouquet A., Williams L. (1992).** Biology of horticultural crops: biology of the grapevine. *Cambridge University*.
- Myles S., Boyko A.R., Owens C.L., Brown P.J., Grassi F., Aradhya M.K., Prins B., Reynolds A., Chia J.M., Ware D., Bustamante C.D., Buckler E.S. (2011).** Genetic structure and domestication history of the grape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3530-3535.
- Nakamura Y., Leppert M., Oconnell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987).** Variable Number of Tandem Repeat (Vntr) Markers for Human-Gene Mapping. *Science* **235**, 1616-1622.
- Nambara E., Marion-Poll A. (2005).** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 165-185.

- Niyogi K.K. (2000).** Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 455-460.
- O'Connor M., Peifer M., Bender W. (1989).** Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**, 1307-1313.
- OIV. (2007).** HPLC-Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine (Resolution Oeno 22/2003 modified by Oeno 12/2007). *Compendium of international methods of analysis-OIV anthocyanins*, OIV-MA-AS315-311.
- Olmo H.P. (1995).** The origin and domestication of the *vinifera* grape. *The origins and ancient history of wine*. Gordon and Breach, Amsterdam, 31-43.
- Oppenheimer D.G., Herman P.L., Sivakumaran S., Esch J., Marks M.D. (1991).** A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* **67**, 483-493.
- Paganga G., Rice-Evans C.A. (1997).** The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS letters* **401**, 78-82.
- Paz-Ares J., Ghosal D., Wienand U., Peterson P., Saedler H. (1987).** The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *The EMBO Journal* **6**, 3553.
- Pazzi F. (2008).** Genetically modified grapevine: state of research, possible risks and future scenario. http://www.fondazioneirittigenetici.org/vitevita/rapporto_en.pdf.
- Pelsy F. (2010).** Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity (Edinb)* **104**, 331-340.
- Pelsy F., Dumas V., Bevilacqua L., Hocquigny S., Merdinoglu D. (2015).** Chromosome replacement and deletion lead to clonal polymorphism of berry color in grapevine. *PLoS Genet* **11**, e1005081.
- Pfannhauser W., Riedl O. (1983).** Anthocyanins: formation, extraction and analysis of natural food dyes [elderberries pigments]. *Nutrition*.
- Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. (2000).** Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15**, 289-302.
- Puchta H. (1998).** Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *The Plant Journal* **13**, 331-339.
- Puchta H. (2005).** The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1-14.
- Ramsay N.A., Glover B.J. (2005).** MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science* **10**, 63-70.
- Regner F., Sefc K., Stadlbauer A., Steinkellner H. (1998).** Genetic markers for the identification of varieties and clones as a guarantee of quality. *International Symposium on the Importance of Varieties and Clones in the production of Quality Wine* **473**, 49-62.
- Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T. (2006).** An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* **6**, 27.

- Ren C., Liu X., Zhang Z., Wang Y., Duan W., Li S., Liang Z. (2016).** CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports* **6**.
- Riaz S., Dangi G.S., Edwards K.J., Meredith C.P. (2004).** A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theoretical and applied genetics* **108**, 864-872.
- Röckel F., Hausmann L., Maul E., Töpfer R. (2017).** Roter Riesling - Eine Farbmutante des Weißen Rieslings. *Deutsches Weinbau Jahrbuch* **68**, 165-170.
- Rombauts S., Déhais P., Van Montagu M., Rouzé P. (1999).** PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res* **27**, 295-296.
- Roth N., Klimesch J., Dukowic-Schulze S., Pacher M., Mannuss A., Puchta H. (2012).** The requirement for recombination factors differs considerably between different pathways of homologous double-strand break repair in somatic plant cells. *Plant J* **72**, 781-790.
- Sandmann G., Römer S., Fraser P.D. (2006).** Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic engineering* **8**, 291-302.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.-K., Motchoulskaia N. (1996).** Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**, 765.
- Schimi S., Fauser F., Puchta H. (2016).** Repair of adjacent single-strand breaks is often accompanied by the formation of tandem sequence duplications in plant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 7266-7271.
- Schmitt A., Höllerl H. (1999).** Die Herkunft des Silvaners. *Rebe und Wein, Weinsberg* **52**, 339-340.
- Schneider E. (2007).** Rotes Weinlaub - eine venenwirksame Arzneidroge. *Deutsche Apotheker Zeitung* **147**, 40-46.
- Seeliger H.R. (2014).** Wein und Weinbau der Abtei Ebrach im Steigerwald und die Frage der Herkunft des Silvaners in Franken. *Schriften zur Weingeschichte*, 7-25.
- Sefc K., Steinkellner H., Glössl J., Kampfer S., Regner F. (1998).** Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theoretical and applied genetics* **97**, 227-231.
- Sekelsky J. (2017).** DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics* **205**, 471-490.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.-J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M. (1992).** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 8794-8797.
- Siebert R., Puchta H. (2002).** Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *The Plant Cell* **14**, 1121-1131.
- Solano R., Nieto C., Avila J., Canas L., Diaz I., Pazares J. (1995).** Dual DNA-Binding Specificity of a Petal Epidermis-Specific MYB Transcription Factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *Embo Journal* **14**, 1773-1784.

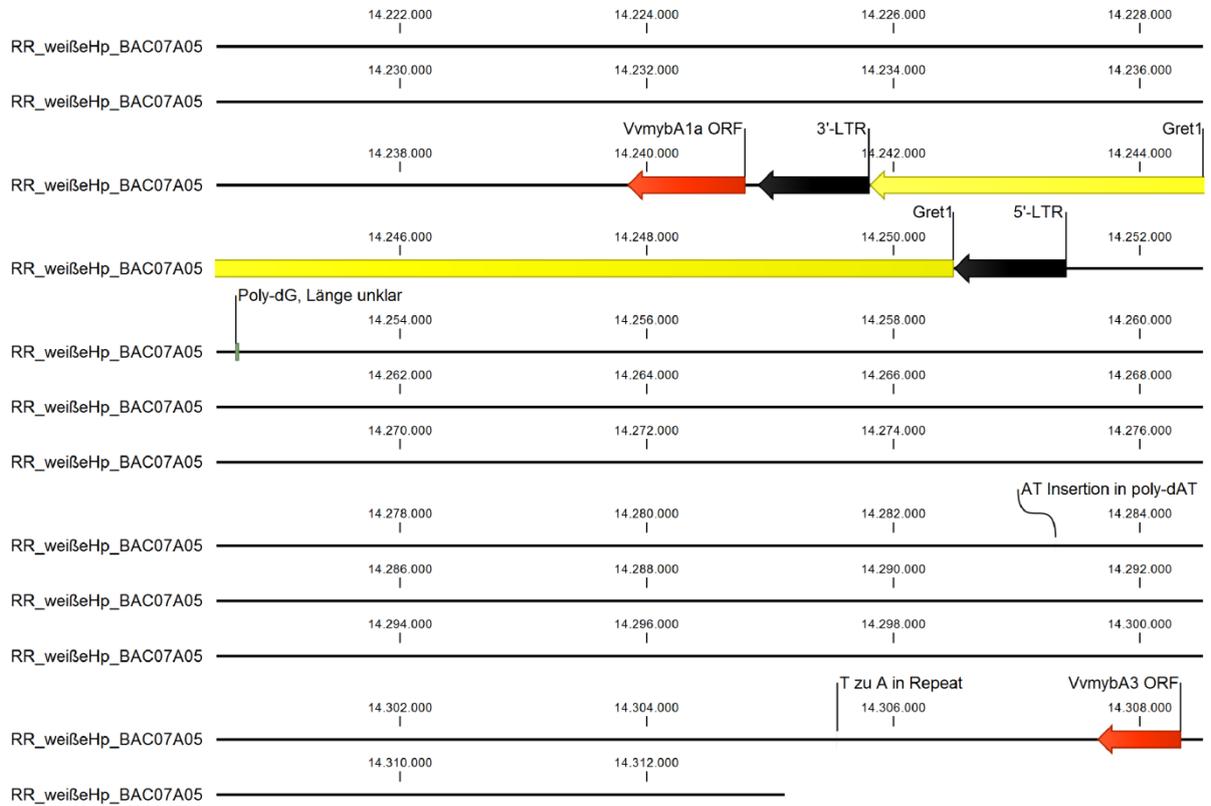
- Staab J. (1991).** Der Riesling – Geschichte einer Rebsorte. *Schriften zur Weingeschichte* **99**, 23-36.
- Stafford H.A. (1994).** Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science* **101**, 91-98.
- Steinert J., Schiml S., Puchta H. (2016).** Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. *Plant Cell Rep* **35**, 1429-1438.
- Stoltz J.-L. (1852).** Ampélographie Rhénane. Description des cépages les plus estimés. *Dusacq, Paris*.
- Stracke R., Werber M., Weisshaar B. (2001).** The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 447-456.
- Sung P., Klein H. (2006).** Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 739-750.
- Suzuki K., Tasaki K., Yamagishi M. (2015).** Two distinct spontaneous mutations involved in white flower development in *Lilium speciosum*. *Molecular Breeding* **35**.
- Sykorova E., Fajkus J., Meznikova M., Lim K.Y., Nepelchova K., Blattner F.R., Chase M.W., Leitch A.R. (2006).** Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. *American Journal of Botany* **93**, 814-823.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R.J., Stahl F.W. (1983).** The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008).** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **54**, 733-749.
- This P., Lacombe T., Cadle-Davidson M., Owens C.L. (2007).** Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theor Appl Genet* **114**, 723-730.
- This P., Lacombe T., Thomas M.R. (2006).** Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics* **22**, 511-519.
- Thoma K. (2015).** Dürfen wir vorstellen? Der Rote Müller-Thurgau. *Der Deutsche Weinbau, Neustadt*, 34-35.
- Thomas E.E. (2005).** Short, local duplications in eukaryotic genomes. *Current opinion in genetics & development* **15**, 640-644.
- Tipa-Umphon A., Roustan J.P., Chervin C. (2007).** The stimulation by ethylene of the UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) in grape tissues is independent from the MybA transcription factors. *Vitis* **46**, 210-211.
- Töpfer R., Hausmann L., Harst M., Maul E., Zyprian E., Eibach R. (2011).** New horizons for grapevine breeding. *Methods in temperate fruit breeding. fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* **5**, 79-100.
- Trummer F.X. (1841).** Systematische Classification und Beschreibung der im Herzogthume Steiermark vorkommenden Rebensorten. *K.K. Landwirtschafts-Gesellschaft, Steiermark* **1**.
- Udolph J. (2016).** Woher hat der Riesling seinen Namen? *Die Winzer-Zeitschrift* **7**, 27.

- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A. (2007).** Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**, W71-W74.
- Valamoti S.M. (2015).** Harvesting the 'wild'? Exploring the context of fruit and nut exploitation at Neolithic Dikili Tash, with special reference to wine. *Vegetation history and archaeobotany* **24**, 35-46.
- Vaze M.B., Pellicoli A., Lee S.E., Ira G., Liberi G., Arbel-Eden A., Foiani M., Haber J.E. (2002).** Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Molecular cell* **10**, 373-385.
- Venables W.N., Smith D.M. (2005).** The R development core team. *An Introduction to R. Notes on R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics*.
- Vergnaud G., Denoeud F. (2000).** Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research* **10**, 899-907.
- Vezzulli S., Leonardelli L., Malossini U., Stefanini M., Velasco R., Moser C. (2012).** Pinot blanc and Pinot gris arose as independent somatic mutations of Pinot noir. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6359-6369.
- Viala P., Vermorel V. (1905).** Ampélographie–Traité Général de Viticulture, Vol. 1–7. Paris: Ed. Masson et Cie.
- Voorrips R. (2002).** MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* **93**, 77-78.
- Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A., Thomas M.R., Robinson S.P. (2007).** White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J* **49**, 772-785.
- Walker A.R., Lee E., Robinson S.P. (2006).** Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus. *Plant Molecular Biology* **62**, 623-635.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. (1997).** Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 304-309.
- Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. (2003).** Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography– mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1839-1844.
- Wessler S.R., Bureau T.E., White S.E. (1995).** LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Current opinion in genetics & development* **5**, 814-821.
- Williams C.E., Grotewold E. (1997).** Differences between plant and animal Myb domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric Myb domains have novel DNA binding specificities. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 563-571.
- Winkel-Shirley B. (2001).** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**, 485-493.
- Wong D.C., Schlechter R., Vannozzi A., Holl J., Hmam I., Bogs J., Torielli G.B., Castellarin S.D., Matus J.T. (2016).** A systems-oriented analysis of the grapevine R2R3-MYB transcription factor family uncovers new insights into the regulation of stilbene accumulation. *DNA Res.*

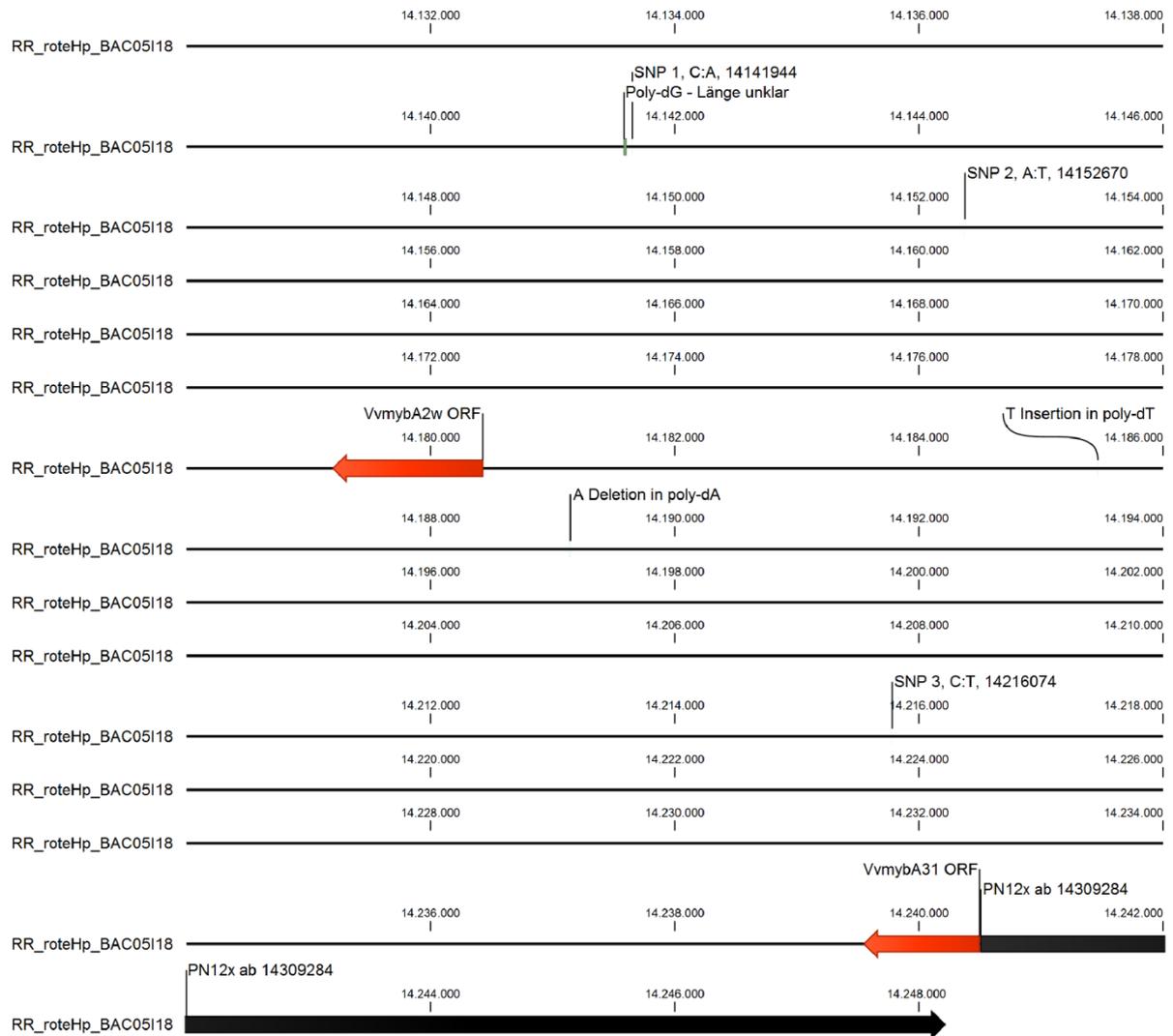
- Woodhouse M.R., Pedersen B., Freeling M. (2010).** Transposed genes in *Arabidopsis* are often associated with flanking repeats. *PLoS Genet* **6**, e1000949.
- Würdig G., Woller R. (1989).** Chemie des Weines. Handbuch der Lebensmitteltechnologie. *Ulmer, Stuttgart*.
- Wyman A.R., White R. (1980).** A Highly Polymorphic Locus in Human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **77**, 6754-6758.
- Xiao Y.-L., Li X., Peterson T. (2000).** Ac insertion site affects the frequency of transposon-induced homologous recombination at the maize p1 locus. *Genetics* **156**, 2007-2017.
- Yang Y., Labate J.A., Liang Z., Cousins P., Prins B., Preece J.E., Aradhya M., Zhong G.Y. (2014).** Multiple loss-of-function 5-O-glucosyltransferase alleles revealed in *Vitis vinifera*, but not in other *Vitis* species. *Theor Appl Genet* **127**, 2433-2451.
- Zhao Q., Duan C.Q., Wang J. (2010).** Anthocyanins Profile of Grape Berries of *Vitis amurensis*, Its Hybrids and Their Wines. *Int J Mol Sci* **11**, 2212-2228.

Anhang

Anhang 1: Schematische Darstellung der weißen Haplophase von `Riesling Rot` anhand einer BAC-Sequenzierung. Alle Positionen sind relativ zu Chromosom 2 der Referenzsequenz PN40024 (12x) angegeben.



Anhang 2: Schematische Darstellung der roten Haplophase von `Riesling Rot` anhand einer BAC-Sequenzierung. Alle Positionen sind relativ zu Chromosom 2 der Referenzsequenz PN40024 (12x) angegeben.



Anhang 3: Alignment der *mybA1*-Allelvarianten *MybA1b*, *MybA31* und *MybA313* im Vergleich zu *MybA1a* aus der Referenzsequenz PN40024 (12x). Unterschiede sind dunkelrot hinterlegt. SR = `Silvaner Rot`; RR = `Riesling Rot`; SB = `Silvaner Blau`; ER = `Elbling Rot`.

MybA1a PN12x	Promotor	20	40	60	74	
	ACACACACCC TTTGTCCATG AACTCCAGCG CATTGGAAAG CCAGTAATG CACCATAAGA AACGTGTCGA ATAAA					
MybA1b SR	Promotor				74	
	ACACACACCC TTTGTCCATG AACTCCAGCG CATTGGAAAG CCAGTAATG CACCATAAGA AACGTGTCGA ATAAA					
MybA31 RR/SB	Promotor				75	
	ACACACACCC TTTGTCCATG AACTCCAGCG CATTGGAAAG CCAGTAATG CACCATAAGA AACGTGTCGA ATAAA					
MybA313 ER	Promotor				75	
	ACACACACCC TTTGTCCATG AACTCCAGCG CATTGGAAAG CCAGTAATG CACCATAAGA AACGTGTCGA ATAAA					
MybA1a PN12x	Promotor	80	100	120	140	149
	CCAATTAGGG GTCTGGTGTG CGAGTCATGA GATAGAACAG GTTCGAGGTT GTTATATATC AATCAATAAT TAGAG					
MybA1b SR	Promotor				149	
	CCAATTAGGG GTCTGGTGTG CGAGTCATGA GATAGAACAG GTTCGAGGTT GTTATATATC AATCAATAAT TAGAG					
MybA31 RR/SB	Promotor				150	
	CCAATTAGGG GTCTGGTGTG CGAGTCATGA GATAGAACAG GTTCGAGGTT GTTATATATC AATCAATAAT TAGAG					
MybA313 ER	Promotor				150	
	CCAATTAGGG GTCTGGTGTG CGAGTCATGA GATAGAACAG GTTCGAGGTT GTTATATATC AATCAATAAT TAGAG					
MybA1a PN12x	Promotor	160	180	200	220	224
	AAGGAGCCGG TCTCTTGTGT TGAGTTGACT CATGGAGAG CTTAGGAGTT AGAAAGGGTG CATGGAACCA AGAAG	Exon1				
MybA1b SR	Promotor				224	
	AAGGAGCCGG TCTCTTGTGT TGAGTTGACT CATGGAGAG CTTAGGAGTT AGAAAGGGTG CATGGAACCA AGAAG	Exon1				
MybA31 RR/SB	Promotor				225	
	AAGGAGCCGG TCTCTTGTGT TGAGTTGACT CATGGAGAG CTTAGGAGTT AGAAAGGGTG CATGGAACCA AGAAG	Exon1				
MybA313 ER	Promotor				225	
	AAGGAGCCGG TCTCTTGTGT TGAGTTGACT CATGGAGAG CTTAGGAGTT AGAAAGGGTG CATGGAACCA AGAAG	Exon1				
MybA1a PN12x	Exon1	240	260	280	300	299
	AGGATGTTCT CCTGAGGAAA TGCATTGAGA AATATGGAGA AGGAAAGTGG CATCTGGTTC CCCTCCGAGC AGGTA	Intron1				
MybA1b SR	Exon1				299	
	AGGATGTTCT CCTGAGGAAA TGCATTGAGA AATATGGAGA AGGAAAGTGG CATCTGGTTC CCCTCCGAGC AGGTA	Intron1				
MybA31 RR/SB	Exon1				300	
	AGGATGTTCT CCTGAGGAAA TGCATTGAGA AATATGGAGA AGGAAAGTGG CATCTGGTTC CCCTCCGAGC AGGTA	Intron1				
MybA313 ER	Exon1				300	
	AGGATGTTCT CCTGAGGAAA TGCATTGAGA AATATGGAGA AGGAAAGTGG CATCTGGTTC CCCTCCGAGC AGGTA	Intron1				
MybA1a PN12x	Intron1	320	340	360	374	
	ACATGAAAGA GAAAGGGATC AGTATTATT TGTGTTTTT TACTTCTGTT TTGCTTAAAG AGTTTCATT TCTTG					
MybA1b SR	Intron1				374	
	ACATGAAAGA GAAAGGGATC AGTATTATT TGTGTTTTT TACTTCTGTT TTGCTTAAAG AGTTTCATT TCTTG					
MybA31 RR/SB	Intron1				375	
	ACATGAAAGA GAAAGGGATC AGTATTATT TGTGTTTTT TACTTCTGTT TTGCTTAAAG AGTTTCATT TCTTG					
MybA313 ER	Intron1				375	
	ACATGAAAGA GAAAGGGATC AGTATTATT TGTGTTTTT TACTTCTGTT TTGCTTAAAG AGTTTCATT TCTTG					
MybA1a PN12x	Intron1	380	400	420	440	449
	AGTTTGCAAG GTTGAATAGA TGCCGAAAAA GCTGCAGGTT GAGATGGCTC AATTATTTGA AGCCGGATAT CAAGA	Exon2				
MybA1b SR	Intron1				449	
	AGTTTGCAAG GTTGAATAGA TGCCGAAAAA GCTGCAGGTT GAGATGGCTC AATTATTTGA AGCCGGATAT CAAGA	Exon2				
MybA31 RR/SB	Intron1				450	
	AGTTTGCAAG GTTGAATAGA TGCCGAAAAA GCTGCAGGTT GAGATGGCTC AATTATTTGA AGCCGGATAT CAAGA	Exon2				
MybA313 ER	Intron1				450	
	AGTTTGCAAG GTTGAATAGA TGCCGAAAAA GCTGCAGGTT GAGATGGCTC AATTATTTGA AGCCGGATAT CAAGA	Exon2				
MybA1a PN12x	Exon2	460	480	500	520	524
	GAGGAGAGTT TGCATTAGAC GAGGTTGATC TCATGATTAG GCTTCACAAAT TTGTTGGGGA ACAGCCAAGT CTATA	Intron2				
MybA1b SR	Exon2				524	
	GAGGAGAGTT TGCATTAGAC GAGGTTGATC TCATGATTAG GCTTCACAAAT TTGTTGGGGA ACAGCCAAGT CTATA	Intron2				
MybA31 RR/SB	Exon2				525	
	GAGGAGAGTT TGCATTAGAC GAGGTTGATC TCATGATTAG GCTTCACAAAT TTGTTGGGGA ACAGCCAAGT CTATA	Intron2				
MybA313 ER	Exon2				525	
	GAGGAGAGTT TGCATTAGAC GAGGTTGATC TCATGATTAG GCTTCACAAAT TTGTTGGGGA ACAGCCAAGT CTATA	Intron2				
MybA1a PN12x	Intron2	540	560	580	600	599
	ATAACTCAAG TACTAGCTTG ATAATGATAT TATATTAGTT CTGAAGCTGT TCAGAACTTA CAAAAGAGCT GTTCA					
MybA1b SR	Intron2				599	
	ATAACTCAAG TACTAGCTTG ATAATGATAT TATATTAGTT CTGAAGCTGT TCAGAACTTA CAAAAGAGCT GTTCA					
MybA31 RR/SB	Intron2				600	
	ATAACTCAAG TACTAGCTTG ATAATGATAT TATATTAGTT CTGAAGCTGT TCAGAACTTA CAAAAGAGCT GTTCA					
MybA313 ER	Intron2				600	
	ATAACTCAAG TACTAGCTTG ATAATGATAT TATATTAGTT CTGAAGCTGT TCAGAACTTA CAAAAGAGCT GTTCA					
MybA1a PN12x	Intron2	620	640	660	674	
	GTTGATACTT TGTCTGATGT TGTGCGTGTA TATGGTCC TTGATTGCGG GTAGGCTTCC AGGGAGGACT GCTAA	Exon3				
MybA1b SR	Intron2				674	
	GTTGATACTT TGTCTGATGT TGTGCGTGTA TATGGTCC TTGATTGCGG GTAGGCTTCC AGGGAGGACT GCTAA	Exon3				
MybA31 RR/SB	Intron2				675	
	GTTGATACTT TGTCTGATGT TGTGCGTGTA TATGGTCC TTGATTGCGG GTAGGCTTCC AGGGAGGACT GCTAA	Exon3				
MybA313 ER	Intron2				675	
	GTTGATACTT TGTCTGATGT TGTGCGTGTA TATGGTCC TTGATTGCGG GTAGGCTTCC AGGGAGGACT GCTAA	Exon3				
MybA1a PN12x	Exon3	680	700	720	740	749
	TGATGTCAAG AACTATTGGC ATAGTCACCA CTTCAAAAAG GAGGTTTCAGT TCCAGGAAGA AGGGAGAGAT AAACC					
MybA1b SR	Exon3				749	
	TGATGTCAAG AACTATTGGC ATAGTCACCA CTTCAAAAAG GAGGTTTCAGT TCCAGGAAGA AGGGAGAGAT AAACC					
MybA31 RR/SB	Exon3				750	
	TGATGTCAAG AACTATTGGC ATAGTCACCA CTTCAAAAAG GAGGTTTCAGT TCCAGGAAGA AGGGAGAGAT AAACC					
MybA313 ER	Exon3				750	
	TGATGTCAAG AACTATTGGC ATAGTCACCA CTTCAAAAAG GAGGTTTCAGT TCCAGGAAGA AGGGAGAGAT AAACC					

	Exon3	760	780	800	820	
MybA1a PN12x	CCAAACACAT TCTAAAACCA AAGCTATAAA GCCTCACCT CACAAGTTCT CCAAAGCCTT GCCAAGGTTT GAACT					824
MybA1b SR	CCAAACACAT TCTAAAACCA AAGCTATAAA GCCTCACCT CACAAGTTCT CCAAAGCCTT GCCAAGGTTT GAACT					824
MybA31 RR/SB	CCAAACACAT TCTAAAACCA AAGCTATAAA GCCTCACCT CACAAGTTCT CCAAAGCCTT GCCAAGGTTT GAACT					825
MybA313 ER	CCAAACACAT TCTAAAACCA AAGCTATAAA GCCTCACCT CACAAGTTCT CCAAAGCCTT GCCAAGGTTT GAACT					825
	Exon3	840	860	880	900	
MybA1a PN12x	AAAAACTACA GCTGTGGATA CTTTTGACAC ACAAGTCAGT ACTTCCAGGA AGCCATCATC CACTTCACCA CAACC					899
MybA1b SR	AAAAACTACA GCTGTGGATA CTTTTGACAC ACAAGTCAGT ACTTCCAGGA AGCCATCATC CACTTCACCA CAACC					899
MybA31 RR/SB	AAAAACTACA GCTGTGGATA CTTTTGACAC ACAAGTCAGT ACTTCCAGGA AGCCATCATC CACTTCACCA CAACC					900
MybA313 ER	AAAAACTACA GCTGTGGATA CTTTTGACAC ACAAGTCAGT ACTTCCAGGA AGCCATCATC CACTTCACCA CAACC					900
	Exon3	920	940	960		
MybA1a PN12x	GAATGATGAC ATCATATGGT GGGAAAGCCT GTTAGCTGAG CATGCTCAA TGGATCAAGA AACTGACTTT TCGGC					974
MybA1b SR	GAATGATGAC ATCATATGGT GGGAAAGCCT GTTAGCTGAG CATGCTCAA TGGATCAAGA AACTGACTTT TCGGC					974
MybA31 RR/SB	GAATGATGAC ATCATATGGT GGGAAAGCCT GTTAGCTGAG CATGCTCAA TGGATCAAGA AACTGACTTT TCGGC					975
MybA313 ER	GAATGATGAC ATCATATGGT GGGAAAGCCT GTTAGCTGAG CATGCTCAA TGGATCAAGA AACTGACTTT TCGGC					975
	Exon3	980	1,000	1,020	1,040	
MybA1a PN12x	TTCTGGAGAG ATGCTTATCG CAAGCCTCAG GACAGAAGAA ACTGCAACAC AGAAAAAGGG ACCCATGGAT GGTAT					1049
MybA1b SR	TTCTGGAGAG ATGCTTATCG CAAGCCTCAG GACAGAAGAA ACTGCAACAC AGAAAAAGGG ACCCATGGAT GGTAT					1049
MybA31 RR/SB	TTCTGGAGAG ATGCTTATCG CAAGCCTCAG GACAGAAGAA ACTGCAACAC AGAAAAAGGG ACCCATGGAT GGTAT					1050
MybA313 ER	TTCTGGAGAG ATGCTTATCG CAAGCCTCAG GACAGAAGAA ACTGCAACAC AGAAAAAGGG ACCCATGGAT GGTAT					1050
	Exon3	1,060	1,080	1,100	1,120	
MybA1a PN12x	GATTGAACAA ATCCAGGGAG GTGAGGGTGA TTTCCATTT GATGTGGCT TCTGGGATAC ACCCAACACA CAAGT					1124
MybA1b SR	GATTGAACAA ATCCAGGGAG GTGAGGGTGA TTTCCATTT GATGTGGCT TCTGGGATAC ACCCAACACA CAAGT					1124
MybA31 RR/SB	GATTGAACAA ATCCAGGGAG GTGAGGGTGA TTTCCATTT GATGTGGCT TCTGGGATAC ACCCAACACA CAAGT					1125
MybA313 ER	GATTGAACAA ATCCAGGGAG GTGAGGGTGA TTTCCATTT GATGTGGCT TCTGGGATAC ACCCAACACA CAAGT					1125
	Exon3	1,140	1,160	1,180	1,200	
MybA1a PN12x	AAATCACTTG ATCTGATTTA GACCATTTC AATCTTAATGT TTAAGTTCAA AAGTTGTTCT TGCATTATG CTCTA	Terminator				1199
MybA1b SR	AAATCACTTG ATCTGATTTA GACCATTTC AATCTTAATGT TTAAGTTCAA AAGTTGTTCT TGCATTATG CTCTA	Terminator				1199
MybA31 RR/SB	AAATCACTTG ATCTGATTTA GACCATTTC AATCTTAATGT TTAAGTTCAA AAGTTGTTCT TGCATTATG CTCTA	Terminator				1200
MybA313 ER	AAATCACTTG ATCTGATTTA GACCATTTC AATCTTAATGT TTAAGTTCAA AAGTTGTTCT TGCATTATG CA CTCTA	Terminator				1200
	Terminator	1,220	1,240	1,260		
MybA1a PN12x	CTCCCTAATC ATTTTATGTT CCAAAGTTGT TAATCTTAGA AATAAAAAACA AAAAT-AATA AATATATCAA TATGT					1273
MybA1b SR	CTCCCTAATC ATTTTATGTT CCAAAGTTGT TAATCTTAGA AATAAAAAACA AAAAT-AATA AATATATCAA TATGT					1273
MybA31 RR/SB	CTCCCTAATC ATTTTATGTT CCAAAGTTGT TAATCTTAGA AATAAAAAACA AAAAT-AATA AATATATCAA TATGT					1274
MybA313 ER	CTCTCTAATC ATTTTATGTT CCAAAGTTGT TAATCTTAGA AATAAAAAACA AAAAT-AATA AATATATCAA TATGT					1275
	Terminator	1,280	1,300	1,320	1,340	
MybA1a PN12x	ATAATGGTGG ATAGGGATGT GAGCAGTGGG TG----- CAAA CTCAA					1314
MybA1b SR	ATAATGGTGG ATAGGGATGT GAGCAGTGGG TG----- CAAA CTCAA					1314
MybA31 RR/SB	ATAATGGTGG ATAGGGATGT GAGCAGTGGG TG----- CAAA CTCAA					1315
MybA313 ER	AATAATGGTGG ATATGGAGGT AACAGTGGG TG TAGACAAG AGTTACAAAT GATTCATGTC GACATC CAAA CTCAA					1350
	Terminator	1,360	1,380	1,400	1,420	
MybA1a PN12x	GCATTGAATG AATGGTTAAG ATTAATGAAC CCAATCATT GAAGTGACAA AAGAAAGACA TTTTAAAAGA TTCTT					1389
MybA1b SR	GCATTGAATG AATGGTTAAG ATTAATGAAC CCAATCATT GAAGTGACAA AAGAAAGACA TTTTAAAAGA TTCTT					1389
MybA31 RR/SB	GCATTGAATG AATGGTTAAG ATTAATGAAC CCAATCATT GAAGTGACAA AAGAAAGACA TTTTAAAAGA TTCTT					1390
MybA313 ER	GCATTGAATG AATGGTTAAG ATTAATGAAC CCAATCATT GAAGTGACAA AAGAAAGACA TTTTAAAAGA TA TTGTT					1424
	Terminator	1,440	1,460	1,480	1,500	
MybA1a PN12x	AACAATATGA ----- AAAAGTT GTTTCAT --- ----- ATTT CTATCGGTTT CCAACCATTA ATTAG					1442
MybA1b SR	AACAATATGA ----- AAAAGTT GTTTCAT --- ----- ATTT CTATCGGTTT CCAACCATTA ATTAG					1442
MybA31 RR/SB	AACAATATGA ----- AAAAGTT GTTTCAT --- ----- ATTT CTATCGGTTT CCAACCATTA ATTAG					1443
MybA313 ER	AACAATAT ITT GAATCCCTA ACTAAAATCT ATGACATGAA AAAATTATTT CTATCGGTTT CCAACCTTTA ATTTT					1496
	Terminator	1,520	1,540	1,560		
MybA1a PN12x	ACGGATGGAC CATTGAAATA TCTCATGCAT ATTGAATTAA TAAAACAAGA AATTTCCACA TAG					1506
MybA1b SR	ACGGATGGAC CATTGAAATA TCTCATGCAT ATTGAATTAA TAAAACAAGA AATTTCCACA TAG					1506
MybA31 RR/SB	ACGGATGGAC CATTGAAATA TCTCATGCAT ATTGAATTAA TAAAACAAGA AATTTCCACA TAG					1507
MybA313 ER	----- AATCC TCTAATGGTT AATGAAT -----					1520

Anhang 4: Alignment der *mybA2*-Allelvarianten *MybA232a* und *MybA232b* im Vergleich zu *MybA1w* aus der Referenzsequenz PN40024 (12x) und dem *MybA2r*-ORF (Promotor nicht verfügbar) aus 'Cabernet Sauvignon' (Walker *et al.*, 2006). Unterschiede sind dunkelrot hinterlegt. RÄR = 'Räuschling Rot'; KL = 'Kernling'.

MybA2r ORF Cab. Sauv.		20	40	60	-
Promotor	TAGAAAAAGT TCTAAAATGT ATTTTTATCG ACGTTACTGG TCAGAAACAA AGTCCTCCGC GAGCCAGAGG CATAT				75
MybA2w PN12x	TAGAAAAAGT TCTAAAATGT ATTTTTATCG ACGTTACTGG TCAGAAACAA AGTCCTCCGC GAGCCAGAGG CATAT				75
MybA232a RaR	TAGAAAAAGT TCTAAAATGT ATTTTTATCG ACGTTACTGG TCAGAAACAA AGTCCTCCGC GAGCCAGAGG CATAT				75
MybA232b KL	TAGAAAAAGT TCTAAAATGT ATTTTTATCG ACGTTACTGG TCAGAAACAA AGTCCTCCGC GAGCCAGAGG CATAT				75
MybA2r ORF Cab. Sauv.		80	100	120	140
Promotor	CCTAATGATT GTACCTTTCT TCGCTGACAA TTCCCATGAA TTAGCTGCTG CCACTGCATA GCGGCCATAA TATAA				150
MybA2w PN12x	CCTAATGATT GTACCTTTCT TCGCTGACAA TTCCCATGAA TTAGCTGCTG CCACTGCATA GCGGCCATAA TATAA				150
MybA232a RaR	CCTAATGATT GTACCTTTCT TCGCTGACAA TTCCCATGAA TTAGCTGCTG CCACTGCATA GCGGCCATAA TATAA				150
MybA232b KL	CCTAATGATT GTACCTTTCT TCGCTGACAA TTCCCATGAA TTAGCTGCTG CCACTGCATA GCGGCCATAA TATAA				150
MybA2r ORF Cab. Sauv.		180	200	220	-
Promotor	TGGTAGAGGA CCCATGGAGC TTCCCTTTTC AGTGAACATG GGTTAGTCGA CAAAAGAAAA TGTTAAAGTT GAAAG				225
MybA2w PN12x	TGGTAGAGGA CCCATGGAGC TTCCCTTTTC AGTGAACATG GGTTAGTCGA CAAAAGAAAA TGTTAAAGTT GAAAG				225
MybA232a RaR	TGGTAGAGGA CCCATGGAGC TTCCCTTTTC AGTGAACATG GGTTAGTCGA CAAAAGAAAA TGTTAAAGTT GAAAG				225
MybA232b KL	TGGTAGAGGA CCCATGGAGC TTCCCTTTTC AGTGAACATG GGTTAGTCGA CAAAAGAAAA TGTTAAAGTT GAAAG				225
MybA2r ORF Cab. Sauv.		240	280	300	-
Promotor	AGGAGCGGTG GCCCTCAAAG GTTCCCATCA CTGGTTGCT TTTTGTCAAG GAAACAGTGG TATCAGAATC CAAAT				300
MybA2w PN12x	AGGAGCGGTG GCCCTCAAAG GTTCCCATCA CTGGTTGCT TTTTGTCAAG GAAACAGTGG TATCAGAATC CAAAT				300
MybA232a RaR	AGGAGCGGTG GCCCTCAAAG GTTCCCATCA CTGGTTGCT TTTTGTCAAG GAAACAGTGG TATCAGAATC CAAAT				300
MybA232b KL	AGGAGCGGTG GCCCTCAAAG GTTCCCATCA CTGGTTGCT TTTTGTCAAG GAAACAGTGG TATCAGAATC CAAAT				300
MybA2r ORF Cab. Sauv.		320	340	360	-
Promotor	CTTCTACGTA ATGTCCCATT CATCCTACCA ATGTCCAAT GAATTCCTCT GGACATTAAA ATATGGTAGC ACGTG				375
MybA2w PN12x	CTTCTACGTA ATGTCCCATT CATCCTACCA ATGTCCAAT GAATTCCTCT GGACATTAAA ATATGGTAGC ACGTG				375
MybA232a RaR	CTTCTACGTA ATGTCCCATT CATCCTACCA ATGTCCAAT GAATTCCTCT GGACATTAAA ATATGGTAGC ACGTG				375
MybA232b KL	CTTCTACGTA ATGTCCCATT CATCCTACCA ATGTCCAAT GAATTCCTCT GGACATTAAA ATATGGTAGC ACGTG				375
MybA2r ORF Cab. Sauv.		380	400	420	440
Promotor	GTTGCTCTCG GGATCACACC AGTTTATACA TTTGCACCAC AAAATAGAGA TTGTTTATAA AGGATACTAG TCAGC				450
MybA2w PN12x	GTTGCTCTCG GGATCACACC AGTTTATACA TTTGCACCAC AAAATAGAGA TTGTTTATAA AGGATACTAG TCAGC				450
MybA232a RaR	GTTGCTCTCG GGATCACACC AGTTTATACA TTTGCACCAC AAAATAGAGA TTGTTTATAA AGGATACTAG TCAGC				450
MybA232b KL	GTTGCTCTCG GGATCACACC AGTTTATACA TTTGCACCAC AAAATAGAGA TTGTTTATAA AGGATACTAG TCAGC				450
MybA2r ORF Cab. Sauv.		480	500	520	-
Promotor	AATTAATTC TAAATTT - - C GCTGTACATT TATAGTAAGT TGATACATAA TGGGTAATA TCTCTTATGA CACAC				523
MybA2w PN12x	AATTAATTC TAAATTT - - C GCTGTACATT TATAGTAAGT TGATACATAA TGGGTAATA TCTCTTATGA CACAC				523
MybA232a RaR	AATTAATTC TAAATTT - - C GCTGTACATT TATAGTAAGT TGATACATAA TGGGTAATA TCTCTTATGA CACAC				523
MybA232b KL	AATTAATTC TAAATTT - - C GCTGTACATT TATAGTAAGT TGATACATAA TGGGTAATA TCTCTTATGA CACAC				523
MybA2r ORF Cab. Sauv.		540	560	580	600
Promotor	ACCCTTTGTC CATGATGTCC ATCGCATTTC GAAGCCAGGT AATGCACCAT AAGAAACGTG TCGAATCAAC CAATT				598
MybA2w PN12x	ACCCTTTGTC CATGATGTCC ATCGCATTTC GAAGCCAGGT AATGCACCAT AAGAAACGTG TCGAATCAAC CAATT				598
MybA232a RaR	ACCCTTTGTC CATGATGTCC ATCGCATTTC GAAGCCAGGT AATGCACCAT AAGAAACGTG TCGAATCAAC CAATT				598
MybA232b KL	ACCCTTTGTC CATGATGTCC ATCGCATTTC GAAGCCAGGT AATGCACCAT AAGAAACGTG TCGAATCAAC CAATT				600
MybA2r ORF Cab. Sauv.		620	640	660	-
Promotor	AGGGTCTGG TGTCCGAGTC ATGAGATAGA ACAGGTTCTG GGTGTTTATA TATCAATCAA TAATTAGAGA AGGAG				673
MybA2w PN12x	AGGGTCTGG TGTCCGAGTC ATGAGATAGA ACAGGTTCTG GGTGTTTATA TATCAATCAA TAATTAGAGA AGGAG				673
MybA232a RaR	AGGGTCTGG TGTCCGAGTC ATGAGATAGA ACAGGTTCTG GGTGTTTATA TATCAATCAA TAATTAGAGA AGGAG				673
MybA232b KL	AGGGTCTGG TGTCCGAGTC ATGAGATAGA ACAGGTTCTG GGTGTTTATA TATCAATCAA TAATTAGAGA AGGAG				675
MybA2r ORF Cab. Sauv.		680	700	720	740
Promotor	CCGGTCTCTT GTGTTGAGTT GACTCGATG ATGG AGAGCTTAGG AGTTAGAAAAG GGTGCATGGA CCCAAGAAGA GGATG	Exon1			748
MybA2w PN12x	CCGGTCTCTT GTGTTGAGTT GACTCGATG ATGG AGAGCTTAGG AGTTAGAAAAG GGTGCATGGA CCCAAGAAGA GGATG	Exon1			748
MybA232a RaR	CCGGTCTCTT GTGTTGAGTT GACTCGATG ATGG AGAGCTTAGG AGTTAGAAAAG GGTGCATGGA CCCAAGAAGA GGATG	Exon1			748
MybA232b KL	CCGGTCTCTT GTGTTGAGTT GACTCGATG ATGG AGAGCTTAGG AGTTAGAAAAG GGTGCATGGA CCCAAGAAGA GGATG	Exon1			750

MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon1	780	790	800	820	Intron1	124
	Exon 1					Intron 1	
MybA2w PN12x	Exon 1					Intron 1	823
MybA232a RaR	Exon1					Intron1	823
MybA232b KL	Exon1					Intron1	825
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Intron1	840	860	880	900		198
	Intron 1						
MybA2w PN12x	Intron1						898
MybA232a RaR	Intron1						897
MybA232b KL	Intron1						899
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Intron1 Exon2	920	940	960			273
	Intron 1 Exon 2						
MybA2w PN12x	Intron1 Exon2						973
MybA232a RaR	Intron1 Exon2						972
MybA232b KL	Intron1 Exon2						974
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon2	980	1,000	1,020	1,040	Intron2	348
	Exon 2					Intron 2	
MybA2w PN12x	Exon2					Intron 2	1048
MybA232a RaR	Exon2					Intron2	1047
MybA232b KL	Exon2					Intron2	1049
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Intron2	1,060	1,080	1,100	1,120		423
	Intron 2						
MybA2w PN12x	Intron2						1123
MybA232a RaR	Intron2						1122
MybA232b KL	Intron2						1124
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Intron2	1,140	1,160	1,180	1,200		498
	Intron 2						
MybA2w PN12x	Intron2						1198
MybA232a RaR	Intron2						1197
MybA232b KL	Intron2						1199
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3	1,220	1,240	1,260			573
	Exon 3						
MybA2w PN12x	Exon3						1273
MybA232a RaR	Exon3						1272
MybA232b KL	Exon3						1274
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3	1,280	1,300	1,320	1,340		648
	Exon 3						
MybA2w PN12x	Exon3						1348
MybA232a RaR	Exon3						1347
MybA232b KL	Exon3						1349
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3	1,360	1,380	1,400	1,420		723
	Exon 3						
MybA2w PN12x	Exon3						1423
MybA232a RaR	Exon3						1422
MybA232b KL	Exon3						1424
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3	1,440	1,460	1,480	1,500		798
	Exon 3						
MybA2w PN12x	Exon3						1498
MybA232a RaR	Exon3						1497
MybA232b KL	Exon3						1499
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3	1,520	1,540	1,560			873
	Exon 3						
MybA2w PN12x	Exon3						1573
MybA232a RaR	Exon3						1572
MybA232b KL	Exon3						1574

MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3 CTATAAA ^{1,580} CC TCACCCTCAC AAGTTCCTCCA AAGCCTTGCC AAGGTTTGAA CTAAAAACTA CAGCTGTGGA TACTT 948
MybA2w PN12x	Exon 3 CTATAAAACC TCACCCTCAC AAGTTCCTCCA AAGCCTTGCC AAGGTTTGAA CTAAAAACTA CAGCTGTGGA TACTT 1648
MybA232a RaR	Exon3 CTATAAAACC TCACCCTCAC AAGTTCCTCCA AAGCCTTGCC AAGGTTTGAA CTAAAAACTA CAGCTGTGGA TACTT 1647
MybA232b KL	Exon3 CTATAAAACC TCACCCTCAC AAGTTCCTCCA AAGCCTTGCC AAGGTTTGAA CTAAAAACTA CAGCTGTGGA TACTT 1649
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3 TTGACACACA AGTAAGTACT TCCAGTAAGC ^{1,600} CATT ^{1,680} ATCCAC GTCACCACAA CCGAATGATG ACATCATATG GTGGG 1023
MybA2w PN12x	Exon 3 TTGACACACA AGTAAGTACT TCCAGTAAGC TG--ATCCAC GTCACCACAA CCGAATGATG ACATCATATG GTGGG 1721
MybA232a RaR	Exon3 TTGACACACA AGTAAGTACT TCCAGTAAGC TG--ATCCAC GTCACCACAA CCGAATGATG ACATCATATG GTGGG 1720
MybA232b KL	Exon3 TTGACACACA AGTAAGTACT TCCAGTAAGC TG--ATCCAC GTCACCACAA CCGAATGATG ACATCATATG GTGGG 1722
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3 AAAGCCTGTT AGCTGAGCAT GCTCAAATGG ^{1,740} ATCAAGAAAC ^{1,800} TGACTTTTCG GCTTCTGGAG AGATGCTTAT CGCAA 1098
MybA2w PN12x	Exon 3 AAAGCCTGTT AGCTGAGCAT GCTCAAATGG ATCAAGAAAC TGACTTTTCG GCTTCTGGAG AGATGCTTAT CGCAA 1796
MybA232a RaR	Exon3 AAAGCCTGTT AGCTGAGCAT GCTCAAATGG ATCAAGAAAC TGACTTTTCG GCTTCTGGAG AGATGCTTAT CGCAA 1795
MybA232b KL	Exon3 AAAGCCTGTT AGCTGAGCAT GCTCAAATGG ATCAAGAAAC TGACTTTTCG GCTTCTGGAG AGATGCTTAT CGCAA 1797
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3 GCCTCAGGAC AGAAGAAACT GCAGCACAGA AAAAGGGACC ^{1,820} CATGGATGGT ^{1,840} ATGATTGAAC ^{1,880} AAATCCAGGG AGGTG 1173
MybA2w PN12x	Exon 3 GCCTCAGGAC AGAAGAAACT GCAGCACAGA AAAAGGGACC CATGGATGGT ATGATTGAAC AAATCCAGGG AGGTG 1871
MybA232a RaR	Exon3 GCCTCAGGAC AGAAGAAACT GCAGCACAGA AAAAGGGACC CATGGATGGT ATGATTGAAC AAATCCAGGG AGGTG 1870
MybA232b KL	Exon3 GCCTCAGGAC AGAAGAAACT GCAGCACAGA AAAAGGGACC CATGGATGGT ATGATTGAAC AAATCCAGGG AGGTG 1872
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Exon3 AGGGTGATTT TCCATTTGAT GTGGGCTTCT GGGATACACC CAACACACAA GTAAATCATT TGATCTGA ^{1,880} 1241
MybA2w PN12x	Exon 3 AGGGTGATTT TCCATTTGAT GTGGGCTTCT GGGATACACC CAACACACAA GTAAATCATT TGATCTGA ^{1,900} Terminator 1946
MybA232a RaR	Exon3 AGGGTGATTT TCCATTTGAT GTGGGCTTCT GGGATACACC CAACACACAA GTAAATCATT TGATCTGA ^{1,920} Terminator 1945
MybA232b KL	Exon3 AGGGTGATTT TCCATTTGAT GTGGGCTTCT GGGATACACC CAACACACAA GTAAATCATT TGATCTGA ^{1,940} Terminator 1947
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Terminator 1,960 2,000 2,020 1241
MybA2w PN12x	Terminator CATTGTTATC TTAATGTTA AGTTCAAAG TTGTTCTTGC ATTCATACT TACTCCCTAA TCATTTTATG TTCCA 2021
MybA232a RaR	Terminator CATTGTTATC TTAATGTTA AGTTCAAAG TTGTTCTTGC ATTCATACT TACTCCCTAA TCATTTTATG TTCCA 2020
MybA232b KL	Terminator CATTGTTATC TTAATGTTA AGTTCAAAG TTGTTCTTGC ATTCATACT TACTCCCTAA TCATTTTATG TTCCA 2022
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Terminator 2,040 2,060 2,080 2,100 1241
MybA2w PN12x	Terminator AAGTTGTTAA TCTTAGAAAT AAAAACAAAA ATAATAAAT ATATCAATAT GTACAATGGT GGATATGGAT GTGAG 2096
MybA232a RaR	Terminator AAGTTGTTAA TCTTAGAAAT AAAAACAAAA ATAATAAAT ATATCAATAT GTACAATGGT GGATATGGAT GTGAG 2095
MybA232b KL	Terminator AAGTTGTTAA TCTTAGAAAT AAAAACAAAA ATAATAAAT ATATCAATAT GTACAATGGT GGATATGGAT GTGAG 2097
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Terminator 2,120 2,140 2,160 1241
MybA2w PN12x	Terminator CAGTGGATGC AAACACAAGC ATTGAATGAA TAGTTAAGAT TAATGAACCC AATCATTTGA AGTGACAAAA GAAGA 2171
MybA232a RaR	Terminator CAGTGGATGC AAACACAAGC ATTGAATGAA TAGTTAAGAT TAATGAACCC AATCATTTGA AGTGACAAAA GAAGA 2170
MybA232b KL	Terminator CAGTGGATGC AAACACAAGC ATTGAATGAA TAGTTAAGAT TAATGAACCC AATCATTTGA AGTGACAAAA GAAGA 2172
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Terminator 2,180 2,200 2,220 2,240 1241
MybA2w PN12x	Terminator CATTTTAAAA TATTCTTAAA ATAACAGTTG TGAAAAACA GTTTAAAAAA ATAATTTTAT AATGTTTTAT AAAAT 2246
MybA232a RaR	Terminator CATTTTAAAA TATTCTTAAA ATAACAGTTG TGAAAAACA GTTTAAAAAA ATAATTTTAT AATGTTTTAT AAAAT 2245
MybA232b KL	Terminator CATTTTAAAA TATTCTTAAA ATAACAGTTG TGAAAAACA GTTTAAAAAA ATAATTTTAT AATGTTTTAT AAAAT 2247
MybA2r ORF Cab. Sauv.	Terminator 2,260 2,280 1241
MybA2w PN12x	Terminator AAAATTTTAT TTAGGACCTG AATTGTATT AACCTATTT TAAAAATA 2295
MybA232a RaR	Terminator AAAATTTTAT TTAGGACCTG AATTGTATT AACCTATTT TAAAAATA 2294
MybA232b KL	Terminator AAAATTTTAT TTAGGACCTG AATTGTATT AACCTATTT TAAAAATA 2296

Anhang 5: Liste der im Projekt untersuchten `Riesling Rot`-Klone.

Akzessionsname	Akzessionsnummer	Herkunft	Bemerkung
Riesling, Roter (jung)	DEU616	Bundessortenamt	
Riesling, Roter (alt)	DEU616	Bundessortenamt	
Riesling Rot	DEU098-1980-082	Geisenheim	
Riesling Rot Gm 4	-	Geisenheim	
Stiftsgut Meyer RR 1	-	Klingenmünster	
Stiftsgut Meyer RR 2	-	Klingenmünster	
Roter Riesling (Mut, Weisbrodt) 55/11	DEU098-2016-003	Neustadt	id zu DEU363-107
Roter Riesling (Mut, Weisbrodt)	DEU363-107	Neustadt	
Roter Riesling (Rote Hälfte) 54/11	DEU098-2016-004	Neustadt	id zu DEU363-083
Roter Riesling (Rote Hälfte)	DEU363-083	Neustadt	
Roter Riesling	DEU363-131	Neustadt	
RR 41.1	-	Saale-Unstrut / Sachsen	
RR 41.3	-	Saale-Unstrut / Sachsen	
Riesling Rot	DEU098-1998-129	Weinsberg	id zu DEU456-1233 oder 1234
Riesling, Roter	DEU456-1233	Weinsberg	
Riesling, Roter	DEU456-1234	Weinsberg	
Roter Riesling Klon 1	DEU098-2016-052	Westhofen	id zu Westhofen RR 1
Westhofen RR 1	-	Westhofen	
Westhofen RR 2	-	Westhofen	
Westhofen RR 3	-	Westhofen	
Westhofen RR 4	-	Westhofen	

Anhang 6: Zuordnung der gefärbten `Silvaner` innerhalb der deutschen Sortimente anhand ihrer Mutation. Getestet wurde auf das *MybA1b*- sowie *MybA31*-Allel mittels Endpoint-PCR.

Akzessionsname	Akzessionsnummer	Leitname
Silvaner Rot	DEU098-2007-061	Silvaner Rot
Silvaner, Roter	DEU456-861	Silvaner Rot
Roter Silvaner	DEU363-036	Silvaner Rot
Silvaner Blau	DEU098-1992-066	Silvaner Blau
Silvaner Blau	DEU098-1980-063	Silvaner Blau
Silvaner Rot	DEU098-1991-125	Silvaner Blau
Silvaner, Blauer	DEU456-862	Silvaner Blau
Silvaner, Blauer	DEU456-863	Silvaner Blau
Blauer Silvaner	DEU454-L-4-6-2	Silvaner Blau
Roter Silvaner	DEU454-L-30-14-2	Silvaner Blau
Silvaner Blauer	DEU455-259	Silvaner Blau
Blauer Silvaner	DEU363-060	Silvaner Blau
Schwarzer Silvaner	DEU363-276	Silvaner Blau

Anhang 7: Genetisches Profil der im Projekt untersuchten Färberreben anhand der 9 SSR-Marker des VVC. `Pinot Noir` und `Pinot Gris` als Referenz.

Leitname	VVC-Kenn- nummer	Akzessionsname	Akzessionsnummer / Herkunft	VS2	VMD5	VMD7	VMD25	VMD27	VMD28	VMD32	VZag62	VZag79
Pinot Noir	9279	Spätburgunder M242	DEU098-1980-006	137:151	230:240	239:243	239:249	186:190	218:236	240:272	188:194	239:245
Pinot Gris	9275	Pinot Gris Cl. Dunkelgrau	DEU098-1980-058	137:151	230:240	239:243	239:249	186:190	218:236	240:272	188:194	239:245
Pinot Teinturier	9283	Pinot Teinturier	DEU454-L-28-4-2	137:151	230:240	239:243	239:249	186:190	218:236	240:272	188:194	239:245
Gamay Teinturier de Bouze	4379	Gamay Teinturier de Bouze	DEU098-1980-196	133:137	236:240	239:249	239:239	182:190	218:246	240:272	194:204	243:245
Teinturier	12304	Teinturier	DEU098-1993-213	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Farbtraube	DEU098-2002-003	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Farbtraube	DEU098-2011-063	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Farbtraube	DEU363-282	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Färbertraube	DEU454-L-9-4-2	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Teinturier mâle	DEU456-1068	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Färbertraube	Bundessortenamt	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Farbtraube (Fröhlich)	Bundessortenamt	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Plant rouge femelle	FRA139-303Mtp2	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Serzial	FRA139-303Mtp6	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Teinturier	Bundessortenamt	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Plant rouge mâle	FRA139-303Mtp1	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Teinturier du Cher PVM	FRA139-0Mtp1749	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Rubintraube	DEU456-880	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Teinturier	12304	Teinturier du Cher	FRA139-303Mtp7	137:151	240:240	239:243	239:249	180:190	228:236	272:272	188:194	245:255
Dunkelfelder	3724	Dunkelfelder	DEU098-1980-014	135:151	238:240	243:247	249:255	180:195	228:244	240:272	188:204	249:255
Rubired	10308	Rubired	DEU098-1991-123	133:145	236:236	249:263	239:241	182:182	254:260	272:272	186:198	243:247
Titan	12531	Titan	DEU098-1980-459	133:155	228:238	239:249	239:241	180:180	260:268	240:272	186:194	255:255
Teinturier Luebeck	23366	Teinturier male	DEU098-1995-052	133:151	236:240	239:239	239:255	180:195	228:236	272:272	194:196	251:255
Seibel 5437	11110	Seibel 5437	DEU098-2003-093	125:133	238:266	239:251	249:249	186:204	242:246	240:252	186:202	245:247

Leitname	VVC-Kenn- nummer	Akzessionsname	Akzessionsnummer / Herkunft	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VZag62	VZag79
Golubok	4888	Golubok	DEU098-1988-077	129:133	238:248	239:241	237:239	184:184	244:252	240:272	184:188	255:259
Farbfaenkisch	4053	Farbfaenkisch	DEU454-L-27-5-2	143:151	240:242	239:239	249:255	180:195	228:246	272:272	194:194	251:255
Alicante Henri Bouschet	304	Alicante Henri Bouschet	DEU098-1990-007	133:145	228:240	239:243	241:241	182:195	244:260	250:272	188:188	243:257
Bouschet Petit	1619	Bouschet Petit	DEU098-2001-016	133:151	236:240	239:243	241:249	182:190	236:260	250:272	188:196	243:245
Karmin	5999	Karmin	DEU098-1991-143	133:133	228:240	239:255	239:241	182:186	228:260	250:272	196:204	243:251
Biborkadarka	1339	Biborkadarka	DEU098-1991-136	133:145	228:228	239:255	239:249	195:195	244:260	272:272	188:204	251:257
Kurucver	6573	Kurucver	DEU098-1991-149	133:133	228:240	239:255	239:249	180:195	228:260	250:272	196:204	249:255
Bailey Alicante A	898	Bailey Alicante A	DEU098-1980-536	127:137	228:240	249:249	237:239	186:190	218:246	240:272	186:204	245:251
Royalty	10288	Royalty	DEU098-1991-119	145:151	236:240	249:257	239:249	176:195	228:248	250:256	188:198	247:257
Flot Rouge	4164	Flot Rouge	DEU098-1980-642	133:151	234:254	239:251	237:249	192:202	236:248	252:252	194:194	245:251
Grand Noir	5012	Grand Noir	DEU098-1980-125	139:151	228:236	239:243	249:271	182:182	236:244	240:250	188:188	243:259
Karmrahut	6002	Karmrahut	DEU098-1988-079	133:133	238:240	243:249	241:241	180:182	244:260	250:250	188:196	239:243
Morrastel Bouschet	8009	Morrastel Bouschet	DEU098-1980-268	145:151	228:236	239:239	241:249	182:186	236:258	252:272	188:196	243:251
Kolor	6388	Kolor	DEU098-1980-033	151:151	240:240	239:243	249:249	180:186	218:236	272:272	188:194	239:255
Deckrot	3482	Deckrot	DEU098-1980-010	137:151	230:240	239:243	249:249	190:190	218:236	240:272	188:194	245:245
Teinturier femelle (non identified)	24854	Teinturier femelle	DEU456-1127	133:137	228:240	239:243	249:249	190:192	228:258	240:272	188:196	245:251
Accent	20540	Accent	DEU098-2013-031	139:151	224:240	239:261	243:249	180:190	218:228	250:272	194:202	255:259
Dakapo	14728	Dakapo	DEU098-2011-046	137:151	234:240	243:255	249:249	190:195	218:228	272:272	188:204	245:249
Cabernet Mitos	15499	Cabernet Mitos	DEU098-2010-046	137:143	228:240	239:239	239:249	180:195	228:246	250:272	194:194	251:255
Palas	16871	Palas	DEU098-2010-049	137:143	240:242	239:239	239:249	180:195	228:246	272:272	194:204	251:255
Cabernet Sauvignon	1929	Cabernet Sauvignon	DEU098-2000-050	139:151	234:242	239:239	239:249	176:190	234:236	240:240	188:194	247:247
Sangiovese	10680	Sangiovese	DEU098-1991-166	133:133	228:238	239:263	241:241	180:186	234:244	252:256	194:196	243:259
Tempranillo Tinto	12350	Tempranillo	DEU098-1993-193	143:145	238:238	239:253	241:255	184:184	258:258	250:252	196:200	247:251
Blaufränkisch	1459	Blaufränkisch	DEU098-2001-106	143:143	228:242	239:249	249:255	180:195	246:246	250:272	194:204	237:251
Cabernet Franc	1927	Cabernet Franc	DEU098-1980-148	139:147	228:242	239:263	239:255	182:190	228:236	240:258	194:204	247:259

Anhang 8: SSS-Markerprofil am Beerenfarbgen (Chr 2, ~14,2 Mb) der im Projekt untersuchten Färbereben. `Pinot Noir` und `Pinot Gris` als Referenz.

Leitname	Akzessionsname	Akzessionsnummer / Herkunft	VNTM1	GF02-61	GF02-62	GF02-68	VNTM3	VNTM4	VNTM5	VNTM6	GF02-64	GF02-67	VMC8C2	VMC7G3
Pinot Noir	Spätburgunder M242	DEU098-1980-006	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Pinot Gris	Pinot Gris Cl. Dunkelgrau	DEU098-1980-058	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Pinot Teinturier	Pinot Teinturier	DEU454-L-28-4-2	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Teinturier	DEU098-1993-213	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Farbtraube	DEU098-2002-003	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Farbtraube	DEU098-2011-063	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Farbtraube	DEU363-282	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Farbtraube	DEU454-L-9-4-2	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Teinturier mâle	DEU456-1068	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Färbtraube	Bundessortenamt	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Farbtraube (Fröhlich)	Bundessortenamt	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Plant rouge femelle	FRA139-303Mtp2	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Serzial	FRA139-303Mtp6	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Teinturier	Bundessortenamt	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Plant rouge mâle	FRA139-303Mtp1	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Teinturier du Cher PVM	FRA139-0Mtp1749	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Rubintraube	DEU456-880	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier	Teinturier du Cher	FRA139-303Mtp7	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Dunkelfelder	Dunkelfelder	DEU098-1980-014	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Rubired	Rubired	DEU098-1991-123	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:208	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Titan	Titan	DEU098-1980-459	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier Luebeck	Teinturier male	DEU098-1995-052	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	143:147	130:136
Seibel 5437	Seibel 5437	DEU098-2003-093	161:169	286:286	373:385	md:md	276:276	208:211	294:294	148:152	314:314	388:404	135:145:147	114:138
Golubok	Golubok	DEU098-1988-077	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:208	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Farbfaenkisch	Farbfaenkisch	DEU454-L-27-5-2	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	143:147	130:136

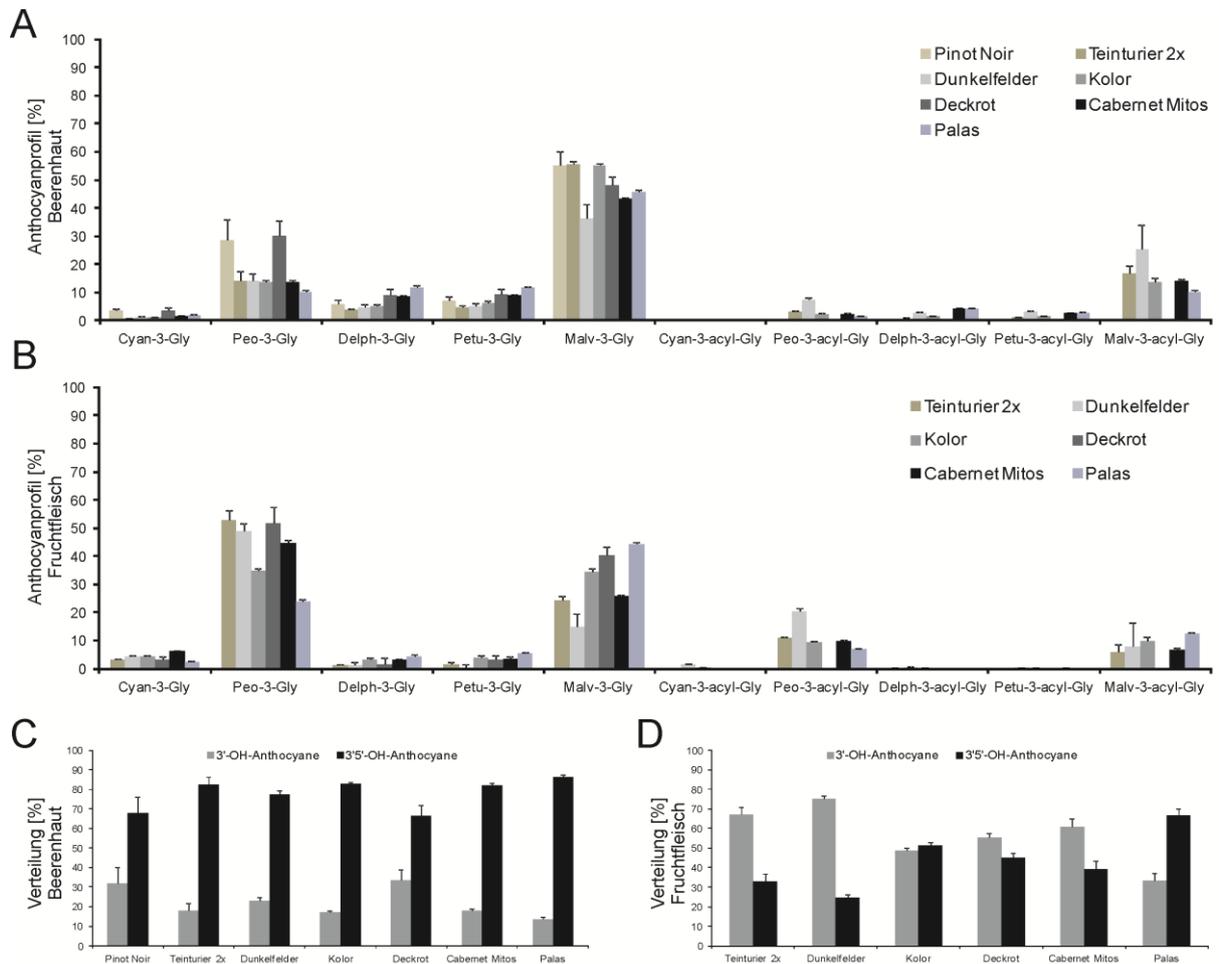
Leitname	Akzessionsname	Akzessionsnummer / Herkunft	VVNTM1	GF02-61	GF02-62	GF02-68	VVNTM3	VVNTM4	VVNTM5	VVNTM6	GF02-64	GF02-67	VMC8C2	VMC7G3
Alicante Henri Bouschet	Alicante Henri Bouschet	DEU098-1990-007	163:163	283:286	373:395	374:383	300:302	208:208	294:308	146:148	308:314	388:394	147:147	114:130
Bouschet Petit	Bouschet Petit	DEU098-2001-016	163:163	283:286	373:395	374:383	300:302	208:211	288:308	146:148	308:314	388:394	131:147	116:130
Karmin	Karmin	DEU098-1991-143	163:163	283:283	373:373	374:383	300:300	208:208	308:308	144:148	314:314	388:398	147:149	114:130
Biborkadarika	Biborkadarika	DEU098-1991-136	163:173	283:283	373:373	374:383	300:300	208:208	308:308	144:148	314:314	388:398	147:149	114:130
Kurucver	Kurucver	DEU098-1991-149	163:173	283:283	373:373	374:383	300:300	208:208	308:308	144:148	314:314	388:398	147:149	114:130
Bailey Alicante A	Bailey Alicane A	DEU098-1980-536	163:163	283:283	373:373	374:374	276:276	208:211	288:308	148:148	314:314	388:388	147:159:167	130:146
Royalty	Royalty	DEU098-1991-119	163:163	283:286	373:373	374:383	276:300	208:211	288:308	148:148	314:318	388:392	131:147	116:116
Flot Rouge	Flot Rouge	DEU098-1980-642	161:169	283:283	373:376	374:374	300:300	208:211	308:308	148:152	314:314	388:388	135:145:147	130:138
Grand Noir	Grand Noir	DEU098-1980-125	163:163	283:286	373:395	374:383	300:302	208:211	288:288	146:148	308:314	388:394	131:147	116:130
Karmrahuyt	Karmrahuyt	DEU098-1988-079	163:175	283:286	373:395	374:383	300:300	208:211	302:308	148:148	308:314	388:396	137:147	130:140
Morrastel Bouschet	Morrastel Bouschet	DEU098-1980-268	163:175	283:286	373:395	374:383	300:300	208:211	302:308	148:148	308:314	388:396	147:147	114:130
Kolor	Kolor	DEU098-1980-033	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Deckrot	Deckrot	DEU098-1980-010	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Teinturier femelle (non identified)	Teinturier femelle	DEU456-1127	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Accent	Accent	DEU098-2013-031	163:169	283:286	373:385	374:390	276:300	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	147:147	114:130
Dakapo	Dakapo	DEU098-2011-046	163:163	283:286	373:395	374:383	300:300	208:211	308:308	144:148	314:314	388:396	147:149	125:130
Cabernet Mitos	Cabernet Mitos	DEU098-2010-046	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	143:147	130:136
Palas	Palas	DEU098-2010-049	163:169	283:286	373:385	374:390	276:276	208:211	294:308	148:148	314:314	388:404	143:147	114:136
Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	DEU098-2000-050	167:169	286:292	385:388	374:390	276:296	208:208	294:294	148:148	314:314	396:404	147:149	114:130
Sangiovese	Sangiovese	DEU098-1991-166	169:181	286:292	385:385	378:390	276:278	208:211	294:294	148:148	314:314	394:404	143:147	114:136
Tempranillo Tinto	Tempranillo	DEU098-1993-193	169:175	286:286	385:395	383:390	276:276	208:208	294:302	148:148	308:314	396:404	147:147	114:114
Blaufränkisch	Blaufränkisch	DEU098-2001-106	163:169	286:286	385:395	383:390	276:276	208:211	294:294	144:148	314:314	396:404	143:149	125:136
Cabernet Franc	Cabernet Franc	DEU098-1980-148	167:169	286:292	385:388	374:390	276:296	208:208	294:294	148:148	314:314	396:404	147:149	114:130

Anhang 9: Alignment des *MybA1t2*-Allels der Sorte 'Teinturier' im Vergleich zur *MybA1c*-Referenz aus 'Pinot Noir'. Unterschiede sind dunkelrot hinterlegt.



		1,440	1,460	1,480	1,500	
Pinot Noir MybA1c	Promoter	GTCCA TGAAC TCCAGCGCAT TTGGAAGCCA GTAATGCACC ATAAGAAACG TGTCGAATAA ACCAATTAGG GGTC T				1092
Teinturier2x MybA112	Promoter	GTCCA TGAAC TCCAGCGCAT TTGGAAGCCA GTAATGCACC ATAAGAAACG TGTCGAATAA ACCAATTAGG GGTC T				1500
		1,520	1,540	1,560		
Pinot Noir MybA1c	Promoter	GGTGTCGGAG TCATGAGATA GAACAGGTTT C GAGGTTGTTA TATATCAATC AATAATTAGA GAAGGAGCCG GTCTC				1167
Teinturier2x MybA112	Promoter	GGTGTCGGAG TCATGAGATA GAACAGGTTT C GAGGTTGTTA TATATCAATC AATAATTAGA GAAGGAGCCG GTCTC				1575
		1,580	1,600	1,620	1,640	
Pinot Noir MybA1c	Promoter	TTGTGTTGAG TTGACTC AT GGAGAGCTTA GGAGTTAGAA AGGGTGCATG GATCCAAGAA GAGGATGTTT TCCTG				1242
Teinturier2x MybA112	Promoter	TTGTGTTGAG TTGACTC AT GGAGAGCTTA GGAGTTAGAA AGGGTGCATG GATCCAAGAA GAGGATGTTT TCCTG				1650
		1,660	1,680	1,700	1,720	
Pinot Noir MybA1c	Exon1	AGGAAATGCA TTGAGAAATA TGGAGAAGGA AAGTGGCATC TGGTCCCCT CCGAGCA GT AACATGAAAG AGAAA				1317
Teinturier2x MybA112	Exon1	AGGAAATGCA TTGAGAAATA TGGAGAAGGA AAGTGGCATC TGGTCCCCT CCGAGCA GT AACATGAAAG AGAAA				1725
		1,740	1,760	1,780	1,800	
Pinot Noir MybA1c	Intron1	GGGATCAGTA TTTATTTGTG TTTTTTACT TCTGTTTTGC TAAAGAGTT TCATTTTCTT GAGTTTGCA GGTTC				1392
Teinturier2x MybA112	Intron1	GGGATCAGTA TTTATTTGTG TTTTTTACT TCTGTTTTGC TAAAGAGTT TCATTTTCTT GAGTTTGCA GGTTC				1800
		1,820	1,840	1,860		
Pinot Noir MybA1c	Exon2	AATAGATGCC GAAAAGCTG CAGGTTGAGA TGGCTCAATT ATTTGAAGCC GGATATCAAG AGAGGAGAGT TTGCA				1467
Teinturier2x MybA112	Exon2	AATAGATGCC GAAAAGCTG CAGGTTGAGA TGGCTCAATT ATTTGAAGCC GGATATCAAG AGAGGAGAGT TTGCA				1875
		1,880	1,900	1,920	1,940	
Pinot Noir MybA1c	Exon2	TTAGACGAGG TTGATCTCAT GATTAGGCTT CACAATTTGT TGGGGAACA GCAAGTCTAT AATAACTCAA GTACT				1542
Teinturier2x MybA112	Exon2	TTAGACGAGG TTGATCTCAT GATTAGGCTT CACAATTTGT TGGGGAACA GCAAGTCTAT AATAACTCAA GTACT				1950
		1,960	1,980	2,000	2,020	
Pinot Noir MybA1c	Intron2	AGCTTGATAA TGATATTATA TTAGTTCGTA AGCTGTTTCA AACTTACAAA AGAGCTGTTT AGTTGATACT TTGTC				1617
Teinturier2x MybA112	Intron2	AGCTTGATAA TGATATTATA TTAGTTCGTA AGCTGTTTCA AACTTACAAA AGAGCTGTTT AGTTGATACT TTGTC				2025
		2,040	2,060	2,080	2,100	
Pinot Noir MybA1c	Intron2	TAGTGTGCGTGTATAA TGGTCCCTTGA TTGCGGGTAG GCTTCCAGGG AGGACTGCTA ATGATGTCAA GAAC T				1692
Teinturier2x MybA112	Intron2	TAGTGTGCGTGTATAA TGGTCCCTTGA TTGCGGGTAG GCTTCCAGGG AGGACTGCTA ATGATGTCAA GAAC T				2100
		2,120	2,140	2,160		
Pinot Noir MybA1c	Exon3	ATTGGCATA TAG TCACCACCTT C AAAAAGGAGG TTCAGTTCCA GGAAGAAGGG AGAGATAAAC CCCAAACACA TTCTA				1767
Teinturier2x MybA112	Exon3	ATTGGCATA TAG TCACCACCTT C AAAAAGGAGG TTCAGTTCCA GGAAGAAGGG AGAGATAAAC CCCAAACACA TTCTA				2175
		2,180	2,200	2,220	2,240	
Pinot Noir MybA1c	Exon3	AAACCAAAGC TATAAAGCCT CACCCTCACA AGTTCTCCAA AGCCTTGCCA AGGTTTGAAC TAAAACTAC AGCTG				1842
Teinturier2x MybA112	Exon3	AAACCAAAGC TATAAAGCCT CACCCTCACA AGTTCTCCAA AGCCTTGCCA AGGTTTGAAC TAAAACTAC AGCTG				2250
		2,260	2,280	2,300	2,320	
Pinot Noir MybA1c	Exon3	TGATACTTT TGACACACAA GTCAGTACTT CCAGTAAGCC ATCATCCACG TCACCACAAC GGAATGATGA CATCA				1917
Teinturier2x MybA112	Exon3	TGATACTTT TGACACACAA GTCAGTACTT CCAGTAAGCC ATCATCCACG TCACCACAAC GGAATGATGA CATCA				2325
		2,340	2,360	2,380	2,400	
Pinot Noir MybA1c	Exon3	TATGGTGGGA AAGCCTGTTA GCTGAGCATG CTCCAA TGGTA TCAAGAAACT GACTTTTCGG CTCTGGAGA GATGC				1992
Teinturier2x MybA112	Exon3	TATGGTGGGA AAGCCTGTTA GCTGAGCATG CTCCAA TGGTA TCAAGAAACT GACTTTTCGG CTCTGGAGA GATGC				2400
		2,420	2,440	2,460		
Pinot Noir MybA1c	Exon3	TATCGCAAG CCTCAGGACA GAAGAACTG CAACACAGAA AAAGGGACCC ATGGATGGTA TGATTGAACA AATCC				2067
Teinturier2x MybA112	Exon3	TATCGCAAG CCTCAGGACA GAAGAACTG CAACACAGAA AAAGGGACCC ATGGATGGTA TGATTGAACA AATCC				2475
		2,480	2,500	2,520	2,540	
Pinot Noir MybA1c	Exon3	AGGGAGGTGA GGGTGATTTT CCATTTGATG TGGGCTTCTG GGATACACCC AACACACAAG TAAATCACTT GATCT				2142
Teinturier2x MybA112	Exon3	AGGGAGGTGA GGGTGATTTT CCATTTGATG TGGGCTTCTG GGATACACCC AACACACAAG TAAATCACTT GATCT				2550
		2,560	2,580	2,600	2,620	
Pinot Noir MybA1c	Exon3	GATTTAGACC ATTTCAATCT TAATGTTTAA GTTCAAAGT TGTCTTTCG TACACGCTCT ACTCCCTAAT CATT				2217
Teinturier2x MybA112	Exon3	GATTTAGACC ATTTCAATCT TAATGTTTAA GTTCAAAGT TGTCTTTCG TACACGCTCT ACTCCCTAAT CATT				2625
		2,640	2,660	2,680	2,700	
Pinot Noir MybA1c	Terminator	TATGTTCCAA AGTTGTTAAT CTTAGAAATA AAAACAAAAA TAATAAATAT ATCAATATGT ATAATGGTGT ATAGG				2292
Teinturier2x MybA112	Terminator	TATGTTCCAA AGTTGTTAAT CTTAGAAATA AAAACAAAAA TAATAAATAT ATCAATATGT ATAATGGTGT ATAGG				2700
		2,720	2,740	2,760		
Pinot Noir MybA1c	Terminator	GATGTGAGCA GTGGATGCAA ACTCAAGCAT TGAATGAATG GTTAAGATTA ATGAACCCAA TCATTTGAAG TGACA				2367
Teinturier2x MybA112	Terminator	GATGTGAGCA GTGGATGCAA ACTCAAGCAT TGAATGAATG GTTAAGATTA ATGAACCCAA TCATTTGAAG TGACA				2775
		2,780	2,800	2,820	2,840	
Pinot Noir MybA1c	Terminator	AAAGAAAGAC ATTTTAAAAG ATTCTTAAACA ATATGAAAAA GTTGTTCAT ATTTCTATCG GTTCCCAACC ATTAA				2442
Teinturier2x MybA112	Terminator	AAAGAAAGAC ATTTTAAAAG ATTCTTAAACA ATATGAAAAA GTTGTTCAT ATTTCTATCG GTTCCCAACC ATTAA				2850
		2,860	2,880	2,900	2,920	
Pinot Noir MybA1c	Terminator	TTAGATGGAT GGACCATTGA AATATCTCAT GCATATTGAA TTAATAAAAC AAGAAATTTT CACATAGTTA CACCA				2517
Teinturier2x MybA112	Terminator	TTAGATGGAT GGACCATTGA AATATCTCAT GCATATTGAA TTAATAAAAC AAGAAATTTT CACATAGTTA CACCA				2925
		2,940				
Pinot Noir MybA1c	Terminator	GTAAAAGGAA AATAAGTTGA AAATGGAA				2546
Teinturier2x MybA112	Terminator	GTAAAAGGAA AATAAGTTGA AAATGGAA				2954

Anhang 10: Anthocyanprofile in der Beerenhaut und im Fruchtfleisch sowie prozentuale Verteilung in 3'-OH-Anthocyane und 3'5'-OH-Anthocyane lesereifer Beeren von 'Teinturier'-Nachkommen. 'Pinot Noir' und Teinturier 2x als Referenz.



Danksagungen

An dieser Stelle danke ich allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

- Prof. Dr. Reinhard Töpfer für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof durchführen zu können und die wertvollen Denkanstöße
- Apl. Prof. Dr. Eva Zyprian für die Betreuung der Promotion und die stete Hilfestellung bei Fragen und Problemen
- Dr. Ludger Hausmann für die Betreuung des Projektes und die vielen fruchtbaren Gespräche
- Dr. Erika Maul für die großartige Zusammenarbeit während des Projektes sowie ihre hervorragende Unterstützung
- Meiner rechten Hand Carina Mook für ihre ausgezeichnete Laborarbeit und die tolle Zusammenarbeit
- Ulrike Braun, Petra Stritzinger und Moritz Cappel für die Hilfe bei den Anthocyananalysen
- Anna Werner, Dr. Anna Kicherer, Daniel Zandler, Pierre Schneider und Robert Richter für die vielseitige Unterstützung und die vielen geschätzten Diskussionen sowie allen Doktoranden für den guten Zusammenhalt und die angenehme Zeit
- Dr. Oliver Trapp und Dr. Florian Schwander für die wichtigen Anregungen
- Heike Bennek, Margit Schneider, Margrit Daum, Dagmar Andrä, Willi Gläsgen, Sabine Hieb-Gläsgen, Anita Kramm und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor und im Außenbetrieb für die gute Unterstützung
- Nina Adam und Hiltrud Heupel für die Beschaffung von Literatur
- Claudia Welsch für die Bestellung und Bereitstellung von Materialien und Ulla Müller für den EDV-Support
- Ursula Brühl für das Anfertigen von zahlreichen Fotografien
- Sabine Martin, Anita Heck und allen Mitarbeiterinnen in der Verwaltung für die Unterstützung bei verwaltungstechnischen Fragen
- Der AG Maul sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Rebenzüchtung Geilweilerhof für die gute Zusammenarbeit

Danken möchte ich auch meinen Eltern Stefanie und Stefan Röckel, meinem Bruder Henrik und meinen Großeltern Hedwig und Hermann(†) Röckel für ihre vielfältige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Julia für ihre tägliche Unterstützung sowie ihr Verständnis und dafür, dass sie immer an mich glaubt.

