

Molekulare Analyse der Traubenarchitektur

Molecular analysis of grapevine cluster architecture

FKZ: 11NA056 und FKZ: 11NA093

Projektkoordination:

Julius-Kühn Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen,
Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof
Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen
Tel.: +49 6345 41-0
Fax: +49 6345 41-179
E-Mail: zr@julius-kuehn.de
Internet: www.julius-kuehn.de/zr/

Autoren:

Zyprian, Eva; Theres, Klaus

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

I. Schlussbericht **MATA-Molekulare Analyse der Traubenarchitektur**

Zuwendungsempfänger

1. Julius-Kühn Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)
Erwin- Baur Str. 27, 06484 Quedlinburg

Ausführende Stelle:

Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof
Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen
Bearbeiter: Prof. Dr. Eva Zyprian
Förderkennzeichen: 2811NA056 (HV 5188)

2. Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
vertreten durch das Max-Planck-Institut für
Pflanzenzüchtungsforschung, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln
Bearbeiter: Prof. Dr. Klaus Theres
Förderkennzeichen 2811 NA093

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2014 – 30.09.2017

Berichtszeitraum: 01.10.2014 – 30.09.2017

MATA- Molekulare Analyse der Traubenarchitektur

Eva Zyprian, JKI Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen,
eva.zyprian@julius.kuehn.de

Klaus Theres, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, 50829 Köln
theres@mpipz.mpg.de

In diesem Projekt wurden wichtige phänotypische Kriterien und genetische Grundlagen zu dem komplexen Merkmal der Lockerbeerigkeit erarbeitet. Durch umfangreiche phänotypische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die Faktoren Rachislänge, Beerensielchenlänge und Beerengröße die Traubenarchitektur bestimmen. Genetische Determinanten dafür konnten in der Karte aus einer segregierenden Population in QTL Analysen lokalisiert werden. Bei den Spätburgunderklonen und den extrem lockeren Genotypen aus der für Traubenarchitektur spaltenden Kreuzungspopulation führt ein differentielles Wachstum der Infloreszenzen in einer definierten, frühen Entwicklungsphase zur Ausprägung des gewünschten Merkmals der Lockerbeerigkeit. Speziell bei den Spätburgunderklonen konnten Hinweise auf molekulare Mechanismen gefunden werden, die zur Lockerbeerigkeit signifikant beitragen. Mehrere weitere Kandidatengene zur Steuerung der Traubenarchitektur wurden identifiziert.

Summary

Molecular analysis of grapevine cluster architecture

This project elaborated important phenotypic criteria and genetic basic knowledge for the complex trait of grapevine cluster architecture. Extensive phenotypic characterization highlighted the length of the rachis, the length of the pedicels and the berry size as important determinants of cluster architecture. Genetic factors for these determinants could be localized as quantitative trait loci (QTL) in a trait-segregating cross population. In clones of 'Pinot Noir' and loosely clustered genotypes of the segregating population there is an early developmental phase with differential growth rates that leads to the desired trait of loose cluster structure due to enhanced growth. In case of the 'Pinot noir' clones a molecular difference was identified that significantly affects this process. Several additional candidate genes were identified that play a role in the development of loose/compact bunches.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	S. IV
Tabellenverzeichnis	S. IV
Abbildungsverzeichnis	S. V
1. Einführung	S.1
1.1 Gegenstand des Vorhabens	S.1
1.2 Zielsetzung	S.1
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	S.1
2. Wissenschaftlicher Stand zu Projektbeginn	S.2
3. Material und Methoden	S.4
3.1 Material	S.4
3.2 Methoden	S.4
3.2.1 Phänotypisierung	S.4
3.2.2 Molekulare und genetische Analysen	S.6
3.2.2.1 QTL-Analysen	S.6
3.2.2.2 Genexpressionsstudien	S.6
3.2.2.3 RNA- und gDNA Sequenzierung (Next generation sequencing (NGS))	S.7
3.2.2.4 Klonierung und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	S.7
3.2.3 Rasterelektronenmikroskopaufnahmen	S.7
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	S.8
4.1 Untersuchungen zum Längenzuwachs des Fruchtstandes	S.8
4.2 Untersuchungen von Teilaspekten der Lockerbeerigkeit	S.8
4.3 Untersuchungen von Stielchenepidermiszellen	S.8
4.4 Phylogenetische Untersuchungen der Spätburgunderklone	S.9
4.5 Identifizierungen von Kandidatengenens mittels RNA-Seq und gDNA-Seq	S.9
4.6 Weiterführende Genexpressionsanalysen:	S.10
4.7 Ergebnisse der QTL Analyse in der Population GF.GA-47-42 x 'Villard blanc'	S.11
4.8 Integrierte differentielle Genexpression	S.12
5. Diskussion der Ergebnisse	S.13
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse	S.15
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, Hinweise auf weiterführende Fragestellungen	S.16
8. Zusammenfassung	S.17
9. Literaturverzeichnis	S.19
10. Übersicht zu Veröffentlichungen, realisiert und geplant	S.20
II. Anhang zum Schlussbericht. Kurz gefasster Erfolgskontrollbericht	S.22

Abkürzungsverzeichnis

BAT	Berry Analysis Tool
BBCH	Entwicklungsstadien der Weinrebe nach der Klassifizierung der Biologischen Bundesanstalt, dem Bundessortenamt und der Chemischen Industrie
cDNA	aus RNA revers transkribierte komplementäre DNA
cM	centi Morgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
F1	Erste Filialgeneration
gDNA-Seq	genomische DNA-Sequenzierung
KG	Kandidatengene
LOD	logarithm of the odds, statistischer Kennwert zur Signifikanz von QTL Bereichen
miRNA	microRNA
NGS	next generation sequencing
QTL	Quantitative trait locus
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	Ribonukleinsäure-Sequenzierung
SNP	single nucleotide polymorphism

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	S.6
Übersicht und Probenumfang der Daten pro Genotyp zu Untermerkmalen der Traubenarchitektur	

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 S.9
Drei Entwicklungsstadien von Spätburgunderinfloreszenzen, die für die RNA-Seq Analyse verwendet wurden
- Abbildung 2 S.10
Mappingprofile (rosa) der vier Spätburgunderklone gegen die Kodierungssequenz eines Kandidatengenes (gelb).
- Abbildung 3 S.11
Position der QTLs für Untermerkmale der Traubenarchitektur auf den 19 Kopplungsgruppen der genetischen Karte aus der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard blanc'.
- Abbildung 4 S.12
Heatmap der relativen Expression (als $\Delta\Delta\text{Ct}$ Werte) von Kandidatengenen aus lockeren und kompakten 'Pinot Noir' Klonen zum BBCH Stadium 71 (Schrotkorngröße der Beeren).

1. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Botrytis, der Erreger des Grauschimmels, ist ein wichtiger Schaderreger im Weinbau insbesondere in nördlichen („cool climate“) Weinbauregionen mit gemäßigttem Klima und häufigen Niederschlägen. Wirksame zelluläre Resistenzmechanismen gegen diesen allgegenwärtigen pilzlichen Schaderreger sind nicht bekannt. Darüber hinaus entwickelt *Botrytis* auf Grund seiner hohen genetischen Variabilität sehr rasch Fungizidresistenzen, was den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln erschwert. Er kann jedoch durch physikalische Barrieren der Pflanze an der Infektion gehindert werden. Zu diesen physikalischen Faktoren gehört maßgeblich die Lockerbeerigkeit des Fruchtstands. Ziel dieses Projekts war daher die Erarbeitung der molekularen Grundlage und der Ableitung von genetischen Markern für die Lockerbeerigkeit der Rebe. Mit den Merkmals-gekoppelten molekularen Markern können effizienter neue Rebsorten geschaffen werden, die für einen nachhaltigen Weinbau der Zukunft mit reduziertem Fungizidaufwand dringend erforderlich sind.

1.2 Zielsetzung

Botrytis cinerea (Teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*) ist ein Pathogen mit nekrotropher Lebensweise, mit einem Wirtsspektrum von über 200 Kulturpflanzen (Williamson et al. 2007). Für *B. cinerea* sind gegenwärtig keine Resistenzen bekannt. In der Rebenzüchtung sind daher keine Resistenzdonoren verfügbar. Durch schnelleres Abtrocknen der Oberfläche erhöht eine lockere Traubenarchitektur jedoch die physikalische Barriere für pilzliche Schaderreger, auch gegen *B. cinerea*. Durch die Phänotypisierung der Nachkommen einer bezüglich des Merkmals Traubenarchitektur spaltenden Kreuzungspopulation aus dem Zuchtstamm GF.GA-47-42 ('Bacchus' x 'Seyval') und der weißen Keltertraubensorte 'Villard blanc' sollten Genombereiche identifiziert werden, die für die Vererbung von lockerer Traubenarchitektur verantwortlich sind. Die extrem lockerbeerigen Tafeltrauben der 'Cardinal'-Familie, Referenzsorten für Lockerbeerigkeit und ausgewählte extrem lockere sowie kompakte Genotypen der segregierenden Population wurden für differentielle Genexpressionsanalysen verwendet. Insbesondere wurden lockere und kompakte Klone der mutationsfreudigen 'Pinot Noir' (Spätburgunder) Klon-Familie untersucht, um Gene zu identifizieren, die für den lockeren Phänotyp mit verantwortlich sind. Basierend darauf sollten genetische Marker entwickelt werden, die mit Lockerbeerigkeit korrelieren. Diese sollen künftig zur Frühselektion von Sämlingen Anwendung finden (MAS – Marker-gestützte Selektion). Neue Rebsorten mit natürlichen Resistenzfaktoren gegen pilzartige Schädlinge erlauben eine deutliche Reduktion des Pflanzenschutzmittelaufwands und damit einen umweltfreundlicheren, nachhaltigen Weinbau.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Nach Voruntersuchungen in den Jahren 2013 und 2014, wurde in Siebeldingen am **JKI Geilweilerhof** in den Jahren 2015 und 2016 eine detaillierte phänotypische Charakterisierung vorgenommen. Vielfältige Untermerkmale der Traubenarchitektur wurden vermessen. Dies diente zur Identifizierung und Bestätigung von Genotypen mit lockerem Fruchtstand. In den Jahren 2015 und 2016 wurde zusätzlich die Zuwachsrate des Fruchtstandes bei lockeren und kompakten Trauben vermessen, um die Wachstumsdynamik der Genotypen zu ermitteln. Durch das **JKI** wurden 2015, 2016 und 2017 an insgesamt drei Standorten in unterschiedlichen Weinbauregionen zu acht Zeitpunkten je zwei Proben von sich entwickelnden Fruchtständen der 'Pinot Noir' Genotypen entnommen. Daraus wurde RNA extrahiert und cDNA synthetisiert. Zur Identifikation von funktionellen Kandidatengenen für

Lockerbeerigkeit wurde am **MPI Köln** die differentielle Genexpression in lockeren und kompakten 'Pinot Noir'-Klonen mit RNA-Seq Methodik bestimmt. Gene mit einem Expressionsunterschied von mehr als dem 1,5-fachen wurden auf ihre in der Literatur beschriebene Funktion geprüft und als funktionelle Kandidatengene eingeordnet, wenn sie mit Transkriptionsregulation, Zellteilung, Zellstreckung bzw. Zellwandsynthese in Verbindung gebracht werden konnten. Am **MPI Köln** wurden auch Orthologe zu möglichen Kandidatengenen der Traubenarchitektur in Modellorganismen gesucht. Da solche Orthologe in der Weinrebe nicht aufzufinden waren wurden Kandidatengene aus vergleichenden RNA-Seq Studien und aus der Sequenzierung genomischer DNA ermittelt. QTLs mit positionellen Kandidatengenen für Lockerbeerigkeit konnten am **JKI Geilweilerhof** in der bezüglich der Traubenarchitektur aufspaltenden Population Gf.GA-47-42 x 'Villard blanc' mit der verfügbaren Kopplungskarte (Zyprian et al. 2016) und den in 2013 bis 2017 erhobenen phänotypischen Daten berechnet werden. Kandidatengene, die sowohl in funktionellen Experimenten, als auch bei der positionellen Bestimmung mit Lockerbeerigkeit assoziiert waren, wurden bezüglich ihrer Genexpression zur Validierung an weiteren lockeren und kompakten Genotypen getestet. Durch Sequenzanalysen ausgewählter Kandidatengene wurden am **MPI Köln** Sequenzpolymorphismen untersucht, die mit der Regulation von Mitose assoziiert sind. Ein Gen, welches sich in diesen Untersuchungen als vielversprechend erwies, wurde über die ursprüngliche Planung hinausgehend durch Transformation in *Arabidopsis thaliana* funktionell geprüft. Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden Epidermiszellen von phänotypisch unterschiedlichen 'Pinot Noir'-Klonen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert.

2. Wissenschaftlicher Stand zu Projektbeginn

Es ist bekannt, dass *Botrytis* in einer Vielzahl von Stämmen, u.a. durch den Besitz von Transposons im Genom, genetisch äußerst variabel ist und mit unterschiedlicher Aggressivität auftritt (Derckel et al. 1999). Der Ascomycet kann leicht Fungizidresistenz entwickeln, z.T. mit „Multidrug“-Resistenzmechanismen gegen unterschiedliche Fungizide zugleich (z.B. Topolovec-Pintaric, 2009; Kretschmer und Hahn, 2008). Die saprophytische Lebensweise von *B. cinerea* kann zu einer parasitischen übergehen, wenn bei Vorhandensein von Wasser die Konidien (vegetativ gebildete Sporen) auf Gescheinen (den Blütenständen der Reben) und später auf reifenden Früchten auskeimen. Die Keimschläuche formen ein Myzel auf der Cuticula des Wirts, bilden Appressorien (Haftorgane) und versuchen, die Cuticula zu durchdringen. Das Eindringen wird vermutlich durch Lipasen erleichtert, die der Pilz im frühen parasitischen Stadium bildet (Commenil et al. 1999). Dies gelingt am besten bei Mikrorissen oder mechanischen Verletzungen der Beerenhäute. Die Konidien benötigen zur Keimung Wasser in flüssiger Form (Kretschmer et al. 2007). Die Infektionshäufigkeit und Infektionsintensität von *B. cinerea* bei Reben korreliert mit der Temperatur und Dauer der Oberflächenfeuchte der Trauben (Broome et al. 1995; Ciliberti et al. 2015). Lockere Traubenarchitektur führt zu reduzierter Infektionshäufigkeit und -intensität (Vail and Marois, 1991) durch schnelleres Abtrocknen und die Verhinderung von abquetschungsbedingten Mikrorissen. Die internationale Organisation für Rebe und Wein (OIV) klassifiziert mit dem Deskriptor 204 (<http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/description-of-grape-varieties/oiv-descriptor-list-for-grape-varieties-and-vitis-species-2nd-edition>) die Kompaktheit von Trauben und benennt Referenzsorten für die fünf Stufen der Lockerbeerigkeit. Das Merkmal Lockerbeerigkeit kann durch Mutation einzelner Gene entstehen. In der spanischen Keltertraubensorte 'Carignan' ist eine spontane somatische Transposon-induzierte aktivierende Mutation des *VvTFL1A* Gens bekannt, welche sich auf die Erzeugung der reproduktiven Meristeme und die Verzweigung der Infloreszenzen

in der Form auswirkt, dass zwar die Blütenentwicklung verzögert ist, die Infloreszenzen aber größer, stärker verzweigt und weniger kompakt erscheinen (Fernandez et al. 2010). Eine exemplarische Untersuchung der kompakt-beerigen Rebsorten 'Riesling' und 'Chardonnay' im Vergleich zu den locker-beerigen Sorten 'Sultana' und 'Exotic' (Shavrukov et al. 2003) ergab, dass der wichtigste Unterschied zwischen kompakten und lockeren Fruchtständen in der Internodienlänge der Fruchtstandsachse (Rachis) liegt und durch verstärkte Zellexpansion entsteht. Diese Unterschiede bildeten sich in der frühen Phase der Infloreszenzentwicklung bereits vor der Blüte und äußerten sich durch unterschiedliche Elongationsraten der sich entwickelnden Infloreszenzen. Eine neuere genetische Studie zur Heritabilität und QTL Analyse von Merkmalen aus der Traubenarchitektur an den Tafeltraubensorten 'Ruby Seedless' und 'Sultanina' bestätigte die Bedeutung der Rachislänge und der Anzahl der Nodien entlang ihrer Hauptachse als wichtiges Kriterium der Lockerbeerigkeit (Correa et al. 2014). In der Studie wurde eine genetische Karte zur Analyse von QTL-Regionen für Merkmale der Lockerbeerigkeit genutzt und dabei konnten signifikante Faktoren auf den Chromosomen 5, 8, 9, 14, 17 und 18 identifiziert werden.

Für die Kreuzungspopulation von Gf.GA-47-42 x 'Villard blanc', die bezüglich der Merkmale der Traubenarchitektur aufspaltet und Gegenstand unserer Untersuchungen war, stand zu Beginn des Forschungsvorhabens eine Kopplungskarte zur Verfügung (Zyprian et al. 2016).

3. Material und Methoden

3.1 Material

A) Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x 'Villard blanc'

Die 151 F1-Individuen der Kreuzungspopulation segregieren sowohl bezüglich der OIV Kompaktheitsklassen (1 = sehr locker bis 9 = sehr kompakt) als auch in Bezug auf mehrere Sub-Merkmale der Lockerbeerigkeit. Am Standort Siebeldingen standen jeweils acht Pflanzen pro Genotyp zur Verfügung.

B) 'Pinot Noir'-Klone mit lockerbeeriger und kompakter Traubenarchitektur

Die Variation der Kompaktheit reicht von Klasse drei bis neun (OIV 204). Die untersuchten 'Pinot Noir' Klone sind in drei Gruppen eingeteilt:

- Klone mit lockerem Stielgerüst:
WE-171, WE-242, WE-M1, Gm-1-86, FR-12-L, FR-13-L
- Klone mit kleinen Beeren:
Gm-20-13, FR-1801
- Klone mit kompakten Trauben:
Frank Charisma, Frank Classic, ENTAV 777, Gm-18

Die untersuchten 'Pinot Noir' Klone stehen an drei Standorten in langjährig etablierten Anlagen:

- Heppenheim (Hessen) Weinbaugebiet Bergstrasse (Weinbauzone A)
- Siebeldingen (Rheinland-Pfalz) Weinbaugebiet Pfalz (Weinbauzone A)
- Jechtingen (Baden-Württemberg) Weinbaugebiet Baden (Weinbauzone B)

Die im Ertragsweibau übliche Veredelung auf reblausresistente Unterlagssorten ist an allen drei Standorten mit der Unterlage '125AA' realisiert. Die Pflanzdichte ist mit 1,8 bis 2,2m² in den drei Pflanzungen vergleichbar. Es standen jeweils über hundert Rebstöcke pro Klon in den Versuchsanlagen zur Verfügung. Die Pflanzungen sind „en bloc“, somit können Klima und Bodenverhältnisse jeweils als homogen angesehen werden.

C) Die Sorte 'Cardinal', eine Tafeltraubensorte, ist eine Kreuzung aus 'Alphonse Lavallée' x 'Königin der Weingärten'. Sie zeigt einen extrem lockerbeerigen Phänotyp, wie der Parentaltyp 'Königin der Weingärten'. Alle drei Rebsorten stehen im Sortiment des JKI Geilweilerhofs.

D) Von der OIV benannte Referenzsorten für die Klassen der Lockerbeerigkeit:

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1 = sehr locker, 'Uva Rara' | 7 = dicht, 'Sauvignon blanc' |
| 3 = locker, 'Prosecco Vermentino' | 9 = sehr dicht, 'Pinot Meunier' |
| 5 = mittel, 'Schiava Grossa' | |

Diese Vergleichssorten stehen ebenfalls in der Pflanzung genetischer Ressourcen am JKI Geilweilerhof.

3.2 Methoden

3.2.1 Phänotypisierung

In den Jahren 2013 bis 2017 wurden die in Tabelle 1 aufgeführten ampelometrischen Messungen vorgenommen. Dabei fand die Phänotypisierung des Pflanzenmaterials (A), (B), (C) und (D) wie folgt statt:

- Am Standort Siebeldingen in den Jahren 2015 und 2016 durch wöchentliche Messung des Längenzuwachses des Fruchtstandes bei (A), (B) und (C). In 2016 wurden zusätzlich die OIV Referenztrauben (D) gemessen. Es wurde bei acht Individuen pro Genotyp/Klon an je zwei basal inserierten Infloreszenzen bzw. Trauben die Gesamtlänge gemessen (n=16). Bei (A) wurde an jeweils 10 Individuen aus der Population mit der größten bzw. kleinsten Rachislänge (bezogen auf Untersuchungen des Vorjahres) die Messung vorgenommen; bei (B) und (C) wurden zufällig acht Pflanzen pro Jahr ausgewählt. Die Messungen erfolgten in den Jahren 2015 und 2016 jeweils vom Entwicklungsstadium BBCH53 (Gescheine deutlich sichtbar) bis BBCH79 (Ende des Traubenschlusses) statt
- Durch Bonitur der Lockerbeerigkeit anhand des OIV Deskriptors 204 zum Entwicklungsstadium BBCH89 (Lesereife der Beeren)
- Durch Bonitur und Bild-basierte Datenerhebung von Teilaspekten der Lockerbeerigkeit
- Unter Verwendung von ImageJ (Schneider et al. 2012) zur Vermessung der Rachis-, Internodien-, Lateral- und Pedicellängen
- Durch automatische Bildauswertung mit BAT (Kicherer et al. 2013) zur Bestimmung der Anzahl der Beeren und dem Volumen der Beeren
- Durch Messung des Erntegewichts der Trauben, der Beeren und der Rachis (ohne Beeren)
- Durch Volumenbestimmung der Traube durch Verdrängung

Tabelle 1: Übersicht und Probenumfang der Daten pro Genotyp zu Untermerkmalen der Traubenarchitektur

2013 n=6	2014 n=3	2015 n=12	2016 n=6	2017 n=6	Abkürzung	Merkmal
x	x	x	x		BN	Beerenzahl
		x	x		BW	Beerengewicht [g]
			x		CV	Traubenvolumen getaucht [ml]
x	x	x	x		CW	Traubengewicht
x		x	x		L1I	Länge des 1. Internodiums der Rachis [mm]
			x		L1L	Länge der 1.Lateral- Verzweigung
x		x	x		L2I	Länge des 2. Internodiums der Rachis
			x		L2L	Länge der 2.Lateral- Verzweigung
x			x		L3I	Länge des 3. Internodiums der Rachis
			x		L3L	Länge der 3.Lateral- Verzweigung
			x		L4L	Länge der 4.Lateral- Verzweigung
			x		L5L	Länge der 5. Lateral- Verzweigung
x		x	x		MBV	Einzel-Beerenvolumen
		x	x		OE	Mostgewicht °Oechsle
x		x	x	x	OIV204	OIV 204 Boniturnote
x	x	x	x		PED	Pedicelllänge
x	x	x	x		PL	Stiel- (Pedunkel) Länge
		x	x		RD	Rachisdurchmesser
x	x	x	x		RL	Rachislänge
		x	x		RW	Rachisgewicht
	x	x	x		SL	Schultertraubenlänge
x	x	x	x		TBVCB	Gesamt-Beerenvolumen visuell geprüft
			x		TBVD	Gesamt-Beerenvolumen getaucht
x			x		TLL	Gesamtlänge Lateral -Verzweigung

3.2.2 Molekulare und genetische Analysen

3.2.2.1 QTL-Analysen

Mit dem Material (A) wurden QTL (Quantitative Trait Locus) Analysen auf Basis der bestehenden genetischen Karte der Population GF.GA-47-42 x 'Villard blanc' (Zyprian et al. 2016) durchgeführt.

Mit dem Program MAP QTL 6.0 wurde ein Intervallmapping in 1cM Schritten durchgeführt. Der Kopplungsgruppenbezogene Permutationstest für den LOD Schwellenwert, ab dem die Existenz eines QTLs als signifikant angenommen wird, ist ebenfalls mit MAP QTL6 ermittelt worden (Signifikanzlevel von 0,05 mit 1000 Permutationen) (van Ooijen 2009).

3.2.2.2 Genexpressionsstudien

Mit (A), (B), (C) und (D) erfolgten Genexpressionsstudien von Kandidatengen-Amplicons nach RNA Extraktion und cDNA Synthese in Proben, welche zu Zeitpunkten mit differentiellem Streckungswachstum entnommen worden waren. Hierfür wurden auf Basis des Referenzgenoms für Reben (PN40024, Jaillon et al., 2007) Oligos mit einer Länge von 18-27 Nukleotiden und einer Schmelztemperatur von 58-62°C berechnet. Die Amplifikate sollten eine Größe von 50-150 Basenpaaren erreichen. Mit der Software CLC Genomics Workbench 7.9.1

(www.qiagenbioinformatics.com/), wurden die Primerpaare entwickelt und die Bindestellen im Referenzgenom auf Einzigartigkeit und Lage geprüft. Zur Bestimmung der relativen Transkriptabundanz wurde nach einer selektiven Voramplifikation von zehn Zyklen auf einem für Nanoliter-Volumen ausgelegten Thermalcycler (BioMark HD) die Genexpression der Kandidatengene und der internen Kontrollgene in weiteren 30 Zyklen ermittelt (Thermal Protokoll: GE 96*96 FAST v2). Die verwendeten BioMark 96.96 Dynamic Array Chips ermöglichen ein Experiment mit 96 cDNA Proben und 96 Primerpaaren die über eine Matrix von Kanälen 9216 abgetrennte Kammern als Reaktionsräume beschickten. Zur Auswertung der relativen Genexpression wurde die in das BioMark HD System integrierte Software und Serieneinstellung verwendet. (Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software 4.1.3)

3.2.2.3 RNA- und gDNA Sequenzierung (Next generation sequencing (NGS))

Für die RNA-Sequenzierung wurden Proben von WE-171, Gm-1-86, Frank Charisma und Frank Classic (Standort Siebeldingen) zu drei verschiedenen Entwicklungsstadien mit je zwei bis drei Wiederholungen genommen:

Stadium 1: Infloreszenzen aus ruhenden Knospen (September 2014 und 2015)

Stadium 2: Infloreszenzen aus BBCH7 Knospen (kurz vor Knospenbruch 2015)

Stadium 3: Rachisgewebe von Infloreszenzen des Stadiums BBCH57 (kurz vor Blühbeginn 2015).

Die RNA wurde mit dem Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma Aldrich) extrahiert. Für die DNA-Sequenzierung wurde Blattmaterial verwendet, die Extraktion erfolgte mit dem peqGOLD Plant DNA Mini Kit (Peqlab). Alle NGS-Sequenzierungen wurden am Max-Planck-Genomzentrum in Köln durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte hauptsächlich mit der Software CLC Genomics Workbench.

3.2.2.4 Klonierung und Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Für die Genkonstrukte wurde der *UBIQUITIN10* Promoter verwendet, basierend auf dem GreenGate Klonierungssystem (Lampropoulos et al., 2013). *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen wurden mittels der "Floral-Dip" Methode transformiert (Clough & Bent, 1998).

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopaufnahmen

Rasterelektronenmikroskopie wurde mit kritischpunktgetrocknetem Material durchgeführt. Die Länge von Pedicelepidermiszellen wurden mittels der ImageJ Software vermessen (Schneider et al., 2012).

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Längenzuwachs des Fruchtstandes

Am Institut für Rebenzüchtung **Geilweilerhof** wurde an lockeren bzw. kompakten 'Pinot Noir' Klonen (locker: We-M-171, Gm-1-86, Gm-20-13; kompakt: Frank Charisma, Frank Classic) das Längenzuwachstum der Infloreszenzen und -nach der Blüte- die Länge der Trauben bestimmt. An 16 basal inserierten Trauben pro 'Pinot Noir'-Klon wurde beginnend mit dem Entwicklungsstand BBCH13-14 (Mitte Mai) wöchentlich bis BBCH77 (Anfang August) gemessen. Die Messungen von 2015 und 2016 ergaben einen **signifikant schnelleren Längenzuwachs in den lockerbeerigen Klonen um den Zeitpunkt der Blüte (BBCH65)**. Dies ist ein wichtiger Befund: Das Zeitfenster mit differentieller Zuwachsdynamik zwischen lockeren und kompakten 'Pinot Noir' Klonen konnte im Anschluss gezielt für Genexpressions-Studien ausgewählt werden. Am Standort Siebeldingen wurden diese Messungen mit acht biologischen Wiederholungen auch an der Kreuzungspopulation aus GF.GA-47-42 und 'Villard blanc' vorgenommen. Der Längenzuwachs wurde an den zehn größten bzw. kleinsten Individuen der Population, bezogen auf die Rachislänge des jeweiligen Vorjahres (2014/2015), ermittelt. Hier zeigte sich 2016 wie schon 2015, dass die zehn Individuen mit den größten Rachislängen im Vergleich zu den zehn kleinsten kontinuierlich mehr Längenzuwachs pro Woche erreichen. **Somit bestätigte sich der zuvor beschriebene Befund differentiellen Wachstums an unabhängigem Pflanzenmaterial.**

4.2 Untersuchungen von Teilaspekten der Lockerbeerigkeit

Zum Zeitpunkt der Lesereife (BBCH89) wurden am **JKI** von 12 'Pinot Noir'-Klonen von den drei Standorten je 10 Trauben geerntet und auf Unterschiede in der Traubenarchitektur hin vermessen. Die Evaluierung von Untermerkmalen der Traubenarchitektur (vergl. Tabelle 1) ergab für acht Messgrößen einen signifikanten Unterschied zwischen den 12 'Pinot Noir'-Klonen. „Post hoc“ Tests bestätigen für die Merkmale **Rachislänge, Pedicellänge und Einzelbeeren volumen signifikante Unterschiede** zwischen lockeren und kompakten 'Pinot Noir'-Klonen. Dies gilt über drei Standorte und zwei Versuchsjahre hinweg.

Die 151 F1-Nachkommen aus der Kreuzung GF.GA-47-42 und 'Villard blanc' wurden verwendet, um die Untermerkmale der Traubenarchitektur in der segregierenden Population zu vermessen. Der OIV Deskriptor 204 für Fruchtstands-Dichte basiert auf optischer und haptischer Beurteilung der Beerenabstände bzw. deren Bewegungsfreiheit innerhalb der Traube und wurde ebenfalls bonitiert. Die Ergebnisse der vermessenen Untermerkmale der Traubenarchitektur und die Boniturwerte des OIV Deskriptors wurden anschließend zur Berechnung von QTLs genutzt.

4.3 Untersuchungen von Stielchenepidermiszellen

Wie in Punkt 4.2 gezeigt, besitzen lockerbeerige Spätburgunderklone signifikant längere Stielchen im Vergleich zu kompaktbeerigen Klonen. Um die Frage zu klären, ob dieser Längenzuwachs auf einer höheren Anzahl von Zellteilungen und/oder auf erhöhtem Zellstreckungswachstum beruht, wurde die Länge von Pedicelepidermiszellen anhand von Rasterelektronenmikroskopaufnahmen am **MPI Köln** gemessen. Die Zelllänge war bei allen untersuchten Klonen (WE-171, Gm-1-86, Frank Charisma und Frank Classic) gleich, jedoch hatten die Stielchen der lockerbeerigen Klone signifikant mehr Zellen im Vergleich zu kompakten Klonen, was auf eine **vermehrte Zellteilungsaktivität** hindeutet.

4.4 Phylogenetische Untersuchungen der Spätburgunderklone

Da wenig über die genetische Diversität der Spätburgunderklone bekannt ist, wurde zunächst eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Diese beruht auf 87 SNPs, die durch die Sequenzierung genomischer DNA aller vier Klone (WE-171, Gm-1-86, Frank Charisma und Frank Classic) am **MPI** gewonnen wurden. Diese zeigte, dass die kompakten Klone genetisch unterschiedlich zu den lockerbeerigen Klone sind, aber auch die lockerbeerigen Klone untereinander verschieden zueinander sind. Dies bestätigt, dass die **Klone aus unterschiedlichen klonalen Selektionsprozessen hervorgegangen sind**.

4.5 Identifizierung von Kandidatengenem mittels RNA-Seq und gDNA-Seq

Um genetische Unterschiede herauszufinden, die für den phänotypischen Unterschied zwischen kompakten und lockerbeerigen Spätburgunderklonen verantwortlich sind, wurden vergleichende RNA-Seq Analysen zu insgesamt drei Entwicklungsstadien am **MPI** durchgeführt (Abb. 1). Insgesamt waren 383 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert zwischen den locker- und kompaktbeerigen Klone ($\geq 1,5$ facher Unterschied, p -Wert $\leq 0,05$). Allerdings war unter diesen Kandidatengenem keines der bereits bekannten Verzweigungsregulatoren, welche zuvor als orthologe Gene im Weinreben genom identifiziert worden waren.

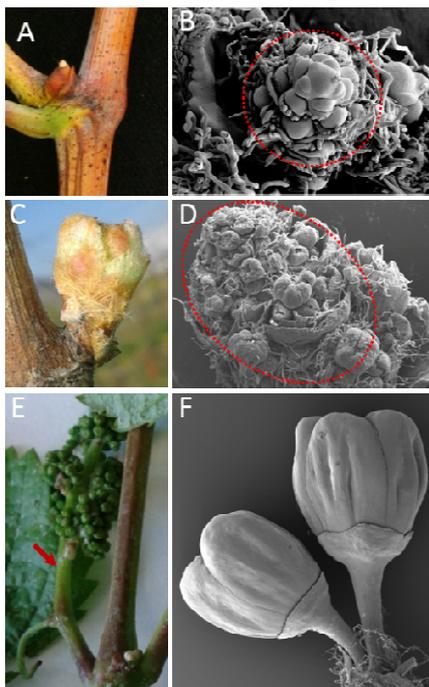


Abbildung 1: Drei Entwicklungsstadien von Spätburgunderinfloreszenzen, die für die RNA-Seq Analyse verwendet wurden. A) Ruhende Knospe im September. B) Rasterelektronenmikroskopaufnahme (REM) einer Stadium 1 Infloreszenz aus ruhenden Knospen (rot umrandet). C) Eine BBCH7 Knospe kurz vor Knospenbruch. D) REM Aufnahme einer Stadium 2 Infloreszenz aus einer BBCH7 Knospe (rot umrandet). E) Teil einer BBCH57 Infloreszenz kurz vor Blühbeginn. Der Pfeil deutet auf die Rachis, welche als Stadium 3 verwendet wurde. F) REM Aufnahme von zwei noch geschlossenen Blüten mit Stielchen zum Entwicklungsstadium BBCH57.

Daraufhin wurde genomische DNA aller vier Spätburgunderklone sequenziert, um Mutationen, spezifisch für lockerbeerige Klone, zu detektieren. Durch den Vergleich der Kandidatengenlisten aus RNA-Seq und gDNA-Seq, wurde ein einziges Gen identifiziert, das in beiden lockerbeerigen Klone jeweils einen heterozygoten SNP enthält und im Vergleich zu den kompakten Klone differentiell exprimiert ist (Abb. 2). Dieses Gen, welches für einen Wachstumsregulator kodiert, gehört zu einer Genfamilie, in der die meisten Gene einen wichtigen regulatorischen Bereich besitzen, der benötigt wird, um die Genexpression durch eine MikroRNA (miRNA) herunter zu regulieren. Es wurde gezeigt, dass zum Zeitpunkt der differentiellen Expression des Wachstumsregulators ebenfalls reife miRNA

sowohl in lockerbeerigen, als auch in kompakten Klonen vorhanden ist und dass das Transkript des Wachstumsregulatorgens potentiell durch die miRNA geschnitten werden kann. Die lockerbeerigen Klone zeigen mutierte Allele, bei welchen jeweils ein SNP in der miRNA-Bindestelle liegt. Ihre Transkripte können daher nicht mehr durch die miRNA herab-reguliert werden. Es wird daher vermutet, dass die erhöhte Genexpression in den lockerbeerigen Klonen durch die Störung dieses Regulationsmechanismus verursacht wird.

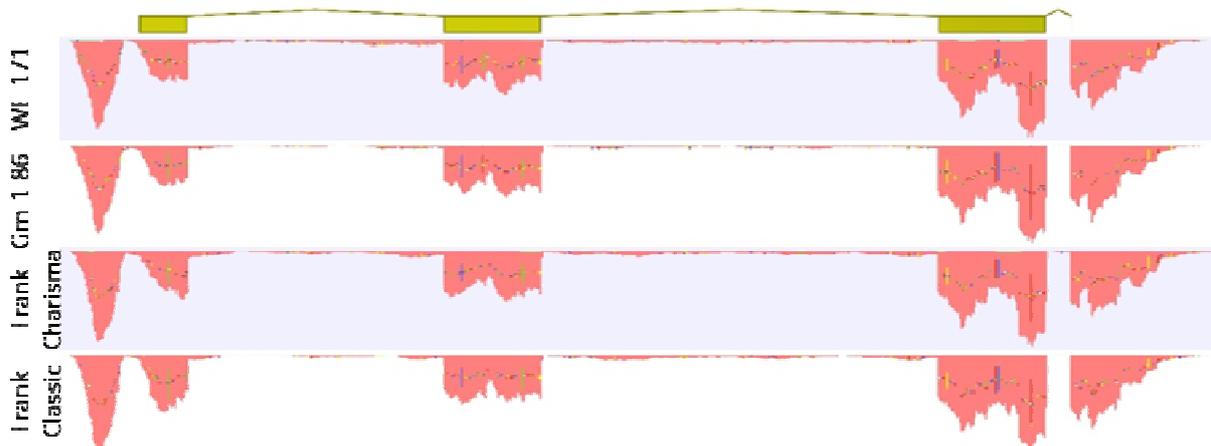


Abbildung 2: Mappingprofile (rosa) der vier Spätburgunderklone gegen die Kodierungssequenz eines Kandidatengenes (gelb). Mit Hilfe der Software CLC Genomics Workbench wurden die RNA-Seq reads gegen das annotierte Weinreben-genom (*Vitis_vinifera*.IGGP_12x.v23) kartiert, um differentielle Genexpression zu ermitteln. Vertikale, farbliche Linien innerhalb der Profile kennzeichnen heterozygote SNPs, die teils identisch, teils unterschiedlich zwischen den Klonen sind.

Um zu testen, ob eine erhöhte Expression des Wachstumsregulatorgens tatsächlich zu längeren Stielchen führt, wurde das Rebengen am **MPI** in *Arabidopsis thaliana* überexprimiert. In mehreren unabhängigen Linien konnte gezeigt werden, dass in transgenen Pflanzen, die das Wachstumsregulatorgen trugen, die Stielchen signifikant länger waren im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Der Effekt wurde noch verstärkt, indem eine mutierte Variante des Gens in *Arabidopsis thaliana* transformiert wurde. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die **erhöhte Genexpression des Wachstumsregulatorgens, bedingt durch eine mutierte Mikro-RNA-Bindestelle, für den Phänotyp der beiden lockerbeerigen Spätburgunderklone verantwortlich ist**. Desweiteren wurde die miRNA Bindestelle des Wachstumregulators in 13 weiteren, lockerbeerigen Rebsorten (Tafeltrauben und Referenzsorten) sequenziert, wobei jedoch keine SNPs gefunden wurden.

4.6 Weiterführende Genexpressionsanalysen:

Aus den durch RNA-Sequenzierung ermittelten 383 differentiel exprimierten Genen (MPI, Köln), wurden 31 Kandidatengene (KG) anhand ihrer Funktion sowie der Höhe des Expressionsunterschiedes ausgewählt. Weitere 15 KG sind mit Traubenarchitektur assoziiert (aus Kooperation mit J.Ibanez, ICVV Logrono, Spanien, unveröffentlicht). Diese 46 KG wurden mittels Hochdurchsatz RT-qPCR am **JKI** in neun lockeren und kompakten 'Pinot Noir' Klonen bezüglich ihrer Genexpression geprüft. Hierfür wurden Rachisproben der Klone von drei Standorten zu acht Stadien der Traubenentwicklung aus dem Jahr 2015 verwendet. Die Auswertung der Genexpression zeigt einen „fold change“ von >5 für 20 der 46 Kandidatengene wenn man einzelne lockere und kompakte 'Pinot Noir'-Klone an einzelnen Standorten zu bestimmten Entwicklungsstadien vergleicht. Sechs der Kandidatengene zeigen auch im Gruppenvergleich (locker gegen kompakt) einen fünffachen

Expressionsunterschied an jeweils einem Standort. Zwei Gene auf den Chromosomen 2 und 16 zeigen einen „fold change“ von >5 im Gruppenvergleich eines Zeitpunktes und darüber hinaus an allen Standorten für Proben aus dem Jahr 2015.

Die Datenbankabfrage zeigte für eines dieser beiden Gene einen Hinweis auf ein Peptid, welches den polaren **Kurzstreckentransport von Auxin** durch Interaktion mit Auxin-Efflux-Carriern steuert. Das andere kodiert einen **Wachstumsfaktor der in Zellstreckung und Zellteilung** involviert ist.

In einem Tastversuch wurden ‘Pinot Noir’ Proben aus 2016 für die Wiederholung des Genexpressionsversuchs mit diesen beiden Genen verwendet. Es wurde wiederum der Zeitraum mit differentieller Wachstumsdynamik zwischen lockeren und kompakten ‘Pinot Noir’-Klonen für RT-qPCR Studien analysiert. Das Expressionsmuster beider Gene konnte reproduziert werden. Jedoch zeigte lediglich der **Wachstumsfaktor** differentielle Transkriptredundanz in allen lockeren Klonen im Vergleich mit kompakten ‘Pinot Noir’ Klonen über alle Standorte hinweg.

4.7 Ergebnisse der QTL Analyse in der Population GF.GA-47-42 x ‘Villard blanc’

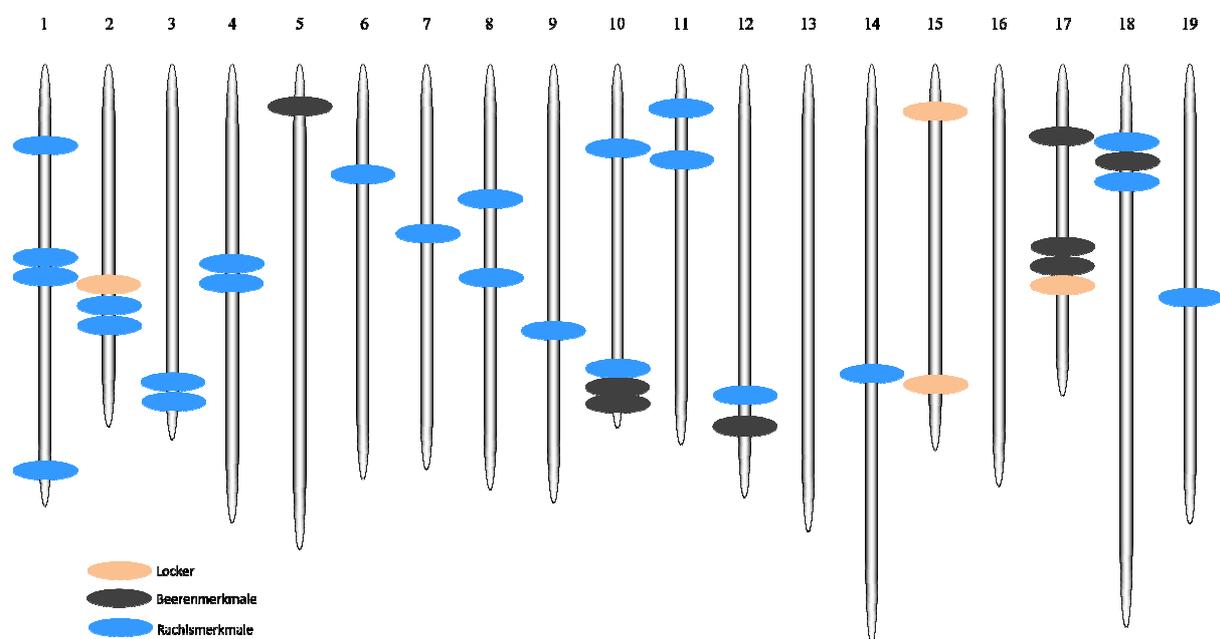


Abbildung 3 Position der QTLs für Untermerkmale der Traubenarchitektur auf den 19 Kopplungsgruppen der genetischen Karte aus der Kreuzungspopulation GF.GA-47-42 x ‘Villard blanc’. Untermerkmale der Rachis sind in blau dargestellt, Beerenmerkmale in grau und Lockerbeeren nach dem OIV Deskriptor 204 in orange.

Die Kopplungskarte aus der Population GF.GA-47-42 x ‘Villard blanc’ wurde am **JKI** genutzt, um QTL Berechnungen mit den ampelometrischen Bonituren (vergl. Tabelle 1) aus den Jahren 2015 bis 2016 durchzuführen. Auch Messwerte der Traubenarchitektur aus den Voruntersuchungen von 2013 und 2014 wurden zur QTL Berechnung eingesetzt. Insgesamt zeigten sich 36 QTLs, die über mindestens zwei Jahre signifikant waren. **Über drei bzw. vier Jahre** konnten **QTLs** für die Parameter **Rachislänge, Pedicelllänge, Stiellänge** und für die Lockerbeeren nach dem **OIV Deskriptor 204** reproduziert werden. Diese liegen auf den Chromosomen 1, 2, 7, 8, 11, 14, 17 und 18. Für Unterparameter, die die Eigenschaften von Beeren beschreiben, waren QTLs auf den Chromosomen 5, 10, 12, 17 und 18 über mindestens zwei Jahre aufzufinden. Weiterhin wurden über zwei Jahre QTLs für Untermerkmale des Stielgerüsts auf den Chromosomen 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 18 und 19 identifiziert. Häufig trat eine „Clusterung“ der QTL-Bereiche auf, d.h. mehrere QTLs für Untermerkmale der Traubenarchitektur

liegen nah beieinander in ähnlichen chromosomalen Positionen (Abb. 3). Die Verrechnung der Boniturdaten des Deskriptors OIV 204 aus dem Jahr 2015 ergab einen QTL auf Chromosom 2 welcher 29% der phänotypischen Varianz erklärt.

Die molekularen Marker, welche die Konfidenzintervalle der QTLs flankieren, wurden aus der genetischen Karte ermittelt. Der DNA-Sequenzabgleich dieser Marker mit dem Referenzgenom für die Rebe (PN40024, Jaillon et al., 2007) projiziert die Lage der QTLs für Lockerbeerigkeit auf ihre physikalische Position im Referenzgenom. Innerhalb der so markierten Bereiche liegen 7206 Gene.

4.8 Integrierte differentielle Genexpression

Weiterhin wurden 7206 Gene, die durch Projektion der 36 QTL- Konfidenzintervalle auf das Referenzgenom ermittelt wurden, mit den 383 differentiel exprimierten Genen aus dem RNA-Seq Versuch abgeglichen. 90 Gene erscheinen damit sowohl im positionellen als auch im funktionellen Versuchsansatz mit Lockerbeerigkeit assoziiert und wurden als neue Kandidatengen eingestuft. Die „heat Map“ Darstellung der Amplifikation der Kandidatengene in lockeren und kompakten 'Pinot Noir' Klonen zeigt, dass sechs der neuen Kandidatengene induziert sind und fünf reprimiert werden.

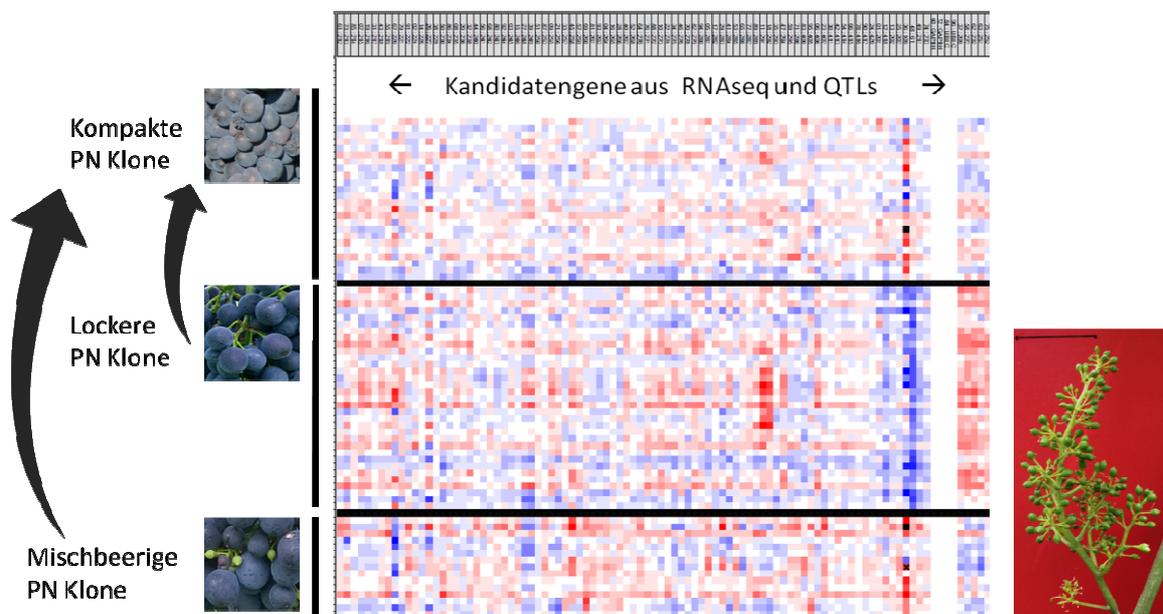


Abbildung 4 „Heat map“ der relativen Expression (als $\Delta\Delta C_t$ Werte) von Kandidatengenen aus lockeren und kompakten 'Pinot Noir' Klonen zum BBCH Stadium 71 (Schrotkorngröße der Beeren). Vertikal aufgetragen sind 90 Kandidatengene, die in RNA-Seq differentiel exprimiert sind, und zugleich in den Konfidenzintervallen der QTL -Berechnung liegen. Horizontal als Gruppe aufgetragen sind mischbeerige (unten), lockerbeerige (mittig) und kompakte Klone (oben) die in den Jahren 2015, 2016 und 2017 beprobt wurden. Ein Farbgradient zwischen den Gruppen dient als Indikator für stabile differentielle Expression (rechter Bereich)

5. Diskussion der Ergebnisse

Die Messung der wöchentlichen Längenzuwächse des Fruchtstandes bei lockeren und kompakten 'Pinot Noir'-Klonen, sowie bei ausgesuchten F1-Genotypen der für Traubenarchitektur aufspaltenden Population, als auch der laut Deskriptor OIV204 beschriebenen Referenzsorten für lockere und kompakte Traubenarchitektur zeigt, dass die größte Wachstumsdynamik in den ersten Wochen nach sichtbar werden der Infloreszenzen auftritt und bis nach der Blüte anhält. Der Vergleich zeigte, dass die Pedicelstreckung die zum Abspreizen der Einzelblüten führt, ebenfalls in dieses Zeitfenster fällt. Diese Beobachtung wurde ähnlich auch von Coombe (1995) und Shavrukov et al. (2003) beschrieben. Der Zeitpunkt um die Blüte erwies sich damit als geeignete Entwicklungsphase zur Probenentnahme, um über die Transkriptomanalyse und differentielle Genexpressionsuntersuchungen genetische Determinanten für Faktoren der Traubenarchitektur zu untersuchen.

Die differentielle Wachstumsdynamik in den zehn Infloreszenz-längsten bzw. -kürzesten F1-Genotypen der segregierenden Population führte durch die größere Zunahme in den lockeren Genotypen zu einem **kontinuierlichen Auseinanderdriften der durchschnittlichen Rachislänge bei lockeren und kompakten Pflanzen**. Auch Shavrukov et al. (2003) berichtete, dass in kompakten 'Riesling'- und 'Chardonnay' – Trauben im Vergleich mit den lockerbeerigen Tafeltrauben 'Sultana' und 'Exotic' bereits vor der Blüte Längenunterschiede ausgebildet wurden.

Das differentielle Wachstumsmuster wurde bei 'Pinot Noir'-Klonen in zwei aufeinander folgenden Jahren beobachtet. Die Transkriptomanalyse und Genexpressionsstudien bestätigten in den Jahren 2015 und 2016 einen differentiell regulierten Wachstumsregulator in lockeren und kompakten 'Pinot Noir'-Klonen über drei unterschiedliche Standorte (Weinbaugebiete) hinweg. In lockeren Klonen ist die Expression des Gens fünffach höher als in den kompakten. In *Arabidopsis* werden Gene aus dieser Genfamilie durch das Expressionsniveau einer miRNA gesteuert (Fouracre und Poethig 2016). Es konnte gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der differentiellen Expression des Wachstumsregulatorgens die reife miRNA in der Weinrebe ebenfalls vorhanden ist und dass das Weinrebengewebe durch die miRNA reguliert werden kann. Die erhöhte Expression in den lockerbeerigen Klonen konnte durch zwei SNPs erklärt werden, die beide in dem regulatorischen Bereich liegen, an den normalerweise eine miRNA bindet, um das Gen herunter zu regulieren. Die Repression des Wachstumsregulators durch Interaktion mit der miRNA resultiert in einem Stopp der Mitose bzw. dem Verharren der Zelle in der Interphase der Mitose (Fouracre and Poethig 2016). Eine unterbleibende Interaktion von miRNA und dem Wachstumsregulatorgen könnte zu erhöhter Zellteilung in lockerbeerigen 'Pinot Noir'-Klonen führen. Tatsächlich konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie gezeigt werden, dass in lockerbeerigen Klonen eine signifikant höhere Anzahl Epidermiszellen vorhanden ist. Auf phänotypischer Ebene führt dies zu einem längeren Pedicelwachstum, einem der Faktoren, der für die Entwicklung einer lockeren Traubenarchitektur mitverantwortlich ist. Dass eine erhöhte Aktivität des Wachstumsregulatorgens tatsächlich für den Phänotyp verantwortlich ist, konnte in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, in der eine Überexpression des Wachstumsregulatorgens zu längeren Stielchen geführt hat.

Traubenarchitektur ist ein sehr komplexes Merkmal, welches durch die Interaktion verschiedener Parameter entsteht. Diese Parameter betreffen sowohl die Architektur des Stielgerüsts als auch die Beerenmorphologie und können von Sorte zu Sorte sehr unterschiedlich sein. Interessanterweise waren jeweils die gleichen Faktoren, nämlich Rachislänge, Pedicellänge und Beerengröße, für den lockerbeerigen Phänotyp beider molekular untersuchten Spätburgunderklone verantwortlich. Dies ist

umso erstaunlicher, da beide lockerbeerigen Klone aus unterschiedlichen klonalen Selektionsereignissen hervorgegangen sind und genetisch unterschiedlich sind, wie die phylogenetische Analyse gezeigt hat. Diese genetische Diversität erklärt, warum zwei unterschiedliche SNPs identifiziert wurden. Interessanterweise liegen jedoch beide Mutationen in einem wichtigen regulatorischen Bereich, der für die Bindung einer miRNA benötigt wird. Dadurch wird der Regulationsmechanismus gestört, was am Ende in beiden Fällen zu längeren Stielchen führt. Eine Missregulation des Wachstumsregulators könnte daher einen generellen Mechanismus darstellen, der auch in anderen Rebsorten zu Lockerbeerigkeit führt. Die Sequenzierung des regulatorischen Bereichs von 13 weiteren lockerbeerigen Rebsorten hat allerdings keine weiteren Mutationen aufgezeigt. Jedoch ist für diese Sorten auch nicht bekannt, welche Parameter für den lockerbeerigen Phänotyp verantwortlich sind. Weiterhin könnten homologe Gene des Wachstumsregulators oder andere Gene innerhalb desselben Regulationswegs verändert sein und letztendlich für die lockere Traubenarchitektur verantwortlich sein.

Durch die mehrjährige Vermessung der Traubenarchitekturparameter bei 'Pinot Noir' konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Merkmale Rachislänge, Pedicelllänge und Einzelbeeren volumen die maßgeblichen phänotypischen Unterschiede zwischen lockeren und kompakten 'Pinot Noir' Klonen darstellen. In einer anderen Studie, die Keltertraubensorten mit Tafeltrauben verglich, beruhte der phänotypische Unterschied zwischen den kompaktbeerigen Keltertraubensorten und den lockerbeerigen Tafeltrauben wesentlich auf der Länge der Rachisinternodien (Shavrukov et al. 2003). Interessanterweise wurde in diesem Fall nachgewiesen, dass die stärkere Elongation der Rachiszellen verantwortlich ist und nicht die höhere Anzahl gleich großer Zellen wie bei den 'Pinot Noir'-Pedicelzellen, wie hier im Projekt gezeigt. Dies deutet darauf hin, dass in Abhängigkeit des Genotyps und des Organs verschiedene zelluläre Mechanismen für die phänotypischen Unterschiede verantwortlich sein können. Dies bedeutet, dass u. U. additiv wirkende Mechanismen zusammengebracht zu besonders lockeren Traubenformen führen könnten.

Die hier für die **QTL Analyse** verwendete Kreuzungspopulation mit 151 F1-Individuen wurde bereits erfolgreich für die Berechnung von positionellen Kandidatengenomen für Pathogenresistenz (Zyprian et al. 2016) und den Termin des Blühzeitpunktes (Fechter et al. 2014) verwendet. Die Phänotypisierung der Population zeigte auch hohe Variation für die Merkmale der Traubenarchitektur. Die Tatsache, dass 36 QTLs für Traubenarchitekturmerkmale auf 17 Kopplungsgruppen ermittelt werden können, deutet auf eine hohe Komplexität des Merkmals hin. Die LOD-Werte liegen in einem Bereich zwischen 2,64 (berechnet für die Länge der Nebentraube) und 11,07 (für die Lockerbeerigkeit nach OIV204). Der durchschnittliche LOD-Wert liegt bei 4,65. QTL Berechnungen für Untermerkmale der Traubenarchitektur in einer Tafeltraubenkreuzung (Correa et al. 2014) zeigten vergleichbare LOD-Werte mit einem durchschnittlichen LOD-Wert von 5,2. Auch die Anzahl der dort gefundenen 19 QTLs für 23 untersuchte Faktoren ist vergleichbar und deutet ebenfalls eine komplexe genetische Determination der Lockerbeerigkeit an.

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Untersuchungen in diesem Projekt haben gezeigt, dass viele genetische Faktoren, welche verteilt auf den Chromosomen der Weinrebe liegen, die Lockerbeerigkeit beeinflussen. Es handelt sich damit um ein komplexes Merkmal. Eine direkte Nutzung in der Marker-gestützten Züchtung scheint derzeit schwierig, da zugleich genetische Elemente aus vielen Chromosomen in ihrer Einkreuzung verfolgt werden müssten, was zu einem erheblichen Aufwand führt. Zudem ist die Übertragbarkeit der Korrelationen auf genetische Ressourcen außerhalb der untersuchten segregierenden Population noch nicht geprüft. Bei der QTL Analyse der Untermerkmale der Traubenarchitektur zeigte sich jedoch auch eine deutliche „Clustering“ einiger Sub-Merkmale in verschiedenen chromosomalen Regionen (vergl. Abb. 3). Die dort jeweils flankierenden molekularen Marker sind durch die verwendete genetische Karte bereits definiert. Bevor diese neue Information zur züchterischen Anwendung kommen kann, sollte versucht werden, aus der Vielzahl die wichtigsten genetischen Faktoren herauszuarbeiten. Dieser Ansatz wird momentan mit Hilfe statistischer multivariater Verfahren verfolgt. Es ist geplant, die Resultate zeitnah in einer wissenschaftlichen Publikation den Fachkollegen zugänglich zu machen. Die neu gewonnenen molekularen Marker sind alsdann auf die Übertragbarkeit ihrer genetischen Kopplung mit der Lockerbeerigkeit außerhalb der experimentell genutzten segregierenden Population zu prüfen. Durch die Arbeiten in diesem Projekt steht dazu gut charakterisiertes Pflanzenmaterial zur Verfügung. Darüber hinaus kann die umfangreiche Rebsortensammlung am JKI Geilweilerhof für solche weiterführenden Untersuchungen genutzt werden.

Die Genexpressionsanalyse der Spätburgunderklone und der bezüglich der Lockerbeerigkeit extremen Genotypen der segregierenden Kreuzungspopulation hat nur wenige entscheidende Kandidatengene gezeigt, die zum Zeitpunkt der unterschiedlichen Entwicklung des Fruchtstands reproduzierbar differentiell aktiv sind. Diese Gene sind im Folgenden an umfangreicherem Pflanzenmaterial mit lockerem/kompaktem Phänotyp der Traubenarchitektur auf ihre Aktivität und Diversität zu prüfen. Der Befund eines Polymorphismus in der Bindestelle einer regulativen miRNA in einem der beiden Wachstumsregulatorgene bei den Spätburgunder-Klonen ermöglicht die Überprüfung dieses Polymorphismus und seiner Korrelation mit dem Merkmal der Lockerbeerigkeit in anderen lockeren Rebsorten. Allerdings wurde er in bisher 13 re-sequenzierten Varianten aus lockerbeerigen Genotypen nicht wiedergefunden. Eventuell homologe Gene in der Rebe und ihr physiologisches Wirkungsfeld sind in künftigen Studien zu untersuchen.

In diesem Projekt wurden wichtige phänotypische Kriterien und genetische Grundlagen zu dem komplexen Merkmal der Lockerbeerigkeit erarbeitet. Durch umfangreiche phänotypische Charakterisierung an neuem Pflanzenmaterial konnte gezeigt werden, dass die Faktoren Rachislänge, Pedicelllänge und Beerengröße die Traubenarchitektur bestimmen. Genetische Determinanten dafür konnten in der Karte aus einer segregierenden Population in QTL Analysen lokalisiert werden. Bei den Spätburgunderklonen und den extrem lockeren Genotypen aus der Traubenarchitektur-spaltenden Kreuzungspopulation führt ein differentielles Wachstum der Infloreszenzen in einer definierten Entwicklungsphase zur Ausprägung des gewünschten Merkmals der Lockerbeerigkeit. Speziell bei den Spätburgunderklonen konnten molekulare Mechanismen aufgeklärt werden, die zur Lockerbeerigkeit signifikant beitragen.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Zu AP1 Phänotypische Charakterisierung:

Die Traubenarchitektur wurde durch Vermessung vieler Untermerkmale (vergl. Tabelle 1) in den Spätburgunderklonen, den Referenzsorten nach OIV, den extremen Phänotypen in der 'Cardinal'-Familie und in der segregierenden Population detailliert beschrieben.

Zu AP2 Identifizierung und Charakterisierung von orthologen Genen zu bekannten Verzweigungsregulatoren aus Modellorganismen in der Rebe:

Orthologe Gene zu den bekannten Verzweigungsregulatoren aus Modellorganismen konnten in der Rebe identifiziert werden. Diese zeigten allerdings später in der RNA-Seq Analyse keine differentielle Expression. Daher wurden durch Untersuchungen zur Diversität der genomischen DNA von lockeren/kompakten Spätburgunderklonen sowie durch umfangreiche Transkriptomanalysen weitere Kandidatengene der Lockerbeerigkeit in der Weinrebe identifiziert.

Zu AP3 Differentielle Genexpressionsanalyse zur Identifikation von Kandidatengen der Lockerbeerigkeit:

Differentielle Genexpressionsstudien wurden durch die RNA-Seq Analyse an den Spätburgunderklonen sowie durch gezielte Untersuchungen zur differentiellen Expression einzelner Kandidatengene Standort-übergreifend an Spätburgunderklonen über mehrere Jahre, sowie an den extremen Genotypen aus der segregierenden Kreuzungspopulation, umfangreich durchgeführt. Aus den verschiedenen Ansätzen sind im Wesentlichen zwei wichtige Kandidatengene hervorgegangen, wobei es sich in beiden Fällen um Transkriptionsfaktorgene handelt, die Prozesse des Wachstums steuern.

Zu AP4 QTL Analyse von Merkmalen der Lockerbeerigkeit in der Population Gf.GA-47-42 x 'Villard blanc':

Die QTL Analyse von Untermerkmalen der Lockerbeerigkeit hat 36 über mindestens zwei Jahre identifizierte QTL ergeben, die in Clustern auf den Chromosomen der Weinrebe verteilt sind (vergl. Abb. 1). Derzeit versuchen wir, mit Hilfe weiterer statistischer Verfahren aus der Vielzahl von QTL-tragenden Regionen die wichtigsten herauszufiltern, um die Information über flankierende Marker für die Rebenzüchtung nutzbar zu machen.

Zu AP5 Validierung von Kandidatengen der Lockerbeerigkeit bezüglich ihrer Genexpression:

Aus der integrierten Genexpressionsanalyse unter Beachtung der sowohl bei den RNA-Seq Daten, als auch bei der positionellen Lokalisierung durch QTL-Studien indizierten betroffenen Gene wurden noch einmal neun Kandidatengene identifiziert, welche die Lockerbeerigkeit zu beeinflussen scheinen.

Zu AP6 Gendiversitätsstudien von Kandidatengen und Markerentwicklung:

Gendiversitätsstudien wurden, wie oben erwähnt, bezüglich der Spätburgunderklone durch genomische Sequenzierungen durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten bei den lockerbeerigen Genotypen Mutationen im regulatorischen Bereich eines Transkriptionsfaktorgens, welcher nach der

RNA-Seq Analyse wesentlich an der Ausbildung der Lockerbeerigkeit beteiligt ist. Es handelt sich hierbei um die Bindestelle für eine regulatorische miRNA, deren Funktion durch die veränderte Sequenz im Bindungsort gestört ist. Somit wird das Gen des Transkriptionsfaktors miss-reguliert und ist vermutlich länger aktiv, was zu einem vermehrten Wachstum in der entscheidenden frühen Phase der Fruchtstandsentwicklung führt. Dadurch entstehen längere Rachisachsen und Beerensielchen, die das Traubengerüst auflockern. Das Auftreten dieser Mutationen an weiterem lockerbeerigen Material anderer genetischer Herkunft bleibt zu prüfen.

8. Zusammenfassung

In diesem Projekt wurden wichtige phänotypische Kriterien und genetische Grundlagen zu dem komplexen Merkmal der Lockerbeerigkeit erarbeitet. Durch umfangreiche phänotypische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die Faktoren Rachislänge, Pedicelllänge und Beerengröße die Traubenarchitektur bestimmen. Genetische Determinanten dafür konnten in der Karte aus einer segregierenden Population in QTL Analysen lokalisiert werden. Bei den Spätburgunderklonen und den extrem lockeren Genotypen aus der Traubenarchitektur- spaltenden Kreuzungspopulation führt ein differentielles Wachstum der Infloreszenzen in einer definierten Entwicklungsphase zur Ausprägung des gewünschten Merkmals der Lockerbeerigkeit. Speziell bei den Spätburgunderklonen konnten Hinweise auf molekulare Mechanismen gefunden werden, die zur Lockerbeerigkeit signifikant beitragen. Mehrere weitere Kandidatengene zur Steuerung der Traubenarchitektur wurden identifiziert.

9. Literaturverzeichnis

- Broome JC, English JT, Marois JJ, Latorre BA, Aviles JC (1995) Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. *Phytopathology* 85 (1):97-102. doi:10.1094/Phyto-85-97
- Ciliberti N, Fermaud M, Languasco L, Rossi V (2015) Influence of Fungal Strain, Temperature, and Wetness Duration on Infection of Grapevine Inflorescences and Young Berry Clusters by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 105 (3):325-333. doi:10.1094/phyto-05-14-0152-r
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16 (6):735-743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Commenil P, Belingheri L, Bauw G, Dehorter B (1999) Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 (1):37-43. doi:https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0206
- Coombe BG (1995) Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1 (2):104-110. doi:10.1111/j.1755-0238.1995.tb00086.x
- Correa J, Mamani M, Munoz-Espinoza C, Laborie D, Munoz C, Pinto M, Hinrichsen P (2014) Heritability and identification of QTLs and underlying candidate genes associated with the architecture of the grapevine cluster (*Vitis vinifera* L.). *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 127 (5):1143-1162. doi:10.1007/s00122-014-2286-y
- Derckel JP, Baillieul F, Manteau S, Audran JC, Haye B, Lambert B, Legendre L (1999) Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89 (3):197-203. doi:10.1094/phyto.1999.89.3.197
- Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, Daum M, Holtgrawe D, Weisshaar B, Topfer R (2014) QTL analysis of flowering time and ripening traits suggests an impact of a genomic region on linkage group 1 in *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 127 (9):1857-1872. doi:DOI 10.1007/s00122-014-2310-2
- Fernandez L, Torregrosa L, Segura V, Bouquet A, Martinez-Zapater JM (2010) Transposon-induced gene activation as a mechanism generating cluster shape somatic variation in grapevine. *The Plant journal for cell and molecular biology* 61 (4):545-557. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04090.x
- Fouracre JP, Poethig RS (2016) The role of small RNAs in vegetative shoot development. *Current Opinion in Plant Biology* 29:64-72
- Jaillon O, Aury JM, 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, Mordinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P, Public F-I (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-U465
- Kicherer A, Roscher R, Herzog K, Šimon S, Förstner W, Töpfer R (2013) BAT (Berry Analysis Tool): A high-throughput image interpretation tool to acquire the number, diameter, and volume of grapevine berries. *Vitis* 52 (3):129-135
- Kretschmer M, Hahn M (2008) Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115 (5):214-219
- Kretschmer M, Kassemeyer HH, Hahn M (2007) Age-dependent grey mould susceptibility and tissue-specific defence gene activation of grapevine berry skins after infection by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 155 (5):258-263. doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01216.x

- Lampropoulos A, Sutikovic Z, Wenzl C, Maegele I, Lohmann JU, Forner J (2013) GreenGate - A Novel, Versatile and Efficient Cloning System for Plant Transgenesis. PLoS ONE 8(12): e83043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083043>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods 9 (7):671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Shavrukov YN, Dry IB, Thomas MR (2004) Inflorescence and bunch architecture development in *Vitis vinifera* L. Australian Journal of Grape and Wine Research 10 (2):116-124. doi:10.1111/j.1755-0238.2004.tb00014.x
- Topolovec-Pintaric S (2009) Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in winegrowing areas in Croatia. Journal of Plant Diseases and Protection 116 (2):73-77
- Vail ME, Marois JJ (1991) Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. Phytopathology 81 (2):188-191. doi:10.1094/Phyto-81-188
- Van Ooijen JW, MapQTL 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma BV; Wageningen, Netherlands: 2009
- Williamson B, Tudzynsk B, Tudzynski P, van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8 (5):561-580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x
- Zyprian E, Ochssner I, Schwander F, Simon S, Hausmann L, Bonow-Rex M, Moreno-Sanz P, Grando MS, Wiedemann-Merdinoglu S, Merdinoglu D, Eibach R, Töpfer R (2016) Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines. Molecular Genetics and Genomics 291 (4):1573-1594. doi:10.1007/s00438-016-1200-5

10. Übersicht zu Veröffentlichungen, realisiert und geplant

a) Referierte Publikationen in Fachzeitschriften

Geplant:

Richter, Rossmann, Töpfer, Theres, Zyprian:

Dissection of bunch phenotypes into sub traits enables QTL detection and MAS of genomic regions influencing cluster architecture (in preparation)

Rossmann, Richter, Sun, Schneeberger, Töpfer, Zyprian, Theres:

A mutated growth-regulating factor causes a loose cluster architecture in grapevine (in preparation)

Richter, Rossmann, Töpfer, Theres, Zyprian:

Differential gene expression studies on the architecture of grapevine bunches

b) Nicht-referierte Publikationen

Conference Paper published online 04 July 2017

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² and Eva Zyprian¹

Genetic analysis of loose cluster architecture in grapevine

BIO Web of Conferences 9, 01016 (2017)

c) Poster

Poster 9.11.2016

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² and Eva Zyprian¹

Phenotypic and molecular analysis of grapevine cluster architecture suggests influence of transcription factor GRF6 on the compactness level of 'Pinot Noir' clones

Young scientists meeting 2016, Quedlinburg

Poster 23.-26.02.2016

Rossmann, Richter, Töpfer, Zyprian, Theres

Transcriptome analysis leads to the identification of candidate genes regulating cluster architecture in grapevine

29. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

d) Vorträge

Vortrag 29.08.2017

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹

Molekulare Analyse der Traubenarchitektur MATA

Tagung der AG 19 Obst, Gehölze, Reben der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (GPZ), Siebeldingen

Vortrag 01.06.2017

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹

Genetic Analysis of Loose Cluster Architecture in Grapevine

OIV 40th World Congress of Vine and Wine 29.5.-02.06.2017, Sofia, Bulgarien

Vortrag 25.04.2017

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
Molekulare und phänotypische Untersuchung der Lockerbeerigkeit bei Reben
FDW Tagung 2017, Geisenheim

Vortrag 30.01.2017

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
Comparative studies of bunch architecture in grapevine varieties and 'Pinot Noir' clones
Plant Breeding Seminar Universität Gießen, Gießen

Vortrag 14.04.2016

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
Untersuchungen zur Lockerbeerigkeit der Rebe, einem Faktor der physikalischen *Botrytis* Festigkeit
FDW Tagung 2016, Bad Kreuznach

Vortrag 23.02.2016

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
Phenotypic and molecular analysis of grapevine cluster architecture
29th conference on molecular biology of plants, Dabringhausen

Vortrag 20.10.2015

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
Analysis of bunch architecture in grapevine
Nachwuchswissenschaftler Forum 2015, Quedlinburg

Vortrag 14.10.2015

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
Analysis of bunch architecture in grapevine
Plant Breeding Seminar Universität Gießen, Gießen

Vortrag 28.04.2015

Robert Richter¹, Susanne Rossmann², Reinhard Töpfer¹, Klaus Theres² und Eva Zyprian¹
MATA-Molekulare Analyse der Traubenarchitektur
FDW Tagung 2015, Oppenheim

¹ Julius Kühn-Institut (JKI) Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

² Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Abteilung Pflanzenzüchtung und Genetik, Köln