

Genetische Analyse des Merkmals Lockerbeerigkeit

Robert RICHTER¹⁾, Susanne ROSSMANN²⁾, Reinhard TÖPFER¹⁾, Klaus THERES²⁾
und Eva ZYPRIAN¹⁾

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

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

Lockerbeerigkeit beeinflusst den phytosanitären Zustand von Trauben positiv. Der erhöhte Abstand zwischen den einzelnen Beeren reduziert die mechanische Beanspruchung der Cuticula. Ein gegenseitiges Abdrücken der Beeren wird verhindert. Die Entstehung von Feuchtigkeits-induzierten Mikrorissen in der Epidermis der Beeren unterbleibt. Die Lockerbeerigkeit erlaubt einen höheren Luftaustausch und somit ein zügigeres Abtrocknen der Trauben nach Niederschlägen. Damit wird eine erhöhte physikalische Barriere gegenüber Feuchtigkeits-affinen Schaderregern wie *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*) etabliert. Durch eine aufgelockerte Traubenarchitektur wird zudem die Applikation von Wirkstoffen in das Innere des Fruchtstands erleichtert.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, die genetischen Ursachen für den lockerbeerigen Phänotyp zu ermitteln. Hierfür werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt (Abb. 1).

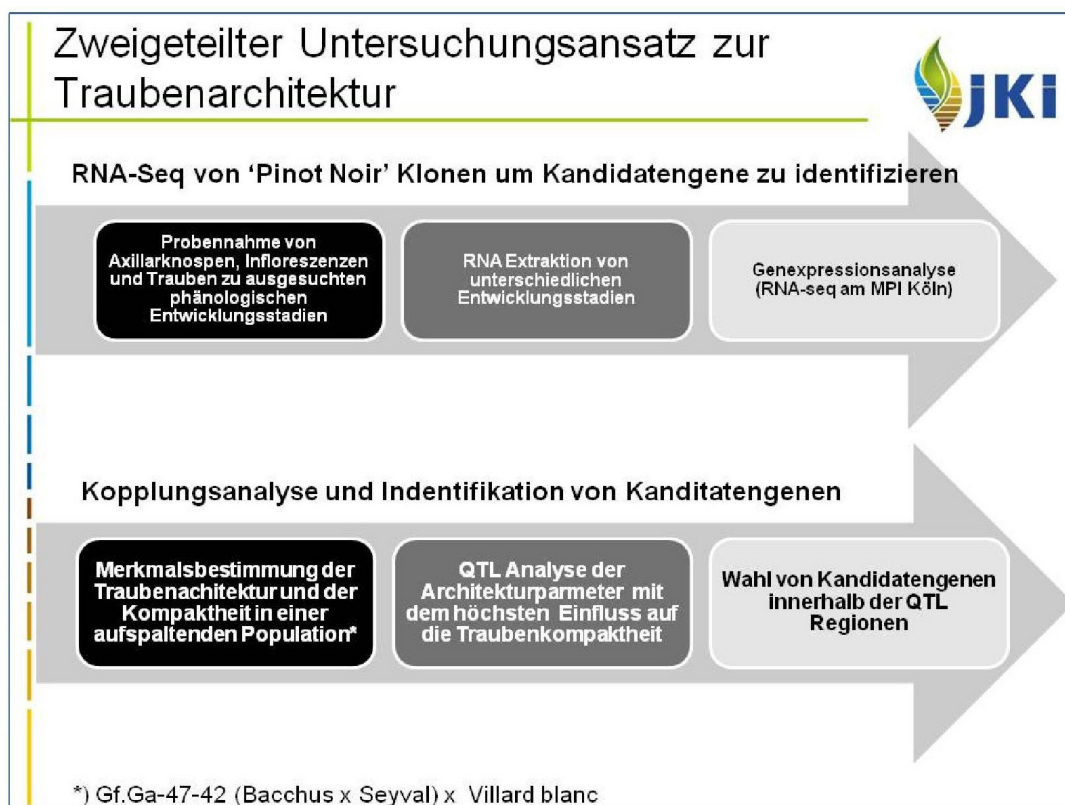


Abb.1: Untersuchungsansätze zur Ermittlung genetischer Einflussfaktoren auf die Traubenarchitektur.

Kopplungsanalyse

Die bezüglich des Merkmals Lockerbeerigkeit segregierende Kreuzungspopulation aus der Kreuzung von GF.GA.47-42 x VILLARD BLANC (Abb. 2) ist mit molekularen Markern kartiert. Seit 2013 wurden nun verschiedene Untermerkmale der Traubenarchitektur phänotypisch charakterisiert und zur Berechnung von QTLs in der spaltenden Population verwendet.

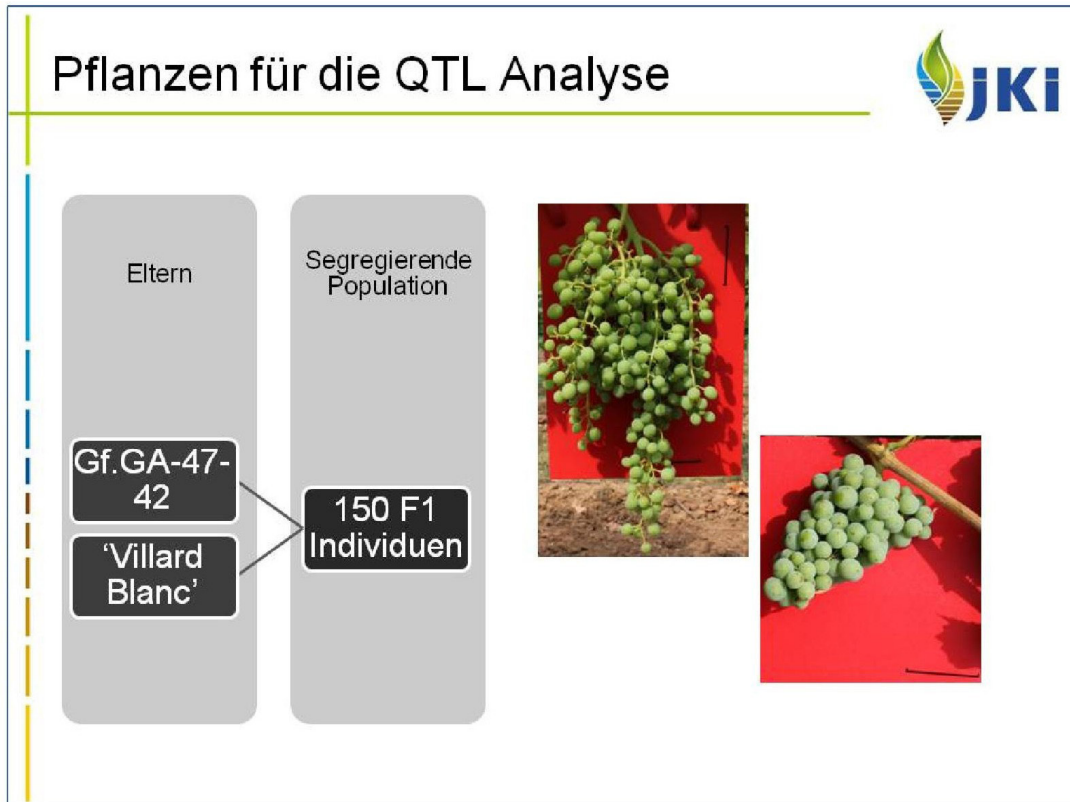


Abb. 2: Für die Berechnung der Kopplung von Traubenarchitekturmerkmalen mit molekularen Markern wurde die Kreuzungspopulation aus der Kreuzung von GF.GA-47-42 x VILLARD BLANC verwendet.

Bisher konnten 23 QTLs für Faktoren der Traubenarchitektur reproduzierbar über mindestens zwei Jahre gefunden werden. Über drei Jahre auftretende QTLs konnten für die Untermerkmale Rachislänge, Stiellänge und Pedicelllänge identifiziert werden (Abb. 3).

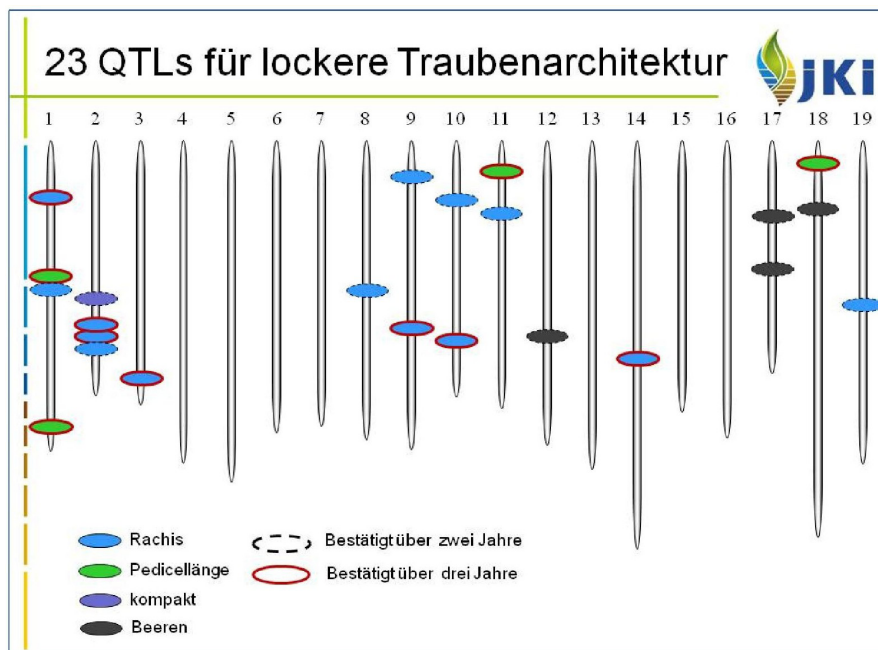


Abb. 3: Auf 12 Chromosomen im Genom der Weinrebe können 23 Bereiche (QTLs) mit Traubenarchitekturmerkmalen über mehrere Jahre assoziiert werden.

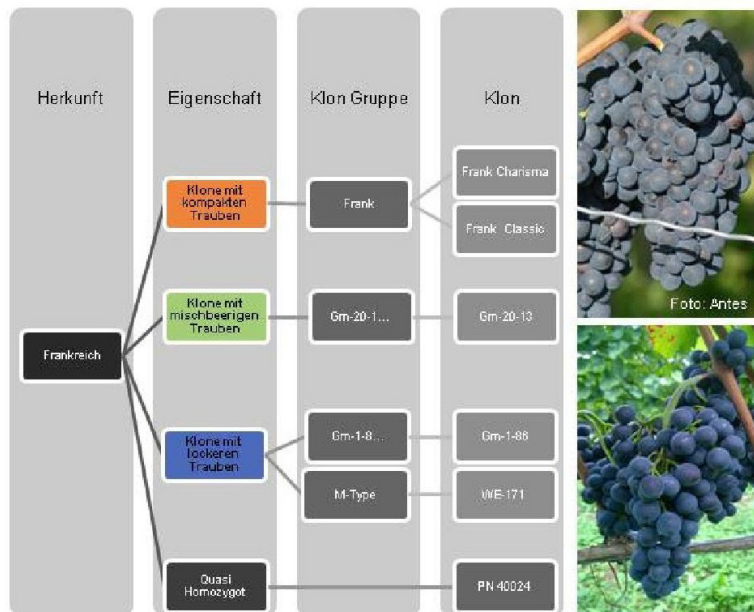
Sequenzanalysen

Die im praktischen Weinbau übliche vegetative Vermehrung unterbindet den Austausch von genetischer Information. Somatische Mutation kann allerdings zu genetischer Variabilität führen, wie sie in der Familie der BURGUNDER-Klone (PINOT-Varianten) durch einen langen Zeitraum der Kultivierung auftritt (Abb. 4).

'Pinot Noir' Klone für die genetische Analyse



- Vegetativ vermehrte 'Pinot Noir' Klone



- Feldversuche an drei Standorten

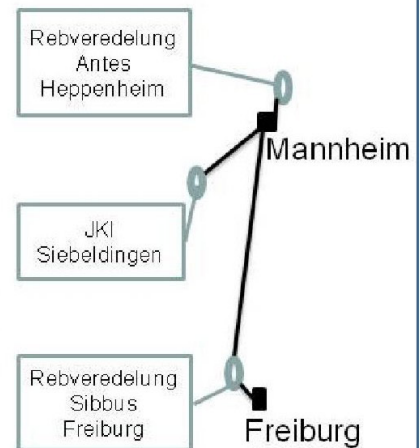


Abb. 4: PINOT NOIR wird seit langer Zeit und auf großer Fläche angebaut, was die Selektion von somatischen Mutationen begünstigt. Klone aus geographisch und zeitlich unterschiedlichen Selektionsschritten wurden an drei Standorten beprobt um den Umwelteinfluss auf die Untersuchungsergebnisse zu reduzieren.

Nach Klonenselektion stehen mehrere PINOT NOIR (PN) Klone als quasi-isogene Linien mit lockerbeeriger und kompakter Traubenarchitektur für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung (Abb. 5). Die für Lockerbeerigkeit wichtigsten Unterparameter der Traubenarchitektur wurden in den Jahren 2015 und 2016 mit manuellen Messungen sowie der Auswertung bildbasierender Daten ermittelt und statistisch validiert (Abb. 6).

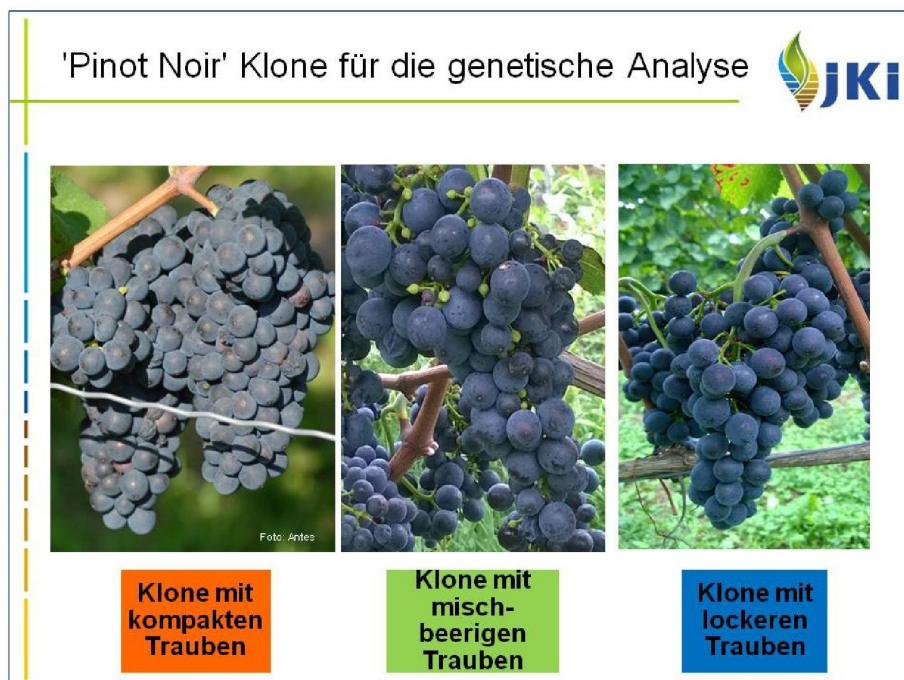


Abb. 5: Nach Klonenselektion stehen mehrere PINOT NOIR Klone als quasi-isogene Linien mit lockerbeeriger, mischbeeriger und kompakter Traubenarchitektur für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung.

Vermessung der Traubenarchitektur

- Bildauswertung von 10 Trauben pro Standort und Klon unter Verwendung von
 - BAT Software zur Volumenbestimmung (Kicherer et al. 2013)
 - ImageJ für die längen-assozierten Parameter
- Referenzwert Bestimmung: Volumen, Gewicht
- → insgesamt 20 ampelometrische Messwerte

Abb. 6: Die Gruppierung der Messergebnisse in eine lockere und eine kompakte Gruppe zeigt 4 von 20 Merkmalen mit unterschiedlicher Ausprägung in lockeren gegenüber kompakten Klonen. Die vier Parameter Rachislänge, Stielchenlänge sowie Traubenvolumen und Beerenvolumen unterscheidet sich in zwei Jahren und drei Standorten signifikant ($p < 0.05$) anhand ihrer Varianzunterschiede.

Die Pedicellängenunterschiede wurden auch auf zellulärer Ebene mit Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Durch die Vermessung der durchschnittlichen Zelllänge in Wuchsrichtung kann gezeigt werden, dass der Längenunterschied auf eine größere Anzahl von Zellen beruht und nicht auf Größenunterschiede gleichvieler Zellen (Abb. 7).

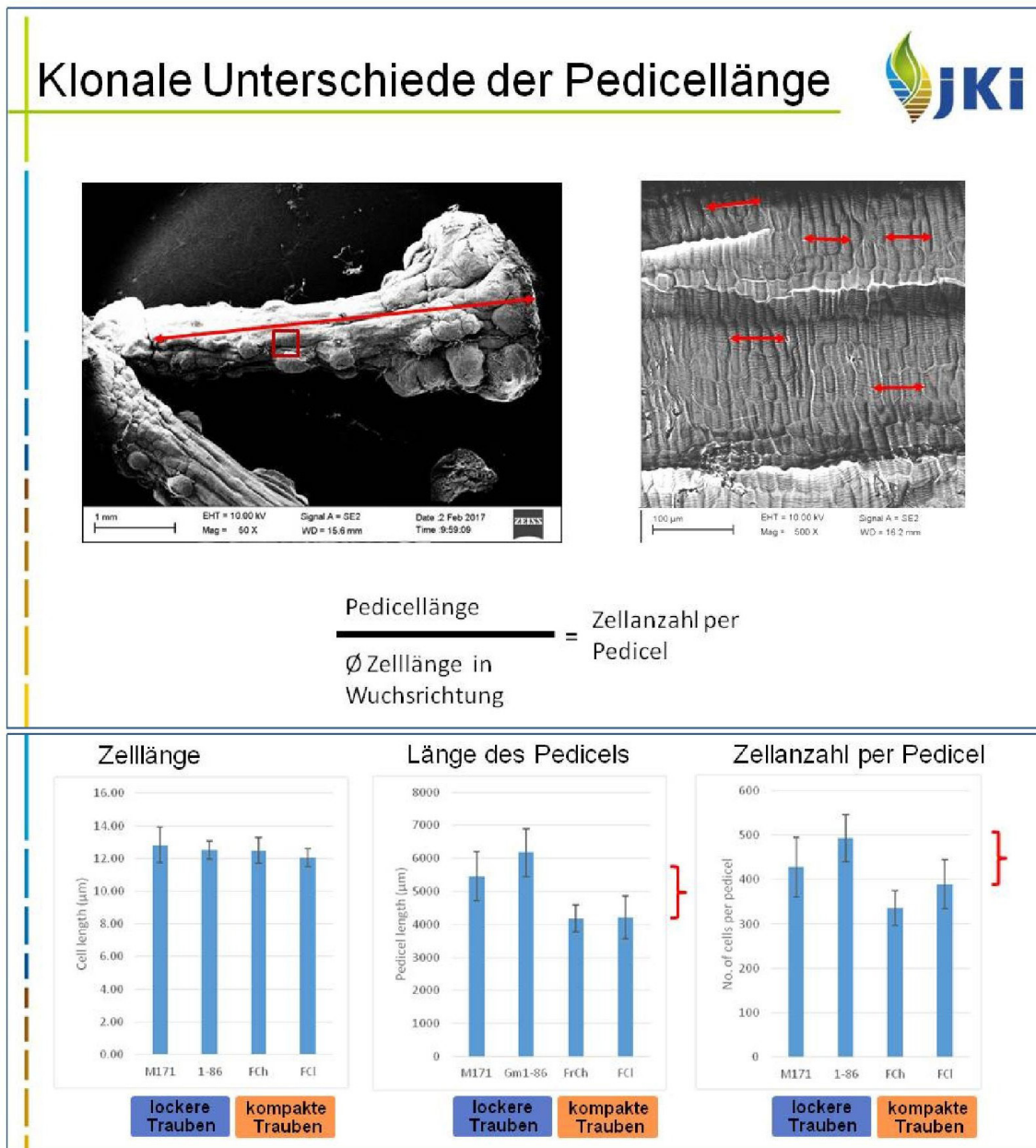


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopie, Bilder der Pedicellänge und der durchschnittlichen Zellgröße (oben). Durch die Vermessung der durchschnittlichen Zelllänge in Wuchsrichtung und der Pedicelgesamtlänge wird deutlich, dass der Längenunterschied durch eine größere Anzahl von Zellen und nicht durch Größenunterschiede gleichvieler Zellen hervorgerufen wird (unten).

Genexpressionsstudien mit den PINOT NOIR Klonen sollten die in den phänotypischen Unterschied involvierten Gene erkennbar machen. Hierfür wurde zunächst nach einem geeigneten Zeitfenster für die Erprobung gesucht und mit dem in Abb. 8 gezeigten differentiellen Zuwachs der Rachis bei lockeren und kompakten Klonen auch gefunden.

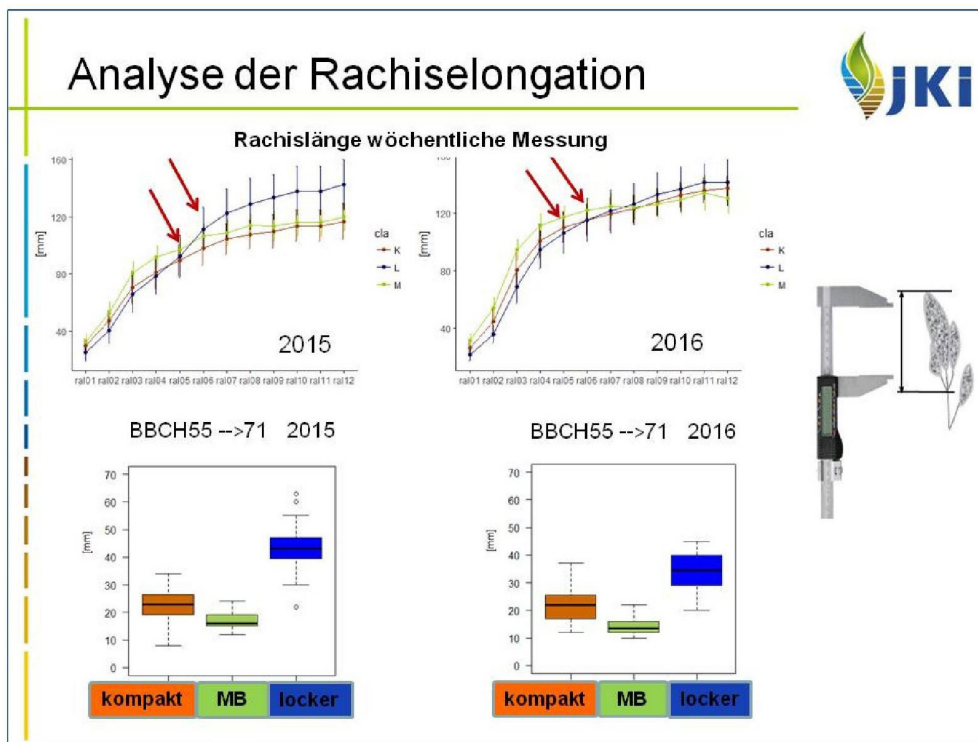


Abb. 8: Differentieller Zuwachs der Rachis bei lockeren, mischbeorigen (MB) und Kompakten PINOT NOIR-Klonen (oben). In einem ca. dreiwöchigen Zeitraum um die Blüte ist der Längenzuwachs bei lockerbeorigen PINOT NOIR um durchschnittlich 73 % erhöht (unten).

Die am Max-Planck-Institut Köln mittels RNA-seq durchgeführte Expressionsanalyse in (PINOT NOIR) ergibt > 400 Gene mit differentieller Expression, wenn man lockere mit kompakten PN Klonen vergleicht. Eine Untersuchung zur differentiellen Genexpression der durch RNA-seq ermittelten Kandidatengene (KG) in PINOT NOIR-Klonen von drei geographisch verschiedenen Standorten zeigte in den Jahren 2015 und 2016 zwischen den Entwicklungsstadien BBCH57 und BBCH71 eine fünffach höhere Expression eines Kandidatengens in lockerbeorigen PINOT NOIR-Klonen im Vergleich zu Klonen mit kompakter Traubenarchitektur (Abb. 9).

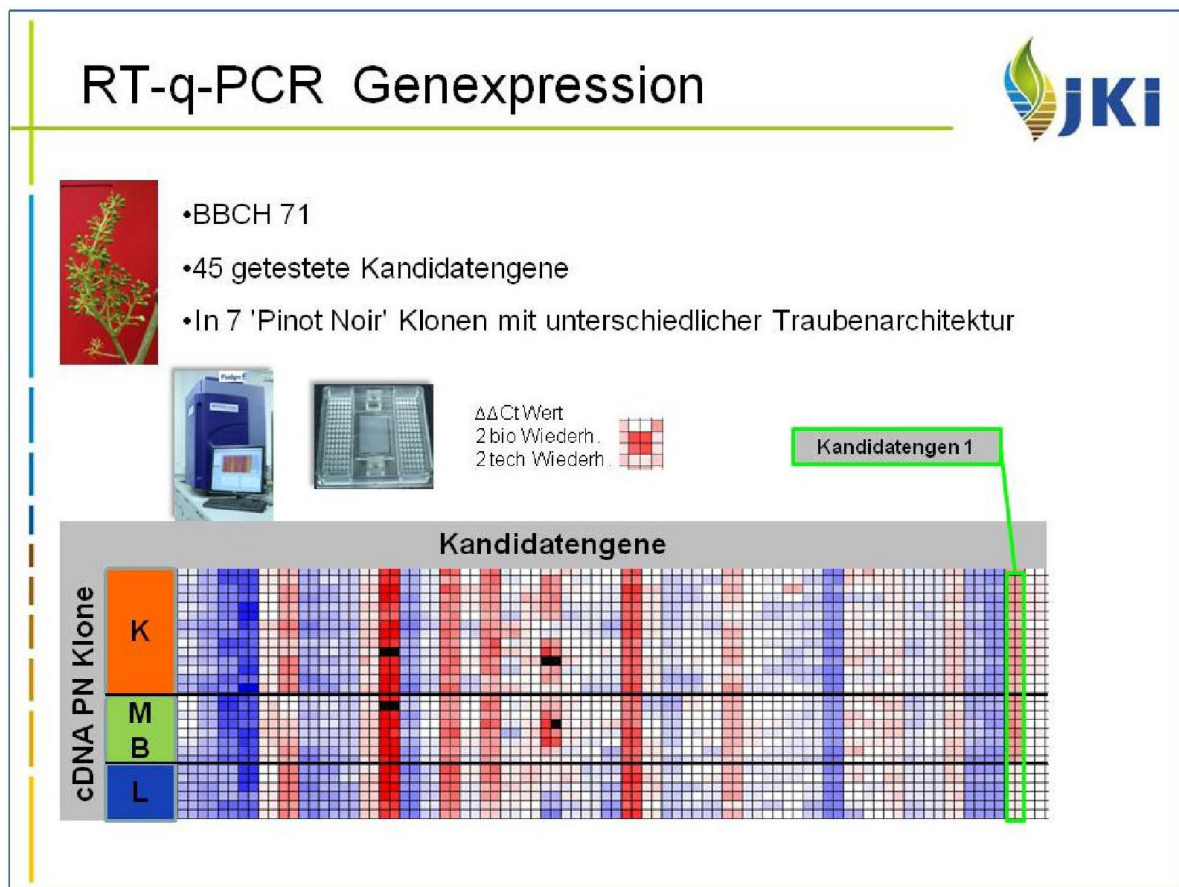


Abb. 9: „Heatmap“-Ausschnitt eines Fluidigm-Expressionschips. Der Farbgradient in den Segmenten der lockeren, mischbeerigen (MB) und kompakten PINOT NOIR-Klone weist auf unterschiedliche Genaktivität hin (siehe Markierung).

Einerseits, ergibt der in zwei Teile untergliederte Untersuchungsansatz, durch die Kopplung von phänotypischen Daten mit molekularen Markerdaten einer aufspaltenden Population 23 Regionen (QTL) die mit Traubenarchitektur assoziiert sind. In diesen Genombereichen liegen über 7.000 positionelle Kandidatengene. Andererseits kann mit RNA Sequenzierung die differentielle Expression von mehr als 400 funktionellen Kandidatengenen in zwei lockeren und zwei kompakten SPÄTBURGUNDERN gezeigt werden. Kombiniert man die 7.000 Gene der mehrjährigen QTL Bereiche mit den 400 durch RNA-seq ermittelten Genen, so sind 90 Kandidatengene in beiden Ansätzen mit Traubenachitektur assoziiert.

Für das Merkmal Pedicelllänge, das durch erhöhte Zellteilung in mehreren Jahren in lockerbeerigen PINOT NOIR-Klonen länger ausgebildet war als in kompakten, ergeben sich so acht gemeinsame Kandidatengene aus beiden Ansätzen (Abb. 10).

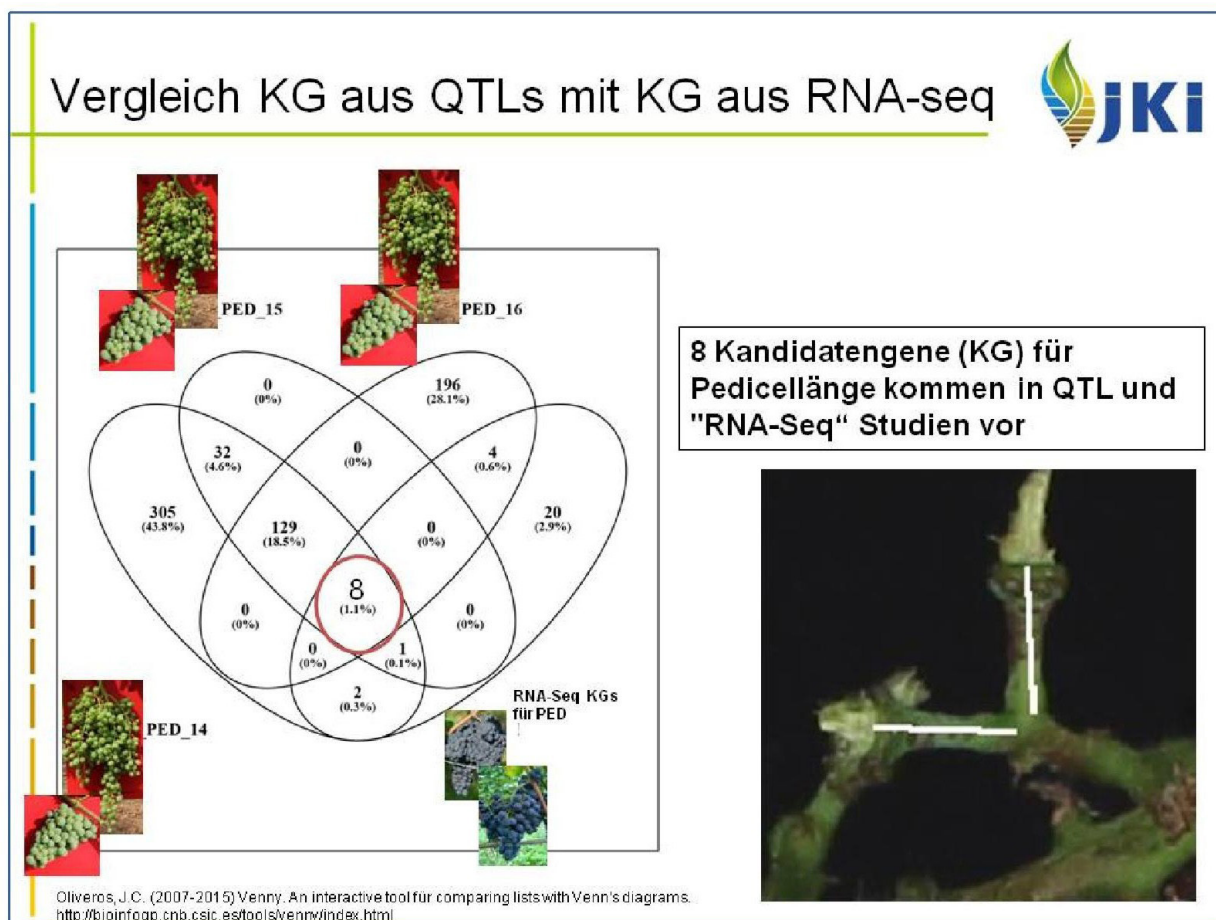


Abb. 10: Durch Kombination der auf RNA-seq basierenden Kandidatengenen mit den durch QTL Berechnungen ermittelten Kandidatengenen lässt sich die Zahl der Kandidatengene stark einengen.

Die wiederholte Expressionsanalyse mittels RT-q-PCR von ausgesuchten Kandidatengenen bestätigt die differentielle Expression eines Gens über 2 Versuchsjahre (Abb. 11). Der Sequenzvergleich des Kandidatengens aus der Rebe, mit den Referenzgenomen von Modellpflanzen (Arabidopsis und Tomate), weisen das Kandidatengens als Wachstumsregulator aus.

Durch die Auswertung der Phänotypisierung von PINOT NOIR-Klonen (kompakt *versus* locker) kann gezeigt werden:

- Ein mehrwöchiges Zeitfenster, bei dem die Blüte mit differentiellem Zuwachs zwischen lockeren und kompakten Klonen existiert, und somit für die Probenentnahme für molekulargenetische Untersuchungen priorisiert werden kann.
- Die maßgeblichen Unterschiede der Traubenarchitekturparameter sind:
 - Einzel- und Gesamtbeerenvolumen
 - Rachisläng
 - Pedicellänge
 - Pedicellängenunterschied beruht auf der Zellanzahl.

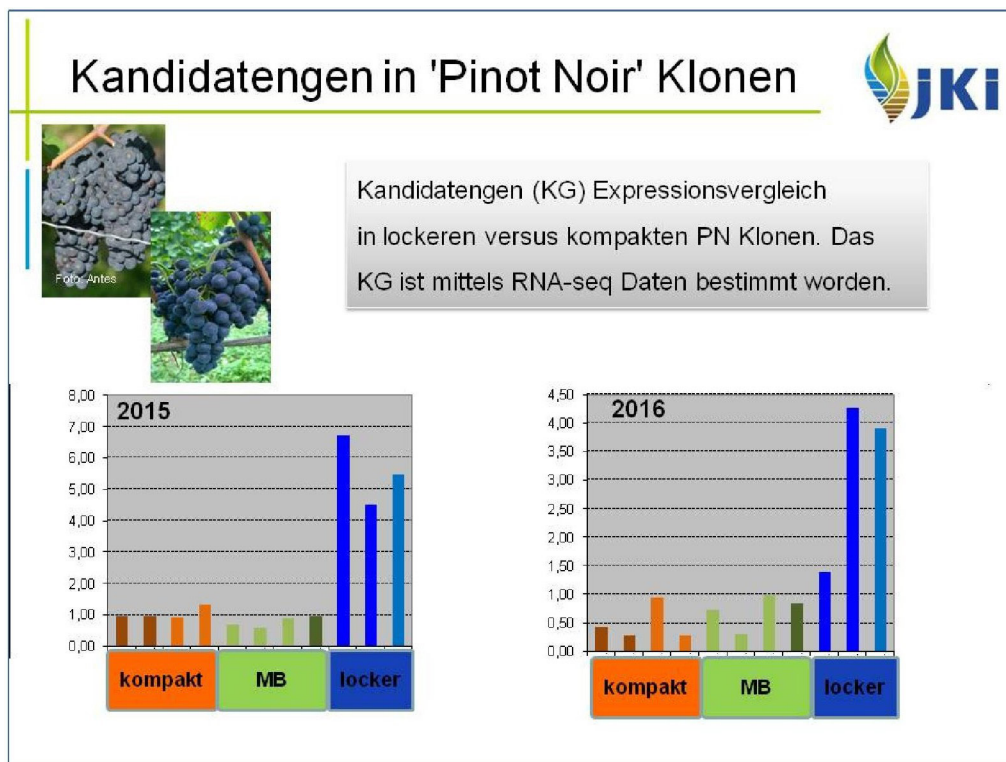


Abb. 11: Expressionsniveau des Kandidatengens in lockeren PINOT NOIR-Klonen im Vergleich zu mischbeerigen (MB) und kompakten PINOT NOIR-Klonen an drei Standorten und zwei Jahren. Das Kandidatengen ist in die Regulierung des Wachstums durch Stimulation der Zellteilung involviert.

- Die QTL Analyse (GF.GA-47-42 x VILLARD BLANC) erbrachte folgende Ergebnisse:
 - bestätigt 23 QTLs auf 12 Chromosomen
 - Pedicellänge besteht aus 4 Loci stabil über 3 Jahre.

Expressionsanalyse (PINOT NOIR):

- RNA-seq ergibt > 400 Gene mit differentieller Expression zwischen lockeren und kompakten PINOT NOIR-Klonen.
- RT-q-PCR bestätigt ein differentiell exprimiertes Kandidatengen über zwei Jahre und drei Standorte.

Vergleichsstudien von QTL und Expressionsanalyse:

- 8 der differentiell exprimierten Gene zwischen Individuen mit langem und kurzem Pedicel finden sich übereinstimmend mit beiden Methoden in unterschiedlichem Pflanzenmaterial.

Die vorgestellten Ergebnisse wurden beim 40. OIV Weltkongress für Rebe und Wein (29.05. – 02.06.2017) in Sofia, Bulgarien (<http://www.oiv2017.bg>) vom Institutsleiter, Reinhard TÖPFER präsentiert und in nachfolgender kleinen Publikation in BIO Web of Conferences 9, 01016 (2017) am 4. Juli 2017 online (DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170901016>) veröffentlicht (s. nachfolgende Seiten, Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags).