

Universität Hohenheim
Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie
Fachgebiet Weinbau

Schlussbericht

Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß genetischer Variation
traditioneller Rebsorten im Hinblick auf die Erhaltung genetischer
Ressourcen

Forschungsprojekt Nr.: 514-33.52/04HS022

Teilprojekt 2 : DNA Strukturanalysen mittels Markertechniken

Verbundprojektpartner

Universität Hohenheim
Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie
Fachgebiet: Weinbau
D- 70593 Stuttgart
Bearbeiter: Rolf Blaich, Andrej Benjak, Petra Hoffmann, Astrid Forneck

Thema

Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß genetischer Variation traditioneller Rebsorten im
Hinblick auf die Erhaltung genetischer Ressourcen

Schlußbericht

Partner 2: Universität Hohenheim
Berichtszeitraum (01.10.2006 – 31.03.2009)

Zusammenarbeit mit

Partner 1 (P1)
Forschungsanstalt Geisenheim
Fachgebiet Rebenzüchtung und Rebenveredlung
Eibingerweg 1
D- 65366 Geisenheim
Bearbeiter: Ernst H. Rühl, Hubert Konrad, Elske M. Schönhals

Partner 3 (P3)
Justus-Liebig-Universität Gießen
IFZ für Umweltsicherung – Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Heinrich-Buff-Ring 26-32
D- 35392 Gießen
Bearbeiter: Wolfgang Friedt, Achim Schmitt

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Die Gesamtziele sind:

- Erhaltung der genetischen Vielfalt von Wild- und Kulturpflanzen gemäß der Forderung der Agenda 21 der Vereinten Nationen (UN),
- Schutz, Erforschung und Erhaltung der genetischen Variation der Weinrebe (*V. vinifera* L.), insbesondere der unabhängig voneinander vermehrten klonalen Formen alter Rebsorten.
- Erforschung der molekularen Hintergründe von Rebklonen und zugrunde liegender genetischer Mutationen mit Auswirkungen auf den Phänotyp.
- Entwicklung von Methoden zur Identifikation wertvollen genetischen Materials auf Basis molekulargenetischer Systeme, die mit ampelographischen Deskriptoren verknüpft sind.

Die Ziele des Teilprojekts 2 sind:

1. Erforschung der genetischen Variation der Weinrebe am Beispiel der Rebsorten Pinot noir mittels neutraler genetischer Marker und Evaluierung dieser Marker auf ihre Eignung für „klonale Fingerprints“.
2. Erforschung von genetischen Mutationen mit Auswirkungen auf den Phänotyp am Beispiel der Lockerbeerigkeit
3. Erforschung von molekularen Mechanismen (Transposition und Retrotransposition), die zur genetischen Variation von Rebklonen führen.
4. Entwicklung von Markern, die zur Identifikation genetischen Materials bei Reben führen.

Die Aufgabenstellung des Teilprojektes 2 umfasst die:

- Etablierung von genetischen Methoden,
- Entwicklung relevanter genetischer Marker für die Analyse von genetischer Variabilität bei Reben,
- Entwicklung relevanter Selektionsmarker für gewünschte Merkmale (z.B. Lockerbeerigkeit)

1. 1. Planung und Ablauf des Projekts – Teilbereich 2

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit der Universität Hohenheim (Prof. Blaich) mit der AG „Clonal Genomics“ (Prof. Forneck) an der Universität für Bodenkultur, Wien, AUT. Mit Fortschreiten des Projektes wurde die Interaktion mit Spezialisten wichtig um den Fortgang des Projektes zu beschleunigen. Diese waren die AG „Diversité génétique intra-variétale chez la vigne“ (Dr. Pelsy, INRA, Colmar, F) und die AG „Genètica Molecular“ (Prof. Casacuberta) am IBMB-CSIC, Barcelona, ES. Die Abstimmung der nationalen Projektpartner erfolgte in regelmäßigen Treffen zur Besprechung und Diskussion und Austausch der Ergebnisse. Die in dem Projekt

involvierten ForscherInnen sind:

Prof. Rolf Blaich (Projektleitung)

Prof. Astrid Forneck (Teil Klonale Fingerprints, Subprojektleitung)

Petra Hoffmann (Teil Lockerbeerigkeit – bis 4/2007, dann Mutterschutz)

Dr. Andrej Benjak (Teil Transposon – ab 1/2007 bis Projektende)

Die Planung und der Ablauf der Teilerperimente ist chronologisch geordnet und dem jeweiligen Projektziel zugewiesen. Es erfolgt eine Übersicht in tabellarischer Form.

Tabelle 1: Chronologische Darstellung der Teilerperimente mit Bezug zu Projektziel und Hinweis zum Ablauf

Planung- Teilerperiment	Ziel	Ablauf
1 Erforschung der genetischen Variation in Pinot noir Klonen mittels neutraler Marker und Erstellung „klonaler Fingerprints“ zur Grundlage für die weiteren molekulargenetischen Analysen (Forneck)	1	2006 abgeschlossen
2 Erforschung molekularer Marker assoziiert mit der Lockerbeerigkeit bei Pinot noir Klonen (Hoffmann, Forneck)	2, 4	2006 - 2007 abgeschlossen
3 Erforschung des Anteils retrotranspositioneller Variation an der genetischen Variation bei Pinot noir, blanc und gris Klonen (Hoffmann, Forneck)	3	2006 – 2007 abgebrochen
4 Erforschung des Anteils transpositioneller Variation an der genetischen Variation bei Pinot noir Klonen (Benjak, Forneck)	3, 4	2007-2008 abgeschlossen
5 Erforschung von genetischen Markern für die Identifikation von genetischen Ressourcen bei der Weinrebe (Benjak, Hoffmann, Forneck)	4	2008-2009 abgeschlossen

Versuchsjahr 1-2006

Im Versuchsjahr 2006 wurden Untersuchungen zur Optimierung der AFLP-Methode durchgeführt und eine stringente Auswertungsmethode der AFLP-Bandenmuster etabliert. Erste Versuche zur Analyse eines Markers für die Lockerbeerigkeit bei Pinot noir Klonen wurden durchgeführt. Weiter wurden erste Versuche zur Analyse der klonalen Variation auf Basis retrotranspositioneller Variation durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit P1 wurden Untersuchungen im Freiland zur Untersuchung des Einflusses von Gibberellin auf die Lockerbeerigkeit an Pinotklonen durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden in weiterer Folge nicht fortgeführt, da sie für die Zielerreichung (aufgrund der inzwischen erzielten molekulargenetischer Resultate) nicht mehr essentiell waren. Im Anschluss wurde mit Partner 3 eine Methode zur Extraktion hochwertiger RNA aus Gescheinen und Stielgerüsten von Pinotklonen erarbeitet.

Versuchsjahr 2- 2007

Die Schwerpunkte der Arbeiten lagen auf der Entwicklung des Markers für die Lockerbeerigkeit bei *V. vinifera* 'Pinot' und anderen Rebsorten und der Ermittlung von Sequenzunterschieden auf Grundlage von Transposon- basierten DNS Sequenzen. Im Versuchsjahr 2007 wurden in Zusammenarbeit mit Partner 3 Analysen im Labor zur Modifikation und Adaptation einer Methode zur Gewinnung von hochqualitativer Gesamt RNA durchgeführt. Weiter wurden Methoden und Protokolle ausgetauscht, die als Basis für die Gewinnung von cDNA dienen. Mit Partner 1 wurden morphologische und ampelographische Untersuchungen der zentralen Experimente von 2006 wiederholt um die klonalen Phänotypen exakt zu beschreiben und eine Kopplung klonaler Merkmale mit Markern zu ermöglichen.

Versuchsjahr 3-2008/2009

Weitere Untersuchungen zur Existenz und um Ausmaß genetischer Variation mittels neutraler molekularer Marker (S-SAP) wurden durchgeführt. Mittels eines modifizierten S-SAP Protokolls konnten vier von fünf Pinot noir Klonen unterschieden werden. Diese PCR-gestützte Methode zeigte sich als effizient und reproduzierbar für die Detektion polymorpher Sequenzen (Wegscheider *et al.* 2009). Eine *in silico* Analyse des in 2007 publizierten Rebengenoms zeigte, dass der Anteil von Transposons (potentiell aktive und defekte Kopien) darin bei ca. 2 % liegt. Der größte Teil der Elemente sind domestiziert, d.h. nicht mehr aktiv; dennoch konnten mehrere Kandidatenelemente bestimmt werden, deren Aktivität (funktionelle Transposase, Existenz komplementärer ESTs) zur Induktion genomischer Variation beitragen kann. Es handelt sich um Elemente der *hat*-Familien (*hatvine-1*, *hatvine-2*, *hatvine-7*, *hatvine-10*) sowie der *PIF*-Familien (*Pifvine-3*, *Pifvine-4*). Die Entwicklung von molekularen Markern auf Basis aktiver Elemente wurde anhand der Subfamilien *mPifvine-3.1* begonnen.

1. 2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Die fortgesetzte vegetative (=klonale) Vermehrung der Rebsorten hat in Verbindung mit natürlicher Mutation und anthropogener Selektion zu zahlreichen Spielarten und Varianten, geführt. Einige dieser Formen sind so auffällig, dass aus ihnen eigenständige neue Rebsorten entstanden sind, andere werden dagegen als Klone einer Rebsorte aufgefasst. So sind aus ursprünglich blauen Rebsorten rote und weiße hervorgegangen, wie der Ruländer und Weißburgunder aus dem Blauer Spätburgunder oder es sind innerhalb von Rebsorten Varianten entstanden wie kompakte oder lockerbeerige Spätburgunder. Genetisch betrachtet sind Burgundersorten als geklonte Mutanten hinsichtlich der Farbe aufzufassen, die auf Grund der lange zurückliegenden Trennung sicherlich zahlreiche weitere, oft stille, Mutationen tragen. Diese lassen sich gelegentlich durch molekulare Marker erfassen (Forneck *et al.* 2003).

Die Unterschiede zwischen den Burgundersorten lassen trotz dieser genetischen Betrachtung keine Zweifel an ihrer Eigenständigkeit als Rebsorte aufkommen. Vom Standpunkt des Sortenrechtes begründet sich diese Position mit Unterschieden in den so genannten Registermerkmalen. Aus bestehenden Rebsorten durch Knospenmutation hervorgegangene Varianten mit neuen Eigenschaften sind die Basis der Entwicklung 'verbesserter' Rebklone. Akkumulierte Mutationen bilden die genetische Streubreite innerhalb einer Rebsorte, die auch heute die entscheidende Voraussetzung für die Selektion neuer, praxisrelevanter Klone und die Erzeugung von Weinen unterschiedlichen Charakters darstellt. Diese Tatsache ist umso bedeutender, als die Klonenselektion – im Gegensatz zur Kreuzungszüchtung – mit der innerhalb der Rebsorte vorhandenen genetischen Variationsbreite auskommen muss. Was nicht bereits vorhanden ist, kann nicht selektioniert werden.

Der berechtigten Forderung einer möglichst vollständigen Erhaltung der genetischen Vielfalt innerhalb alter Rebsorten, stehen praktische und finanzielle Zwänge entgegen. Es stellt sich folglich die Frage, was ist erhaltenswert und was verzichtbar. Die Frage lässt sich in zwei Teilfragen zerlegen: Wieweit unterscheiden sich Klone genetisch, hinsichtlich ihrer Gensequenzen? Und wieweit unterscheiden sich Klone in ihren physiologischen Kennzahlen?

Beide Fragen sind sowohl für die grundsätzliche Entscheidung über die generelle Notwendigkeit einer Klonenerhaltung als auch für die Wertermittlung einzelner Klone erforderlich. Ziel des Projektes ist es daher, exemplarisch die Variation von Klonen der Rebsorten Riesling und Spätburgunder hinsichtlich ihrer physiologische Kennzahl und ihrer Genome zu untersuchen. Neuere Untersuchungen haben bestätigt, dass sich Klone sowohl in ihren weinbaulichen Eigenschaften (Rühl et al. 2000, 2002) als auch hinsichtlich ihrer Genome unterscheiden (Forneck et al. 2003, Konradi et al., 2003).

Durch die Veröffentlichung der Genomsequenz der Rebe im Jahr 2007 ("Whole shot gun Sequence") durch die beiden Gruppen Jaillon et al. (2007) und Velasco et al. (2007) hat sich für die Erforschung des Themenbereichs der klonalen Variation der Rebe die Perspektive erheblich verändert. Erstmals waren belastbare *in silico* Analysen möglich, die das Genom auf mögliche, mutationsintensive Bereiche oder Loci untersuchen konnten. Weiterhin hat die Sequenzinformation zu einer immensen Erhöhung der Qualität auch der Wetbench Analysen geführt, da nun im Vorhinein überprüfende Analysen bzw. Simulationen der geplanten Versuche durchgeführt werden können. Für die beteiligten AGs dieses Teilbereichs hat die Neuerkenntnis zu einer drastischen Beschleunigung des Arbeitsfortschritte und auch des Arbeitspensums geführt. Nicht nur konnten Experimente frühzeitig gestoppt werden, deren Erfolg nicht abzusehen war – es konnte das Ziel, insbesondere im Bereich der "Transposon/Retrotransposon"-gestützten Variationsforschung bei der Rebe erreicht werden.

2. Material und Methoden

Der Projektteil wurde in Teilerperimente aufgeteilt (Tabelle 1). Die Gliederung wird für das Kapitel 2 und 3 beibehalten.

Teilerperiment 1:

Mittels etablierter Protokolle wurde ein AFLP- Screening an 32 Spätburgunder Klonen (Pinot noir, Pinot gris und Pinot blanc) (Anhang) mit 375 AFLP-PCR Markern durchgeführt und repliziert. Die DNA Extraktion wurde optimiert und die AFLP-Analyse wurde nach dem modifizierten Protokoll von Benjak et al. 2006 durchgeführt. Die klonale Variabilität betrug bei den Pinot Klonen zwischen 1-5 %. Mittels statistischer Verfahren wurde die genetische Variabilität von Pinot noir Klonen untersucht. Dabei konnten genetisch „stabile“ und genetisch variable Klone unterschieden werden. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die genetische Variabilität von Pinot noir Klonen am höchsten und von Pinot blanc Klonen am niedrigsten ist.

Teilerperiment 2:

Ein selektiertes Probenstet von 19 Rebklonen wurde für die Analysen verwendet: Sieben Pinot noir Klone: zwei kompakt (ENTAV 777, 105 S Frank), vier lockerbeerig (1-84 Gm, We M242, We M1, 1-44 Gm), einer kleinbeerig (20-13 Gm), drei Pinot blanc Klone (INRA Colmar -3022, -3189, -3009), ein Pinot Meunier (INRA Colmar -3079) und zwei Pinot gris Klone (INRA Colmar -3014, -3079). Zusätzlich wurden weitere Rebsorten untersucht: Riesling (64-177 Gm), Roter Traminer (11 Gm), Weißer Gutedel (Fr 36-37), Chardonnay (1Gm), Cardinal (UCDavis VII 1:13-14) and Chenin blanc (UCDavis I 4:5-6). DNS wurde nach etablierten Protokollen extrahiert und teilweise von Kollegen zur Verfügung gestellt.

Die Entwicklung der mit dem Phänotyp der Lockerbeerigkeit assoziierten Marker erfolgte über ein weites, randomisiertes Screening mit EST-basierten Sequenzen (Vaclavicek 2004), von denen ein Kandidatenlocus identifiziert werden konnte. Basierend auf dem Locus CF207762 (Goes da Silva et al. 2003) kodierend für ein Expansin-Gen, wurden spezifische Primerpaare entwickelt, die in weiterer Folge zu SCAR und CAPS Marker entwickelt wurden. Der SCAR Marker (Del1/5`GGCCTCAAGAATGGTCTCTGAARA`3 - Del2/5`ATATACTGTTGTCCTTGGGGGTCAGTC`3) amplifiziert ein PCR Produkt von 162/166 bp. Der kompakte Phänotyp der untersuchten Pinot Klone ist assoziiert mit dem 166 bp PCR Produkt. Der SCAR Marker kommt als Doppelbande mit 4 bp Unterschied vor. Beide Amplifikationsprodukte wurden in 4-facher Wiederholung direkt sequenziert und konnten reproduziert werden. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) Marker wurden auf Basis der Primerpaare ExpF12 (5`GGCCTCAAGAATGGTCTCTGAATA`3 - 5`CCACCAGTAATGGCCACA`3) und anschließend mit *SMI* (Fermentas, St Leon Rot, Germany),

nach Standardprotokollen verdaut. Restriktionsprodukte wurden nach etablierten Laborprotokollen kloniert und sequenziert. Die detaillierten Methoden der einzelnen Arbeitsschritte sind im Anhang angegeben (Anhang).

Teilexperiment 3:

Anhand einer vergleichenden Analyse chimärer Rebklone der Rebsorten Pinot ssp. mittels RTransposon Display sollten spezifische Marker für die genetische Variabilität und korreliert mit der Beerenfarbe differenziert werden. Untersucht wurden 19 *Vitis vinifera* L. Pinot Klone, davon 9 Pinot noir (Fr 52-86, INRA 777, 20 Gm, 1-1 Gm, Fr 13 L M1, 20-13 Gm, Fr 10, 20-19 Gm), fünf Pinot gris (2-15 Gm, 2-15-31 Gm, H 1-1-9, Fr 49-207, D 43) und fünf Pinot blanc (Fr 70, Fr 74, D 55, Wd 212, Wd 209). Für diesen Versuch wurden fünf Retrotransposon-spezifische Primer LTR1b (basierend auf Vine1, Verriès et al. 2000), LTR3 (basierend auf Tvv1, Pelsy & Merdinoglu 2002), LTR5 (basierend auf Tvv1, Pelsy & Merdinoglu), LTR 6 (basierend auf Gret1, upstream, Kobayashi et al. 2004) und LTR7 (basierend auf Gret1 downstream, Kobayashi et al. 2004) eingesetzt. Der Versuch wurde mit der RTransposon-Display Methode durchgeführt, die auf der AFLP-Technik basiert. Bei der Preamplifikation wurden *Mse*I und LTR1a eingesetzt. Bei der selektiven Amplifikation wurden LTR oder *Mse* markierte 5'Cy5 Primern und ein nicht markierter LTR oder *Mse* Primer verwendet. Ein modifiziertes Protokoll wurde entwickelt, dass bei der Preamplifikation *Mse* und *Eco* Primer eingesetzt und in der selektive Amplifikation markierte LTR- und nicht markierte *Mse* Primern kombiniert. Die PCR-Produkte wurden mit einem DNA-Fragment Analyser (ALF, Amersham Pharmacia, Freiburg) detektiert.

Teilexperiment 4:

(Detaillierte Informationen dieses Teilexperimentes in Wegscheider et al. 2009 (Anhang)).

In dieser Untersuchung wurde eine modifizierte S-SAP Methode eingesetzt um deren Effizienz zur Detektion von Markern basierend auf Transposon Sequenzen zu testen. Weiterhin wurde die Sensitivität der Methode evaluiert um klonale Variation bei Pinot Klonen zu testen.

Untersucht wurden sechs *Vitis vinifera* Proben: fünf Klone (20Gm, 1-44Gm, 18Gm, 20-13Gm, 1-84Gm) von cv. Pinot noir (Forschungsanstalt Geisenheim, Germany) sowie ein Klon der Sorte Domina ST49 (Pinot noir x Portugieser) (Steinmann, Sommerhausen/Main, Germany) als „out group“. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde bestätigt indem alle Klone in doppelter Wiederholung analysiert wurden. Genomische DNS wurde von jungen Blättern mittels des E.Z.N.A. SP Plant DNA Miniprep Kits, nach handelsüblichen Protokollen extrahiert (Omega Biotek, Doraville, USA).

Ein modifiziertes Protokoll für ein S-SAP Assay wurde entwickelt, in dem genomische DNS (13.5 µl) mit *Mse*I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) verdaut wurde. Die Restriktion wurde 2 h bei 65°C durchgeführt und weiter aufgereinigt mittels des Perfectprep® Gel Cleanup Kit

(Eppendorf, Hamburg, Germany). Anschließend wurde Template DNS (25 µl) hergestellt, indem 5 µl eines Ligationsmixes (50 pmol *MseI* Adapter, 100 mM ATP, 10x T4 Ligase Buffer and 1 U T4 Ligase (Fermentas GmbH) hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Pre-amplifikation wurde mit einer Kombination aus Primer M (0) (tab.1), und sechs markierten (IRD700 and IRD800) „universal retrotransposon Primern“: F0100, F0103, F0104, F0105, F0113, F0117 (Kalendar, personal communication) durchgeführt. Der PCR Reaktionsmix enthielt 2.25 µl template DNS, 1.5 µM M(0), 1.5 µM retrotransposon primer, 1x PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs and 1 U Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen Ltd., Paisley, UK). Die nichtselektive PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C · 60 s⁻¹ + 26 x (94°C · 30 s⁻¹, 56°C · 60 s⁻¹, 72°C · 60 s⁻¹) + 72°C · 6 min⁻¹. Die selektive PCR wurde in 10 µl Volumina durchgeführt und enthielt 1 µl of pre-amplifizierte DNS, 0.5 µM selektive *MseI* primer (M22, M23, M24, M25, M27) (tab.1), 0.5 µM retrotransposon primer, 1x PCR Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs und 0.75 U Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen) unter Verwendung der folgenden PCR Bedingungen: 94°C · 60 s⁻¹ + 12 x (94°C · 30 s⁻¹, 65°C · 30 s⁻¹, 72°C · 60 s⁻¹) + 26 x (94°C · 30 s⁻¹, 56°C · 30 s⁻¹, 72°C · 60 s⁻¹) + 72°C · 6 min⁻¹. Die Amplifikationsprodukte wurden auf 8 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels LI-COR NEN 4300 DNA analyzer (Licor Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany) visualisiert. Zur weiteren Analyse der RT-basierten Amplifikationsprodukte wurden vier polymorphe „Banden“ kloniert und sequenziert (Methodische Details in Wegscheider 2007). Die Sequenzen wurden via BioEdit aligned und gegen Nukleotid- und Protein Databases (NCBI) mittels BLAST und gegen Repbase Update Databases mithilfe des Repeat Masking Tools analysiert.

Tabelle 2: Verwendete M-Primer für die S-SAP Analysen

Primer Code	DNA sequence
M(0)	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A -3'
M22	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA A -3'
M23	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT T -3'
M24	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA C -3'
M25	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA T -3'
M27	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT G -3'

Nur reproduzierbare Banden wurden gezählt und analysiert. Similaritätsmatrizen wurden auf Basis von SM Koeffizienten mittels NT-SYS PC Software, Version 2.01 berechnet und mittels SAHN/UPGMA ein Dendrogram entwickelt.

Teilexperiment 5:

(Detaillierte Informationen dieses Teilexperimentes in Benjak et al. 2009 (Anhang)).

Transposon Mining wurde an der publizierten Sequenz von Pinot noir (Jaillon et al. 2007, Velsaco et al. 2007) durchgeführt. Beschriebenen Transposons (Benjak et al. 2008) wurden als Sonden in

einer BLAST Analyse verwendet um potentielle MITE-Elemente zu finden. Zur Untersuchung der Transkription ("Aktivität") dieser Element wurde als Basis die "Grapevine EST collection" der NCBI Datenbank verwendet. Die daraus hervorgegangenen Sequenzen wurden wiederum als Sonden zum Mining eingesetzt um MITE-Gruppen zu eruieren. Jede MITE Gruppe wurde durch multiple Alignments/Similaritätsmatrizen (bioEdit) abgesichert. Alle neuen consensus Sequenzen wurden in Rebase deponiert. Das verwendete Pflanzenmaterial umfasst 38 Genotypen (Anhang 5), die mit Ausnahme der Proben aus den USA, mittels des E.Z.N.A. Sp Plant DNA Mini Kits (Omega Bio-tek) nach Benjak et al. 2006 extrahiert wurden. Die für die PCR Analysen benötigten Primer wurden mittels Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) und Fast PCR (Kalender 2006) entwickelt. Jeder Primer wurde in silico auf Spezifität getestet (Tabelle 3). Die PCR Bedingungen sind in Benjak et al. 2009 beschrieben (Anhang). Die Positionen aller möglicher Gene (inkl. Intron, Exon und UTR Koordinaten wurden den physikalischen Ort (Chromosomen) zugeordnet, wenn dies möglich war. Das eigentliche Transposon Mining wurde mittels der TRANSPO 1.0 Software durchgeführt.

Tabelle3: Entwickelte und getestete Primer zur Detektion von MITE Elemente im Genom der Rebe

Locus	Left primer	Right primer	Source	Coordinates	PCR product length (bp) with MITE	PCR product length (bp) without MITE
7	gaccttaaatcagaatgggctgaact	acctcttcacaattgatctcacagc	am468072.2	14699-15676	978	697
39	ccatccaccagagtcacacattga	cctgcctaaggatttgggctaaga	am465204.2	26067-26950	884	604
40	ttgcatacctaaatagccgaagctg	gctgagttgatgatcaacagaatg	am426608.2	13688-14781	1094	814
51	ctaggtgtgatttcaccgattaaa	accataatcaaaactgacccaatc	am475418.1	2222-2822	601	321
77	cataacactgttttcgcatggac	tgtaccacctctttagggatgtt	am453700.1	1733-2456	724	444
94	gtacttttggttcaagggaacct	tgatagagtttccaccagtcct	am452220.1	653-1398	746	466
96	gtactcgttctgtcactgcatgg	atttccaaactgaaacctgaaaa	am486639.1	3209-4135	927	647
124	gttagcactctctcacccattgc	atccccaggagatgatgtctctt	am464667.1	2045-2794	750	469
134	gacaatgtggccaatatgcttaatc	gtccctggataaaaagcattcaacac	am427070.2	19349-19945	597	317
141	tccaagaattcagatgacaggac	gggtgttggaactgtttagatcc	am484943.2	13290-14062	773	493
154	ttagaattggcatgtccggca	gtatccaagttgttccgacga	am463712.2	2924-3850	927	647
181	tgcaacatcacggtgaagcagtag	taattatcaagctacggcactctgc	am432570.1	10682-11351	670	390
226	atcccctctagcattgagatagca	ggtcaccttctctacatggcatt	am481753.2	5695-6545	851	571
386	gtcattgcaaacctgaaccaaac	gtaggtgaatgcatttcgactgg	am445604.2	4115-4849	735	456
537	tggggttgagatatacacaaggagt	acacatcagctaacatggtttctgt	am444283.1	15800-16728	929	649
918	ggtactgcacgacatcatggca	ttacattgcatgcacgtgagtgtgt	am444702.2	9283-10167	885	602
1044	aactccgctgtgcatgtgggtg	ccaagaccttgaaggtctgg	am483827.2	37903-38316	414	149
1094	ctatgaaattgtctccatggggca	cctgtagatggagagctaaagccca	am431127.2	58438-58988	551	270
1102	gacaggctttgagcgggttagaa	taagcgggtcagattggagtgtt	am438637.2	14982-15788	807	534
1108	gctgattatagtgtggcaaaaccga	agcttgggaatgagatggaggaaagt	am468336.2	8472-9621	1150	860-875
1112	aaagagatgaaacactcggca	tgtttgcttgccttctacacc	am440201.2	17657-16731	927	631
1123	ggatgagcaaaactgtttgagactgg	tacatgtctgcagcgagactcac	am453488.2	7635-8424	790	523
1130	gtataatccctttgcatggagagc	tttaaagcatgccctctaggccctgg	am428913.2	4766-5588	823	575
1284	agagttgggattggacctcaatctt	gttcttcagccaatccatgagg	am447296.1	5770-6812	1043	812
1292	gcattgaaagccttccatggac	grrtgaaccagcggcctaactga	am436316.2	2604-3732	1129	839-899
a	ggtatgttggggcaactctg	gcctgtaggattcaggccaa	am460212.1	10781-11172	~670	392
b	tggacatggtttcagtactgca	gccataaccactctgagagaaga	am434350.1	19336-19712	~655	377
c	tggatacgacaactgggtttgc	tgcccagatcatgagaaataagga	am473535.2	13197-13655	~740	459
d	actgcattagctccagtgacagaa	ataggtsgactcacctggcgtg	am465754.1	17963-18550	588	307
e	ttgcctaacaagaatgcagaatcct	tcagcccatgggaaaccttaacta	am471981.1	49772-50217	446	320

3. Ergebnisse „Milestones“

1. Genetische Variation bei Pinot noir Klonen und Farbmutanten (Pinot blanc und Pinot gris) ist mittels der AFLP-Methode detektierbar. Entscheidend für die Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse sind stringente Versuchsbedingungen und eine überprüfbare Auswertungsmethode. Diese wurden optimiert und ein detailliertes Protokoll erstellt.
2. Die Identifikation von Pinot noir Klonen ist mittels AFLPs nicht seriös durchführbar. Die detektierte Variation ist vorhanden und klonspezifischer AFLP-Banden konnten zu SCAR Markern umgewandelt werden. Allerdings sind für die Fülle von Genotypen der Pinot Klonen mehrere dieser SCAR Marker notwendig. Eine kommerzielle Verwendung ist daher nicht möglich.
3. Es konnte eine Mutation detektiert werden, die bei lockerbeerigen Pinotklonen auftritt und bei kompakten Pinotklonen nicht. Es handelt um einen Sequenzunterschied: eine 4bp Deletion und ein SNP (C/T). Dieser Marker basiert auf dem Locus CF207762 (Goes da Silva et al. 2003) und ist kodierend für ein alpha-Expansin-Gen.
4. Ein mit der Lockerbeerigkeit assoziierter SCAR und ein CAPS Marker wurde entwickelt. Weitere Untersuchungen zeigen, dass der Locus heterozygot vorkommt und auf dem Chromosom 17 der genetische Karte kartiert werden konnte. Dieser Marker ist für die Marker-gestützte Selektion geeignet.
5. Weitere Untersuchungen mit anderen *Vitis* Genotypen zeigen, dass die Mutation Pinot-spezifisch ist und in veränderter Form bei anderen Rebsorten bzw. – arten auftritt.
6. Eine S-SAP-Methode zur Analyse genetischer Variabilität auf Basis universeller Transposon Primer wurde entwickelt und für Reben adaptiert. Die Methode hat eine höhere Auflösung für die Detektion von Sequenzunterschieden und erste Versuche zeigten eine genetische Variation von ca. 5% im Vergleich von fünf Pinotklonen. Klonale Variation konnte mittels dieses Versuches auf Mutationen im Bereich transpositioneller Sequenzen nachgewiesen werden.
7. Das Vorkommen und die Verteilung von Transposons wurden via *in silico* Analyse im Rebengenom untersucht (Benjak et al. 2009) und dienen als Grundlage für die Erforschung von spezifischen springenden Elementen den MITES. Diese eignen sich für die Entwicklung von molekularen Markern. Die *in silico* Analyse zeigte, dass im Rebengenom acht verschiedenen MITE Familien vorkommen aus denen eine Gruppe (mPifvine-3.1) sich aufgrund ihrer Struktur als potentielle Marker Kandidaten eignen
8. Die mPifvine-3.1 Gruppe wurde in wetbench Analysen untersucht und es konnten 5 verschiedenen funktionelle Mutationen identifiziert werden, die für die Entwicklung von Markern geeignet waren, die Transpositionen (Mutationen) phylogenetisch identifizieren

können.

9. Erstmals sind Daten über die Mutationsgeschichte der Rebe bekannt. Transpositionen im genetisch aktiven Bereich des Genoms haben bei der Entwicklung genetischer Ressourcen UND der Domestikation eine Rolle gespielt.

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Teilexperiment 1:

Die 32 Klone zeigen mit 99 % hohe genetische Similarität. Eine geringe Anzahl von Pinot noir Klonen (We M847, We M848, We M242, We M819, Ch9/18, Fr 1602) und ein Pinot gris Klon (Fr 49-207) weisen eine höhere Variation von bis zu 5 % auf. Die höchste genetische Variabilität besitzt die Pinot noir Gruppe (0,036205 +/- 0,019217) gefolgt von der Pinot gris Gruppe (0,023038 +/- 0,14484); die niedrigste hat die Pinot blanc Gruppe (0,003834 +/- 0,003069), Anhang Tabelle 2). Es wurden 72 (19,20 %) polymorphe Marker selektiert. Von den 32 Pinot Klonen konnten 5 Klon-spezifische Marker (1,13 %) detektiert werden. In der Pinot noir Gruppe (19 Klone) wurden 8 Klone identifiziert (2,13 %), in der Pinot gris Gruppe (8 Klone) elf (2,93 %) und in der Pinot blanc Gruppe (6 Klone) zwei (0,53 %).

Das Experiment mit bekannten, neutralen AFLP Markern diente der Evaluierung und Eruierung der detektierten klonalen Variation. Zur Qualitätsüberprüfung der produzierten Daten wurde ein stringentes Auswertesystem zur Bonitur der Haplotypen (Banden im Gel) entwickelt. Die Optimierung involviert die Optimierung der Gelmatrizen, (Reinheitsgrad verwendeter Chemikalien, zeitlicher Ablauf und äußere Bedingungen des Prozesses der Polymerisierung) Optimierung der PCR-Bedingungen der zweiten Amplifikation (Reduktion Primer-Dimer Bildung, Reduktion der Überlagerung der markierter Primer), Optimierung der Laufbedingungen im Sequenzierer, zusammengefasst im Protokoll (Anhang). Mittels Software (SAGA4 - LICOR Biosystems) wurden Detektionsschwellen für die Bonitur festgelegt. Wichtigster Faktor ist die systematische und qualitative Erfassung der Haplotypen. Hierbei wurde unterschieden in Deletionen, Insertionen, "solitäre Banden" (die immer reproduziert wurden, da sie Indikator für Kontaminationen sein könnten). Diese Kriterien wurden für alle folgenden Experimente zugrunde gelegt.

Das Ziel der Identifikation von Rebklonen durch neutrale AFLP-Marker wurde nicht erreicht. Der Grund liegt in der zu hohen Variabilität einzelner Klone und in der Gleichartigkeit anderer (Tabelle 3). Inzwischen sind adäquate Markersysteme einfach zugänglich, die sich besser für diese Versuchsfragen eignen.

Tabelle 3: Frequenzen der analysierten Pinot Klone.

Common Genotype	Genotype Frequency	“P. noir” (19)	“P. blanc” (8)	“P. gris (6)”
“9”	7	20 Gm Fr 10	3-31 Gm Fr 74 D57	2-26 Gm 2-15-34 Gm
“7”	3	FR 12L, 20-13 Gm, 2-6 Gm		
	1	We M847		
	1	We M898		
	1	We M842		
	1	We M819		
	1	1-86 Gm		
	1	1-36-4 Gm		
	1	FR 52/86		
	1	FR 54/102		
	1	FR 11		
	1	FR 1602		
	1	F 105S		
	1	INRA 777		
	1	CH 9/18		
	1	P.noir Précoce		
	1		3-31 Gm	
	1		FR 70	
“25/26”	2		FR 72 D55	
	1			FR 49-207
	1			D42
	1			D43
	1			H1

Teilexperiment 2:

Es konnte ein Marker detektiert werden, der bei lockerbeerigen Pinotklonen auftritt und bei kompakten Pinotklonen nicht. Es handelt um einen Sequenzunterschied: Eine 4bp Deletion und ein SNP (C/T). Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde der Versuch mehrfach wiederholt.

Es konnte ein Marker detektiert werden, der bei lockerbeerigen Pinotklonen auftritt und bei kompakten Pinotklonen nicht. Um diesen zur Anwendung weiter zu entwickeln wurde eine SNP-Genotyping-Methode für den Locus auf Basis der SCAR Marker entwickelt. Der SCAR Marker (ExpF12) zeigt eine C/T Transition (231 bp) und eine 4bp Deletion (219-222 bp), die lockerbeerigen Klone auftritt und bei kompakten Klone fehlt. SNP-Genotyping mittels CodeRED™ SNP Genotyping Kit (Fermentas, St Leon Rot, Germany) zeigt einen 22 bp - Peak (T “Allel”) für den lockerbeerigen (SNP2 Marker) und ein 25 bp - Peak (C “Allel”) bei den kompakten Klone (SNP1 Marker) (Abbildung 1). Die Methode hat den Nachteil, dass die 4bp Deletion vor dem Genotyping bekannt sein muss. Dies verringert die Praxistauglichkeit des Kits da die Sequenzinformation bekannt sein muss. Zudem erfordert SNP-Genotyping technisch anspruchsvolle Ressourcen, sodass ein CAPS Marker entwickelt wurde.

Um den Anwendungsbereich des Markers zu eruieren wurden zusätzlich zu den 14 Pinot noir Klone (Daten nicht gezeigt) weitere Pinot Mutanten untersucht, die ebenso wie Pinot Meunier die identische Mutation wie die kompakten Pinot Phänotypen zeigen. Der kleinbeerige Pinot noir Klon

20-13Gm zeigt den Marker für Lockerbeerigkeit. Die Sequenz für kompakte Trauben wurde in den Rebsorten Riesling, Roter Traminer und Chenin blanc identifiziert. Chardonnay zeigte den Marker für Lockerbeerigkeit. Das Screening von weiteren Rebsorten, zeigte dass die Mutation polymorph vorkommt. Cardinal (lockerbeerige Tafeltraube) zeigt eine 1 bp Deletion am locus 213 bp aber keine Deletion, und Weißer Gutedel hatte eine zusätzliche C/T Transition an 217 bp.

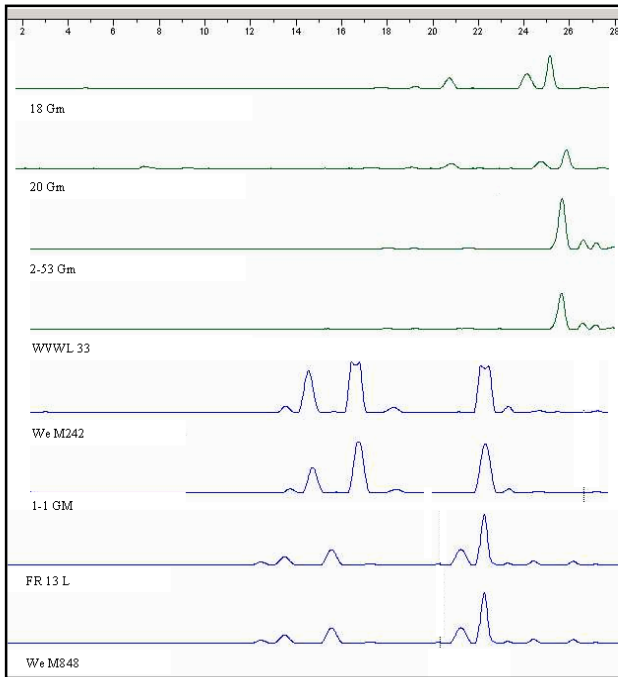


Abbildung 1: Die lockerbeerigen Klone (We M848; We M242, 1-1 Gm; Fr 13 L) zeigen den peak bei 22 bp und die kompakten (80 18 Gm; 81. 20Gm; 110. 2-53; 270. WVWL 33) bei 25 bp (Hoffmann et al. in prep).

Der auf Basis des SCAR Markers (ExpF12) entwickelte CAPS Marker (3.1.2) produziert zwei Amplifikationsprodukte, die der berechneten Größe entsprechen: 283 bp für lockerbeerige Klone; 287 bp für kompakte Klone. Alle getesteten Pinot Klone amplifizierten beide PCR-Produkte. Die Klonierung und Sequenzierung ausgewählter, reproduzierter PCR-Produkte zeigten die erwarteten Sequenzen für lockerbeerige respektive kompakte Pinotklone und zeigen damit auch, dass die Loci heterozygot im Pinot Genom vertreten sind (Abbildung 2).

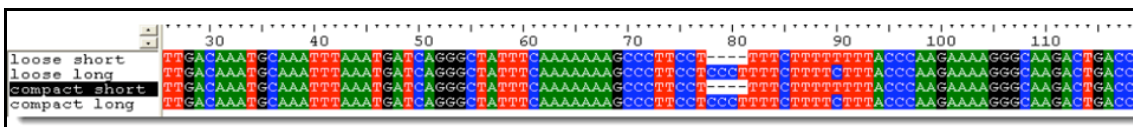


Abbildung 2: Die Banden des SCAR-Markers und die Restriktionsenzym-Verdauung wurden gelextrahiert und direkt sequenziert. Die lockerbeerigen und die kompakten Klone zeigen eine Doppelbande. Beide Banden wurden bei beiden Klonen analysiert: Das kurze Fragment zeigt eine „lockerbeerig“- Sequenz (4 bp indel, C/T transition), das längere hingegen die „kompakt“-Sequenz. (Hoffmann et al. in prep).

Um diese Annahme zu überprüfen wurde der Marker einer Segregationsanalyse bei einer ingezüchteten Pinotkreuzung und Population durch Pelsy et al. an der INRA in Colmar, Frankreich, unterzogen. Die Analyse zeigt, dass der "cluster compacity locus" auf Kopplungsgruppe 17 (Consensus Genetik Map, (Doligez et al. 2006)) kartiert werden konnte und dass er heterozygot ist. Die Sequenzanalyse der analysierten Consensussequenzen des mutierten Locus, der mit der Lockerbeerigkeit in Pinot noir Klonen gekoppelt ist, zeigte eine Übereinstimmung mit dem Expansin Gene Vlexp-1. Dieses gehört zur Gruppe der alpha-Expansine. Diese Gruppe entstammt Genfamilien (GO:0005554, GO:0009505, GO:0009826, GO:0009831, GO:000828), die für die Zellwandveränderungen und Zellwachstum verantwortlich sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Gen ursächlich mit der Lockerbeerigkeit zu tun hat ist groß. Weitere Untersuchungen zur Komplementierung unserer Hypothese durch ein Screening weiterer *Vitis*-Sorten und -Arten sowie über Metabolomic Profiling sind bereits gestartet. (Detailinformationen zum Ergebnisteil im Anhang).

Teilexperiment 3:

Anhand einer vergleichenden Analyse chimärer Rebklone der Rebsorten Pinot ssp. mittels RTransposon Display sollten spezifische Marker für die genetische Variabilität und korreliert mit der Beerenfarbe differenziert werden.

Die Auswertungen zeigen, dass es RT-basierte polymorphe Marker gibt, die klonale Variabilität detektieren. Diese detektierbare Variation ist RT-abhängig. Die Analysen zeigen, dass - im Unterschied zu allen Untersuchungen mit neutralen Markern - die Pinot gris Klone eine höhere Variabilität aufweisen als die Klone von Pinot blanc and Pinot noir. Ein genetischer Marker für die Beerenfarbe konnte bei den RT-Display Analysen bislang nicht analysiert werden. RT-spezifische intraklonale Mutationen konnten mittels des RT-Displays nachgewiesen werden.

Die Methode zeigte sich als nicht so robust wie erwartet. Die Reproduzierbarkeit war eingeschränkt und weitere Arbeiten zur Adaptation und Modifikation der Methoden wären vonnöten um dieses Experiment zu Ende zu führen. Aufgrund des Mutterschutzes von Petra Hoffmann wurde dieser experimentelle Teil nicht weiter verfolgt.

Teilexperiment 4:

(Detaillierte Informationen dieses Teilexperimentes in Wegscheider et al. 2009 (Anhang)).

Fünf Pinot Klone (kompakt-lockerbeerig-kleinbeerig) wurden im Vergleich mit *V. vinifera* cv. Domina mittels S-SAP untersucht. Sechs universelle RT Primer (F0100, F0103, F0104, F0105, F0113, F0117) kombiniert mit fünf selektiven *MseI* Primern (M22, M23, M24, M25, M27) produzierten 670 reproduzierbare Amplifikationsprodukte (50 bp - 350 bp) aus 30 Primer Kombinationen, davon waren 59 Marker polymorph (8,8 %). Die Eliminierung der outgroup

konnten 4,8 % polymorphe Marker analysiert werden. Das Dendrogramm (Abbildung 3) zeigt wie erwartet Domina als outgroup. Mittels dieser Analyse konnten die Klone 20Gm und 20-13Gm nicht unterschieden werden. Die genetische Similarität zwischen den Pinot Klonen lag bei 97,5 % .

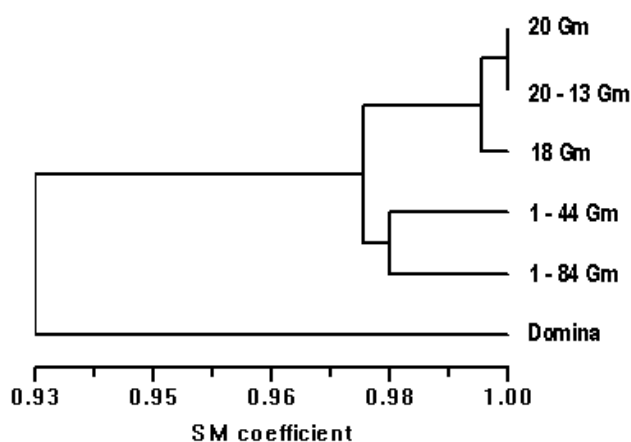


Abbildung 4: UPGMA basiertes Dendrogramm (nach SM index), das die genetische Verwandtschaft zwischen fünf Pinot noir-Klonen und einem Domina-Klon beschreibt; gewonnen mit einer retrotransposon display Methode (Wegscheider et al. 2009).

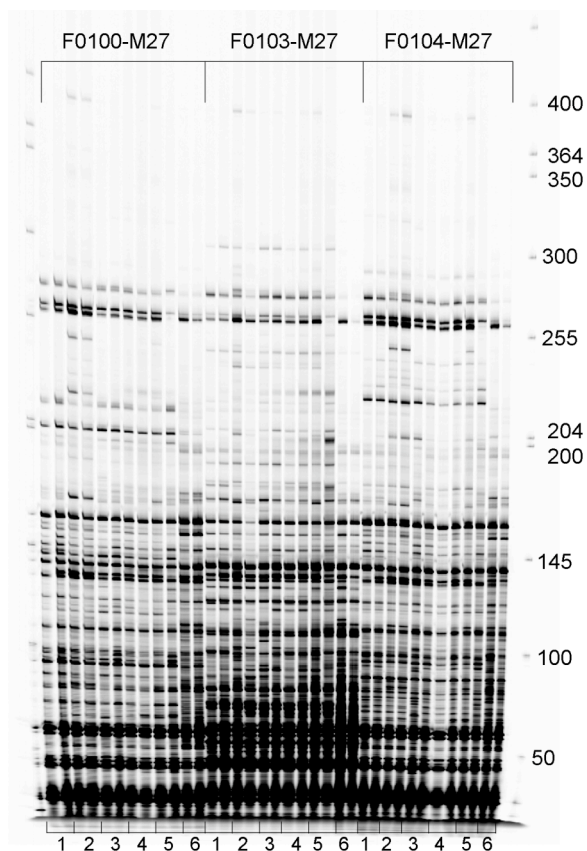


Abbildung 5: Gel mit 3 Primer-Kombinationen (F0100-M27, F0103-M27, und F0104-M27). Number 1-6 ist die Reihenfolge der Klone (mit Wiederholungen): 1=20Gm, 2=1-44Gm, 3=18Gm, 4=20-13Gm, 5=1-84Gm, 6=Domina (ST49) (Wegscheider et al. 2009)

Um die Methode zu überprüfen wurden vier polymorphe Banden zufällig ausgewählt und in 3-facher Wiederholung sequenziert. Die Sequenzen der Wiederholungen waren identisch. Die Sequenzlängen variierten von 160 and 245 bp und bestätigten die Spezifität der Banden zu outward-facing Retrotransposon-Primersequenzen. Aufgrund des Primer Designs (outward facing in Richtung der RT-PBS Region) sollten die Banden theoretisch teilweise zu LTR-Regionen gehören. Es konnten erwartungsgemäß keine Übereinstimmungen mit RT-Sequenzen bei Reben gefunden werden, da LTRs zwischen RT Familien oder Pflanzenarten und -sorten nicht konserviert sind.

Tabelle 4: Detaillierte Beschreibung der Polymorphismen, die mittels des Primer Set der sechs universellen Primer identifiziert wurden, Gesamtanzahl der analysierten Marker/polymorpher Marker für die Pinot bzw. Domina Klone (Wegscheider 2007).

Primer	Numbers of Markers	Total polymorphic Markers	Polymorphic markers for Pinot clones (%)	Polymorphic markers for Domina (outgroup)
F0100	174	20	13 (7,5 %)	7
F0103	132	10	5 (3,8 %)	5
F0104	171	15	6 (3,5 %)	9
F0105	69	4	2 (2,8 %)	2
F0113	54	4	2 (3,7 %)	2
F0117	70	6	4 (5,7 %)	2
Total	670	59	32 (4,8 %)	27

Teilexperiment 5:

(Detaillierte Informationen dieses Teilexperimentes in Benjak et al. Subm. (Anhang)).

MITES (miniature inverted-repeat transposable elements) sind eine spezielle Klasse von Transposons, die in homogenen Populationen in Genomen zahlreicher Pflanzen. Aufgrund ihrer Präsenz im Pflanzengenom (zahlreiche Kopien und Assoziationen mit Genen) eignen sie sich als funktionelle Marker und auch als Marker für phylogenetische Fragestellungen, die auch die evolutionäre Komponente der Domestikation angehen. In diesem Teilexperiment wurde untersucht ob sich Klone der Rebsorten Riesling und Pinot noir (und weitere Tabelle) im Bereich der MITES unterscheiden, bzw. ob MITES zur genetischen Differenzierung von Klonen beigetragen haben. Zunächst wurde das Rebengenom *in silico* auf die Präsenz von MITES untersucht und diese in Klassen und Familien gruppiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Identifizierte Familien (und Subfamilien) von MITES im Rebengenom durch *in silico* Analyse und deren Charakterisierungen.

MITE name	Average length in base pairs (standard deviation)	Aprox. copy number	Total coverage in kb	TIR length	TSDs length	Average identity	ESTs matching to MITES	Representative	Coordinates
<i>mPifvine-1.1</i>	715 ($\delta=27.2$)	51	37.2	20	3	0.88	1	AM485510.1	38610-37877
<i>mPifvine-2.n*</i>	~1 kb	54	91.7	26	3	0.77	2	AM452748.2	1881-2798
<i>mPifvine-3.1</i>	274 ($\delta=10.8$)	1298	355.8	18	3	0.83	~50	AM468072.2	15068-15345
<i>mPifvine-4.1</i>	1243 ($\delta=90.2$)	76	94.5	11	3	0.81	1	AM450168.2	3569-4849
<i>mHatvine-2.1</i>	769 ($\delta=14.4$)	22	16.9	23	8	0.92	2	AM436283.2	16403-17173
<i>mHatvine-3.1</i>	740 ($\delta=77.7$)	30	22.2	16	8	0.71	3	AM458859.2	11690-12492
<i>mHatvine-10.1</i>	1274 ($\delta=23.7$)	20	22.9	11	8	0.89	0	AM432725.2	460-1725
<i>mCactavine-4.1</i>	3243 ($\delta=23.8$)	30	97.3	6	3	0.84	31	AM457287.1	34741-37976

Im Zuge der Datenanalyse und deren Interpretation zeigte sich, dass einige der identifizierten MITES nicht charakteristische Merkmale aufweisen (*mCactavine-4.1*; *mHatvine-10.1*, *mPifvine-2.n*, und *Pifvine-4.1*). Alle anderen Familien zeigten, neben den eigenen typischen "internal" Sequenzen

auch Sequenzen des Rebengenoms und legen daher nahe, dass es auch Reben sogenannte PackMITES gibt, die Reben-DNA besetzen, mobilisieren und duplizieren können.

Potentielle Transduplikationen von Genen durch diese Pack MITES wurden *in silico* untersucht und führten zu einer Gruppierung dieser Elemente in 13 Sub-Familien (Tabelle 6). Transduplikationen sind ein wichtiger Mutationsmechanismus der zu positiver Selektion führen kann, da aktive Genbereiche dupliziert werden können und es zu einer verstärkten Genfunktion kommen kann.

Tabelle 6: Charakterisierung der transduplizierten Sequenzen durch PackMITES und Gruppierung dieser Element in 13 Subfamilien.

mPifvine-2 subfamily	Copy number	Accession n° for the representative	Coordinates	Transduplication in bp	Genomic source of transduplication	Identity of the original sequence to its transduplication	Predicted protein	Tentative protein annotation	Transduplicated exons
1	6	AM452748.2	1881-2798	500	AM462940.1	88%	-	Thaumatococcus-like	yes
2	4	AM442314.2	17623-19508	1300	AM449452.1	94%	CAO21921.1	BAH-AAA-containing protein	yes
3	4	AM477430.2	3327-5005	800	AM441647.2	93%	CAN62993.1	Glycosyl transferase	yes
4	12	AM426982.2	5977-8628	700	AM466170.2	91%	-	ABC transporter (pseudogene)	yes
				1000	AM461442.1	86%	-	Protease II	yes
				95	AM475940.1	91%	CAO66703.1	Unknown protein	yes
5	1	AM447383.2	3750-4593	400	CU459360.1	83%	CAO66902	DUF1296-containing protein	yes
6	2	AM467559.2	7724-9445	700	AM437259.2	91%	CAN82620.1	Glycosyl hydrolase	yes
7	6	AM436343.2	7645-9489	~1000	?	-	similar to CAO46980.1	Unknown protein	?
8	6	AM449479.2	9036-10309	80	?	-	similar to CAO40038.1	Sec15-containing protein	yes
				100	?	-	similar to CAO49645.1	Unknown protein	yes
				600	AM463124.2	91%	CAO39675.1	RING finger	yes
9	12	AM445491.2	6050-7622	830	AM452971.1	82%	-	-	no
10	4	AM429887.2	6356-7627	630	AM425582.2	92%	-	-	no
11	2	AM432699.2	8138-9741	700	AM458636.2	92%	CAN72319.1	Serine protease	yes
12	4	AM431974.2	47527-48887	860	AM471293.1	92%	CAO46017.1	Sulfate transporter like protein	yes
13	2	AM433436.2	1665-2724	545	AM450890.2	97%	CAO42680.1	Pectinesterase	yes

Ogleich Elemente aus acht Familien und zahlreichen Subfamilien identifiziert wurden, zeigt nur eine Sub-Familie mPifvine-3 Potential für weitere Untersuchungen zur genetischen Variabilität bzw. klonalen Variabilität bei der Rebe auf. Dieses Element hat die übliche MITE Größe und kommt in sehr hoher Kopienzahl, über das Genom verteilt, vor. Alle der 1200 mPifvine-3.1 Kopien haben einen sehr ähnliche Größe und die Tatsache, dass die Sequenzsimilarität 86% der 90% ähnlichster Kopien beträgt, weist auf eine relative kürzliche Amplifikation in der *Vitis*-Evolution hin (Abbildung 6)

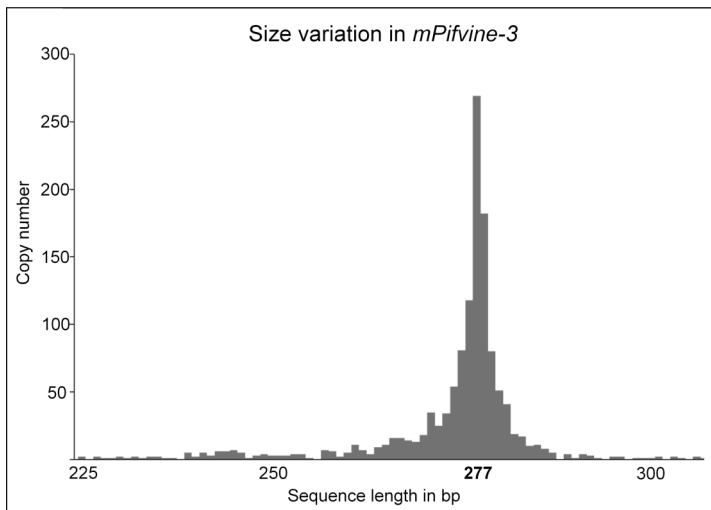


Abbildung 6: Variation der Sequenzlängen bei MPifvine-3.1.

Die Verteilung der mPifvine3.1. Elemente wurde in silico am Genom von Pinot noir sowie in einem wetbench Ansatz untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass der Großteil der identifizierten Elemente sich im EXON Bereich befinden und damit via EST Datenbanken überprüft werden können. Über 50 verschiedenen ESTs konnten identifiziert werden, die sich innerhalb der 3'UTR Region verschiedener Gene befinden. In wenigen Fällen zeigte sich, dass verschiedenen ESTs, die das gleiche Gen kodieren, polymorphe Bereiche (MITE-induced) aufweisen. Das könnte das Ergebnis der Transposition von Insertionen zwischen verschiedenen Rebsorten oder Klonen sein; bzw. könnte auf die Existenz zweier Allele des gleichen Gens (Heterozygotie) in der gleichen Sorte hinweisen. Beide Hypothesen konnten durch einen wetbench Ansatz bestätigt werden (Abb. 7).

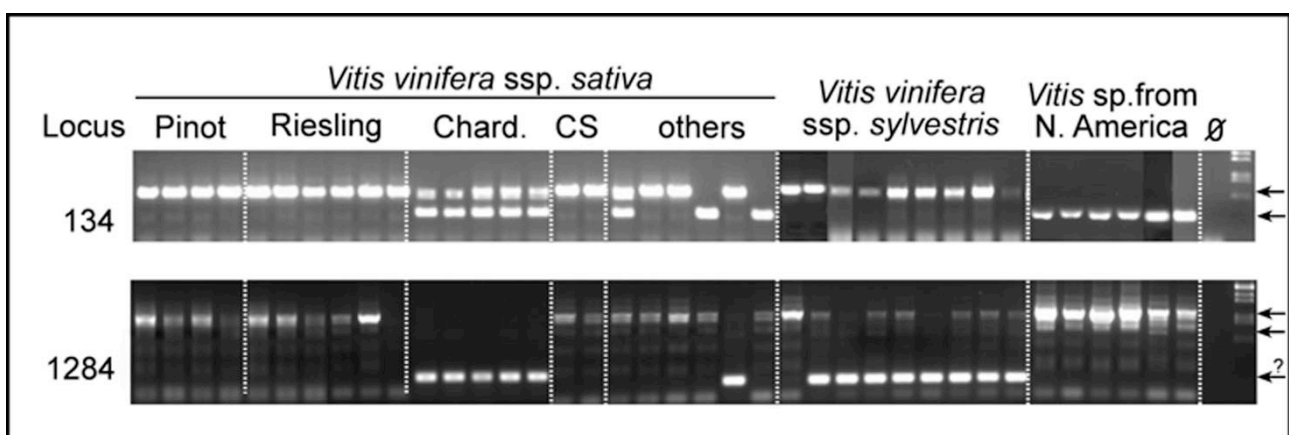


Abbildung 7: Analyse des mPifvine-3.1 Insertions - Polymorphismus. PCR Reaktionen wurden durchgeführt mit flankierenden Primern für mPifvine-3.1 Insertionen an 2 gewählten Loci. Die Abbildung zeigt verschiedene Gele, die zusammengesetzt sind, sodass die Reihenfolge der Genotypen in der Tabelle (Anhang) gewahrt ist. Pfeile zeigen die erwarteten Banden für Insertionen und "leere" Loci. Im Locus 1284 sind nur Banden mit der Insertion dargestellt sowie ungewöhnliche (nicht erwartete) kleinere Banden, die mit einer Deletion des Allels einhergehen.

Um die Evolution des Locus näher zu untersuchen wurde das Screening mit 25 Genotypen und an 5 selektierten Loci durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass einige der Loci bereits in der Wildrebe (*V. vinifera* ssp. *silvestris*) sowie in den nativen amerikanischen *Vitis*-Arten vorhanden waren und somit möglicherweise bei der Domestikation der Kulturrebe beteiligt waren. Alle Insertionen, die gefunden wurden zeigten neue "transcription termination sites" für die Gene, in die sie inseriert wurden. Die Insertion "e" ist wahrscheinlich eine sehr alte Mutation, die vor der Trennung zwischen europäischen und amerikanischen *Vitis*-Arten entstand, und die wahrscheinlich innerhalb untersuchten *Vitis*-Arten fixiert ist. Die Insertion "d" ist dagegen fixiert in den europäischen Art(en) und kommt in den amerikanischen Arten nicht vor. Die übrigen Insertionen sind hoch polymorph und kommen scheinbar randomisiert verteilt in den analysierten Kulturreben vor. Zwei von diesen ("b" und "c") kommen auch in europäischen Wildreben vor und geben Hinweise darauf, dass sie bereits vor der Domestikation existent waren. "a" dagegen ist erst nach der Domestikation aufgetreten und kommt nur in den Kulturreben, die hier getestet wurden vor (Abbildung 8). Klonale Variation wurde bislang nicht untersucht.

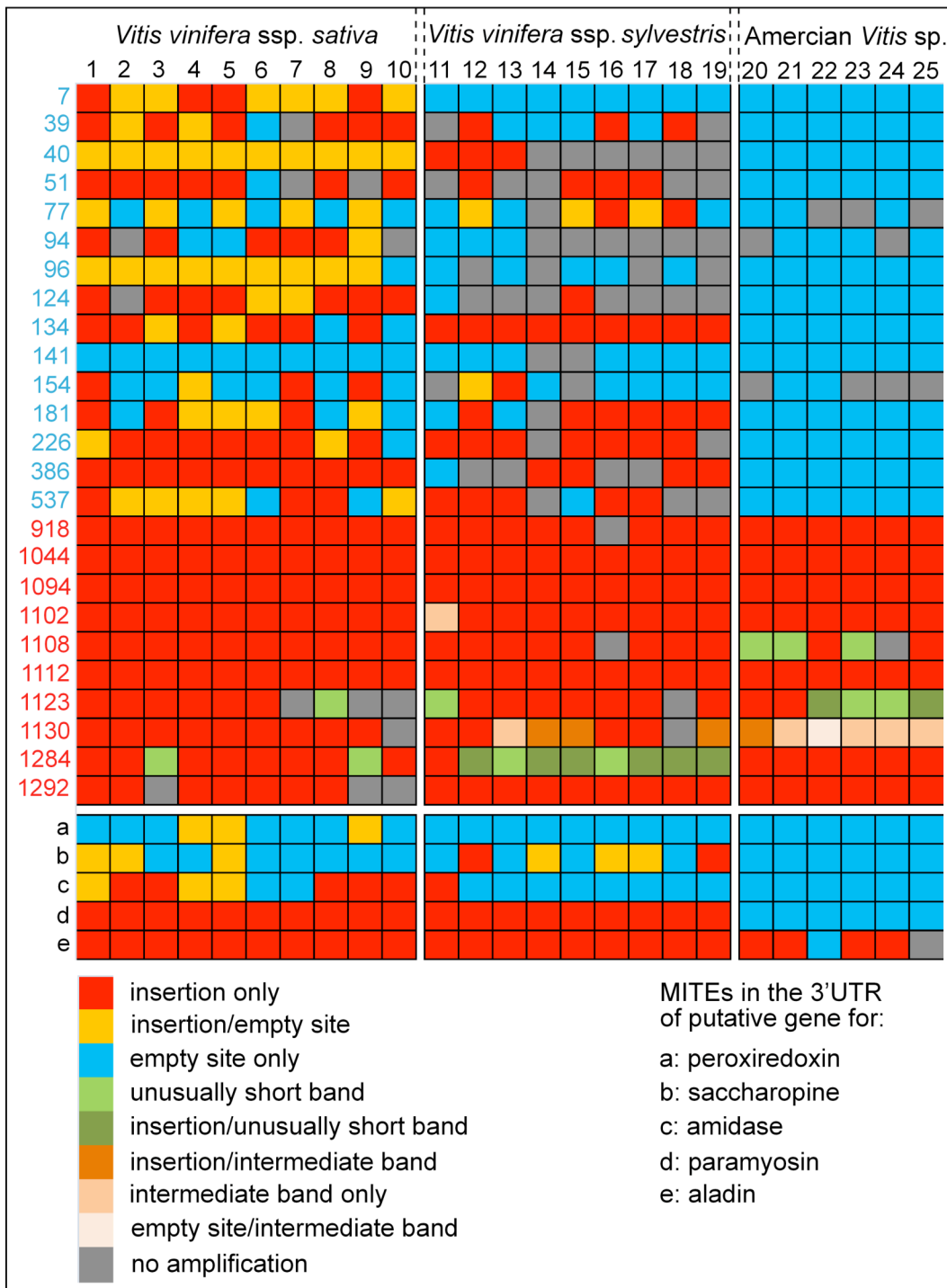


Abbildung 8: Zusammenfassung der Analyse der mPifvine-3.1 Insertions Polymorphismen. Darstellung der PCR-Amplifikationen verschiedener Loci von 25 Genotypen (Proben entsprechen der Nummerierung in Tabelle, Anhang). Nummern und Buchstaben der linken Spalte entsprechen den Namen der Loci; die Buchstaben (a-e) entsprechen den Insertionen der mPifvine-3.1 Elemente.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

1. Klonale Fingerprints auf Basis neutraler AFLP-Marker sind zur Differenzierung von Rebklonen geeignet und können zur Evaluierung und Management von genetischen Ressourcen eingesetzt werden. Die Identifikation auf Basis AFLP-gestützter Fingerprints ist nicht zufriedenstellend möglich.
2. Der CAPS Marker für die Lockerbeerigkeit kann zur Marker gestützten Selektion bei Pinotklonen eingesetzt werden. Zur Zeit wird (außerhalb des Rahmens dieses Projektes) an einer Datenbank für die Mutation am gleichen Locus gearbeitet um ein Screening auch bei anderen Rebsorten- und klonen zu ermöglichen.
3. Die genetische Variation bei Klonen durch Transposition ist niedriger als erwartet. Eine Gefährdung von Klonenmaterial durch Stresseinwirkung mit Folge der natürlichen Aktivierung von Retrotransposons (z.B. bei der Behandlung in der Rebschule) ist daher als eher gering einzustufen aber nicht auszuschliessen.
4. Die *in silico* Analyse von transpositionellen Elementen bei der Rebe zeigte, dass aus der Familie der MITES Marker entwickelt werden konnten, die phylogenetische Analysen in zeitlich definierten Clustern erlauben. Diese Marker sind von großer Bedeutung für das Verständnis der Evolution der genetischen Ressourcen bei der Weinrebe.

4. Zusammenfassung

Das Teilprojekt „Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß genetischer Variation traditioneller Rebsorten im Hinblick auf die Erhaltung genetischer Ressourcen“ hatte die Erforschung der genetischen Variation der Weinrebe mittels neutraler genetischer Marker und Evaluierung dieser Marker auf ihre Eignung für „klonale Fingerprints“ zum Ziel. Weiter sollten genetische Mutationen mit Auswirkungen auf den Phänotyp am Beispiel der Lockerbeerigkeit untersucht und ein Marker zur Anwendung etabliert werden. Zudem sollten molekulare Mechanismen für die klonale Variation (z.B. Chimaerismus, Transposition, Retrotransposition) erforscht werden.

Das Projekt wurde schrittweise in fünf Teilexperimenten geplant und ausgeführt. Diese waren:

- (1) Erforschung der genetischen Variation in Pinot noir Klonen mittels neutraler Marker und Erstellung „klonaler Fingerprints“ zur Grundlage für die weiteren molekulargenetischen Analysen,
- (2) Erforschung molekularer Marker assoziiert mit der Lockerbeerigkeit bei Pinot noir Klonen,
- (3) Erforschung des Anteils Retrotranspositioneller Variation bei der genetischen Variation bei Pinot noir, blanc und gris Klonen,
- (4) die Erforschung des Anteils Transpositioneller Variation bei der genetischen Variation bei Pinot noir Klonen und

(5) die Erforschung von genetischen Markern für die Identifikation von genetischen Ressourcen bei der Weinrebe.

Es zeigte sich, dass genetische Variation bei Pinot noir Klonen und Farbmутanten (Pinot blanc und Pinot gris) mittels der AFLP-Methode detektierbar ist. Entscheidend für die Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse sind stringente Versuchsbedingungen und eine überprüfbare Auswertungsmethode. Diese wurden optimiert und ein detailliertes Protokoll erstellt. Allerdings ist nach heutigem Kenntnisstand die Identifikation von Pinot noir Klonen mittels AFLPs seriös nicht durchführbar. Zwar konnten klonspezifische AFLP-Banden zu SCAR Markern umgewandelt werden, allerdings sind für die Fülle von Genotypen der Pinot Klonen zahlreiche dieser SCAR Marker im Set notwendig. Eine kommerzielle Verwendung ist nicht möglich.

Wir konnten einen Locus identifizieren, der mit dem phänotypischen Merkmal Lockerbeerigkeit bei Pinot noir assoziiert ist. Die mutierte Sequenz zeigt eine 4 bp Deletion in Kombination mit einem C/T SNP. Die mutierte Region befindet sich innerhalb eines Exons (7877 – 8186 bp von AM48259). Ein SCAR Marker (De11) und ein CAPS Marker (ExpF12) wurden entwickelt, reproduziert und bestätigt. Beide Marker bestätigen dass der Locus heterozygot in Pinot-Klonen vorkommt. Der SCAR Marker konnte auf Chromosom 17 der genetischen Karte (Consensus, Doligez et al.) kartiert werden. Ein Screening von weiteren Rebsorten zeigt, dass der Locus auch bei anderen Rebsorten existiert und Variabilität zeigt.

Neben den stabilen Markern, die essentiell für die Züchtung und Selektion von Sämlingen durch markergestützte Selektion sind; spielen im Weinbau „schnelle Mutationen“ durch aktive springende Gene (Transposons, Retrotransposons) eine große Rolle. Eine S-SAP-Methode zur Analyse genetischer Variabilität auf Basis universeller Transposon-gestützter Primer wurde entwickelt und für Reben adaptiert. Die Methode hat eine höhere Auflösung für die Detektion von Sequenzunterschieden und erste Versuche zeigten eine genetische Variation von ca. 5% im Vergleich von fünf Pinotklonen. Klonale Variation konnte mittels dieses Versuches auf Mutationen im Bereich transpositioneller Sequenzen nachgewiesen werden. Das Vorkommen und die Verteilung von Transposons wurden via *in silico* Analyse im Rebengenom untersucht (Benjak et al. 2009) und dienten als Grundlage für die Erforschung von spezifischen springenden Elementen den MITES. Diese eignen sich für die Entwicklung von molekularen Markern. Die *in silico* Analyse zeigte, dass im Rebengenom acht verschiedenen MITE Familien vorkommen aus denen eine Gruppe (mPifvine-3.1) sich aufgrund ihrer Struktur als potentielle Marker Kandidaten eignen.

Die mPifvine-3.1 Gruppe wurde in *wetbench* Analysen untersucht und es konnten 5 verschiedenen funktionelle Mutationen identifiziert werden, die für die Entwicklung von Markern geeignet waren,

die Transpositionen (Mutationen) phylogenetisch identifizieren können. Erstmals sind Daten über die Mutationsgeschichte der Rebe bekannt. Transpositionen im genetisch aktiven Bereich des Genoms haben bei der Entwicklung genetischer Ressourcen und der Domestikation eine Rolle gespielt.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen, ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Die gegenübergestellten Zielen entsprechen den Hauptzielen des Projektes. Zwischenziele wurden in den Zwischenberichten in gleicher Weise eruiert und analysiert. Änderungen des „großen“ experimentellen Designs sind nicht erfolgt. Aufgrund der personellen Änderung und parallel publizierter Ergebnisse wurden die experimentellen Schwerpunkte verlagert.

Zielplanung 1:

Erforschung der genetischen Variation der Rebsorte Pinot noir mittels neutraler genetischer Marker und Evaluierung dieser Eignung für „klonale Fingerprints“.

Status Quo:

1. Klonale Variation mittels AFLP-System detektierbar.
2. Methode optimiert.
3. „Klonale Fingerprints“ zur Unterscheidung möglich
4. Identifikation von Klonen nicht möglich.

Zielplanung 2:

Erforschung von genetischen Mutationen mit Auswirkungen auf den Phänotyp

Status Quo:

1. Molekulare Hintergründe an einem Locus für Lockerbeerigkeit analysiert
2. Selektionsmarker für den Phänotyp Lockerbeerigkeit entwickelt, getestet und kartiert.
3. Das Merkmal der Beerenfarbe wurde nicht behandelt, da zwischenzeitlich von anderen Gruppen erforscht.

Zielplanung 3:

Erforschung von molekularen Mechanismen (Retrotransposition), die zur genetischen Variation von Rebklonen führen

Status Quo:

1. Untersuchungen mit LTR-Sequenzen in Kombination mit AFLP durchgeführt,

2. Methoden zeigten nicht die erforderliche Reproduzierbarkeit, die für die Etablierung von Systemen für die klonale Variation erforderlich sind. Dieser experimentelle Ansatz wurde nicht weiter verfolgt.
3. In einem zweiten Ansatz wurde mit universellen Transposon-Primern gearbeitet mit denen reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden.
4. Klonale Variation ist bei Pinot noir Klonen vorhanden.

Zielplanung 4:

Erforschung des Anteils transpositioneller Variation an der genetischen Variation bei Pinot noir Klonen

1. Auf Basis einer extensiven in silico Analyse wurde die Verteilung von Transposons im Genom der Reben (*V. vinifera* cv. Pinot noir) und die Verbreitung und Distribution von MITES untersucht.

Zielplanung 5:

Entwicklung von Markern, die zur Identifikation genetischen Materials bei Reben führen.

Status Quo:

1. Ein Selektionsmarker wurde entwickelt (siehe auch Zielplanung 2)
2. MITES eignen sich als potentielle Marker für die Evaluierung genetischer Ressourcen bei Reben.
3. Erstmals wurden spezifische Marker für transpositionelle Mutationen in aktiven Genen entwickelt und zur Anwendungsreife gebracht.
4. Ihre Anwendung für Rebklone muss noch weiter adaptiert werden.

Gesamtzielplanung:

Status Quo: Beitrag des Teilprojektes 2

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass genetische Variation auf klonaler Ebene auf Basis von neutralen Mutationen, Retrotranspositionen und Transpositionen vorhanden ist. Die Implementierung von MITE-Markern erbrachte den Nachweis, dass Transpositionen auch bei der Entwicklung der Kulturrebe eine Rolle gespielt haben. Genetische Variation bei Rebklonen konnte mit allen eingesetzten Methoden sowohl im kodierenden wie auch in nichtkodierenden Bereichen des Reben-genoms nachgewiesen werden.

Die Detektion klonaler Mutationen kann die Basis für erfolgreiche Entwicklung von Selektionsmarkern sein, wie bei der Entwicklung eines Markers für die Lockerbeerigkeit, der als wichtigster praktischer Beitrag für die Rebenzüchtung und Konservierung gilt. Fingerprinting Methoden für die Evaluierung und Erueierung der genetischen Diversität müssen gezielt eingesetzt werden. Optimierte Protokolle wurden erstellt und dienen dem standardisierten Einsatz.

Literaturverzeichnis

- Benjak, A., Konradi, J., Blaich, R., and Forneck, A. (2006): Different DNA extraction methods can cause different AFLP profiles in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 45, 1, 15-21.
- Benjak, A, Forneck, A, Casacuberta, JM (2008): Genome-Wide Analysis of the "Cut-and Paste" Transposons of Grapevine. . *PLoS One*, 3(9), e3107.
- Benjak, A., Boue, S., forneck,A., Casacubert, J.M. (in prep): Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.). in revision *Genome Biology and Evolution*.
- Doligez A, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Di Gaspero G, Laucou V, Merdinoglu D, Meredith CP, Riaz S, Roux C, This P. (2006): An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *TAG*: 113:369-382.
- Goes da Silva, F., Iandolino, A., Lim, H., Baek, J., Leslie, A., Xu, J., Jones, K., Cook, D. 2003. Expressed sequence tags from *Vitis vinifera* „Cabernet sauvignon“ berries at various development stages. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Cited 23.8.07
- Hoffmann, P., Vaclavicek, A., Pelsy, F., Blaich, R., Forneck, A., (in prep): An Expansin Gene – linked Polymorphism is associated to Loose – Clustered Phenotypes in “Pinot noir” (*Vitis vinifera* ssp.)
- Hoffmann, P., Vaclavicek, A., Blaich, R., Forneck, A. (2006): A SNP Marker can differentiate loose clustered Clones of Pinot noir (*V. vinifera* L.). In: Peterlunger et al.: International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2-6th July 2006, Udine, Italy
- Forneck, A. 2005. Plant Breeding: Clonality - A concept for stability and variability during vegetative propagation. In *Progress in Botany*. U. L. K. Esser, W. Beyschlag, J. Murata (Ed.), pp. 165-183. Springer Berlin Heidelberg, Germany.
- Forneck, A.; Konradi, J.;Blaich, R; (2003) Über die genetische Diversität der Burgunderreben und ihrer Klone. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch*, 54, 71-78
- Jaillon, O., J. M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Hugueneu, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyere, A. Billault, B. Seguren, M. Gouyvenoux, E. Ugarte, F. Cattonaro, V. Anthouard, V. Vico, C. Del Fabbro, M. Alaux, G. Di Gaspero, V. Dumas, N. Felice, S. Paillard, I. Juman, M. Moroldo, S. Scalabrin, A. Canaguier, I. Le Clainche, G. Malacrida, E. Durand, G. Pesole, V. Laucou, P. Chatelet, D. Merdinoglu, M. Delledonne, M. Pezzotti, A. Lecharny, C. Scarpelli, F. Artiguenave, M. E. Pe, G. Valle, M. Morgante, M. Caboche, A. F. Adam-Blondon, J. Weissenbach, F. Quetier and P. Wincker. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla, *Nature* 449 (7161): 463-467.
- Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto and H. Hirochika. 2004. Retrotransposon-Induced mutations in grape skin color. *Science* 304: 982.
- Konradi, J., Blaich, R., Forneck, A. (2007): Genetic variation among clones and sports of "Pinot noir" (*Vitis vinifera* L.). *EUR J HORTIC SCI*, 72(6).
- Moisy, C., Gassison, K.E., Meredith, C.P., Pelsy, F. (2008) Characterization of ten novel Ty/copia-like retrotransposon families of the grapevine Genome. *MC Genomics*. 2008; 9: 469.
- Pelsy, F., Merdinoglu, D., 2002: Complete sequence of Tv1, a family Ty1 copia-like retrotransposons of *Vitis vinifera* L., reconstituted by chromosome walking. *Theor. Appl. Genet.*

105, 614-621.

Rühl, E., H. Konrad, B. Lindner; 2002: Möglichkeiten der Qualitätssteigerung durch Klonenselektion bei Reben am Beispiel des Blauen Spätburgunders. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung XXXVII. Vortragstagung, Hannover, 2002, p. 197 – 200.

Rühl, E.H., Konrad, H., Schmitt, K, Pfeiffer, W.; 2000: Clonal variation in Pinot Noir. 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology, 16-20 January, 2000, Technical Paper.

Velasco, R., A. Zharkikh, M. Troggio, D. A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss, M. Pindo, L. M. Fitzgerald, S. Vezzulli, J. Reid, G. Malacarne, D. Iliev, G. Coppola, B. Wardell, D. Micheletti, T. Macalma, M. Facci, J. T. Mitchell, M. Perazzolli, G. Eldredge, P. Gatto, R. Oyzerski, M. Moretto, N. Gutin, M. Stefanini, Y. Chen, C. Segala, C. Davenport, L. Dematte, A. Mraz, J. Battilana, K. Stormo, F. Costa, Q. Tao, A. Si-Ammour, T. Harkins, A. Lackey, C. Perbost, B. Taillon, A. Stella, V. Solovyev, J. A. Fawcett, L. Sterck, K. Vandepoele, S. M. Grando, S. Toppo, C. Moser, J. Lanchbury, R. Bogden, M. Skolnick, V. Sgaramella, S. K. Bhatnagar, P. Fontana, A. Gutin, Y. Van de Peer, F. Salamini and R. Viola. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE 2 (12): e1326.

Verriès, C., C. Bès, P. This, C. Tesnière, 2000: Cloning and characterization of Vine-1, a LTR retrotransposon-like element in *Vitis vinifera* L., and other *Vitis* species. Genome 43, 366-376.

Vos, P., R. Hogers, B. Marjo, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.

Wegscheider, E., Benjak, A., Forneck, A. (2009): Clonal Variation in Pinot noir Revealed by S-SAP involving Universal Retrotransposon-Based Sequences. AM J ENOL VITICULT, 60:1, 104-109.

Kurzfassung (max. 1927 Zeichen)

Das Teilprojekt hatte die Erforschung der genetischen Variation der Weinrebe mittels neutraler genetischer Marker und Evaluierung dieser Marker auf ihre Eignung für „klonale Fingerprints“ zum Ziel. Weiter sollten genetische Mutationen mit Auswirkungen auf den Phänotyp am Beispiel der Lockerbeerigkeit untersucht und Marker für die Detektion genetischer Diversität zur Anwendung etabliert werden. Zudem sollten molekulare Mechanismen für die klonale Variation erforscht werden.

Das Projekt wurde fünf Telexperimenten geplant und ausgeführt. Es zeigte sich, dass genetische Variation bei Pinot noir, P. blanc und P. gris Klonen mittels der AFLP-Methode detektierbar ist. Entscheidend für die Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse sind stringente Versuchsbedingungen und eine überprüfbare Auswertungsmethode. Diese wurden optimiert und ein detailliertes Protokoll erstellt.

Wir konnten einen Locus identifizieren, der mit dem phänotypischen Merkmal Lockerbeerigkeit bei Pinot noir assoziiert ist. Die mutierte Sequenz zeigt eine 4 bp Deletion in Kombination mit einem C/T SNP. Die mutierte Region befindet sich innerhalb eines Exons (7877– 8186 bp AM48259). Ein CAPS Marker wurde entwickelt und als Selektionsmarker etabliert.

Eine S-SAP-Methode zur Analyse genetischer Variabilität auf Basis universeller Transposon-gestützter Primer wurde entwickelt und für Reben adaptiert. Klonale Variation wurde mittels einer neu entwickelten Methode (Wegscheider et al. 2009) bei Pinot noir Klonen nachgewiesen. Das Vorkommen und die Verteilung von Transposons wurden via *in silico* Analyse untersucht (Benjak et al. 2009) und diente als Grundlage für die Erforschung von spezifischen Elementen den MITES, die für die Entwicklung von molekularer Marker geeignet sind. Aus acht MITE Familien eignete sich eine Gruppe (mPifvine-3.1) für die Entwicklung genetischer Marker. Diese Gruppe wurde in *wetbench* Analysen untersucht und es konnten funktionelle Mutationen = aussagekräftige Marker identifiziert werden. Erstmals sind Daten über die Mutationsgeschichte der Rebe bekannt. Transpositionen im genetisch aktiven Bereich des Genoms haben bei der Entwicklung genetischer Ressourcen und der Domestikation eine Rolle gespielt.

Abstract (3345 Zeichen)

Conservation of genetic resources of grapevine cultivars through structural genomic analyses and fingerprinting techniques

Forneck, A^{1,2}., Benjak, A¹., Hoffmann, P^{1,2}., Blaich, R¹.

¹University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, A-1190 Vienna, Austria.

²University of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany.

Introduction

The grapevine (*Vitis vinifera* L.) is a widely cultivated crop that has accompanied the development of human culture since its domestication in the Neolithic period (8500-4000 BC). Cultivated grapevine is supposed to have been domesticated from wild grapevine populations (*V. vin.* spp. *sylvestris*). Although sexual crossing has been a major driver of grapevine evolution, its vegetative propagation enhanced the impact of somatic mutations and has been important for grapevine diversity.

The aims of our study was to use, evaluate and create fingerprinting techniques for the detection of genetic variation within grapevine cultivars; to search for markers associated with desired phenotypes basing on mutations and develop applicable selection markers; to search for clonal variation based on retrotransposition and transposition and to create markers for the evaluation of genetic resources in *Vitis*.

Methods

An extensive set of grapevine samples mainly *V. vinifera* cv. Pinot noir and Riesling and their clones have been employed for the study. A range of genetic fingerprinting assays have been used which have been adapted or newly developed in the framework of this study and are given by reference for further investigation. AFLP (Forneck et al. 2009, Konradi et al. 2007); S-SAP implementing *Vitis* LTR-sequences (Hoffmann et al. 2006), S-SAP implementing universal retrotransposon-based primer (Wegscheider et al. 2009), Transposon display (Wegscheider et al. 2009), Transposon mining and *in silico* analysis (Benjak et al. 2009)

Results

The degree of clonal variation in *Vitis* depends on the applied marker system and on the scope and type of plant samples. A model study was employed for the aim of evaluating and modifying the AFLP techniques for the use to clonal fingerprint grapevine clones. A stringent protocol has been

developed including and extension on visual band counting (Forneck et al. 2009). A CAPS marker associated with the loose-clustered phenotype in Pinot was developed basing on a 4 bp deletion combined with a C/T transition and can act as selection marker as well (Hoffmann et al in prep.). A S-SAP method using universal primers for retrotransposons was developed. Clonal Variation was detected and confirmed to result from transposition events. (Wegscheider et al. 2009). A genome-wide screening was performed and showed that MITEs are abundant in grapevine and are frequently inserted within the UTRs of genes. MITE insertions are highly polymorphic among grapevine cultivars, which frequently generate transcript variability. MITEs have greatly contributed to the grapevine genetic diversity which has been used for grapevine domestication and breeding.

Conclusion

Genetic variation among grapevine cultivars (clonal variation) is common and assessable through most genetic fingerprinting techniques. These techniques need to meet stringent conditions and care in the evaluation process. We have developed a marker associated with the loose-clustered phenotype for Pinot cultivars which has been transformed to a CAPS marker and can be employed for MAS. Transposition seem to be one of the major drivers for genetic diversity in grapevine, that has been also involved in the domestication process of the grape. We also showed that transposition events create new marker classes basing on MITE elements that allow to study mutation activity.

Acknowledgements

This research project (04HS022) has been financially supported by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection of Germany through the Agency for Agriculture and Food (BLE).

Anhang

Anhang 1:

Weiterführende Ergebnisse für das Telexperiment 1:

Table 2. Molecular diversity indices (Tajima 1983) von Pinot Klongruppen (Beerenfarbe)

“Pinot” cultivar (N)	Average gene diversity over loci
“Pinot noir” (19)	0.036 +/- 0.019 a ^a
“Pinot gris” (8)	0.023 +/- 0.014 a
“Pinot blanc” (6)	0.004 +/- 0.003 a
“Pinot” clones total (33)	0,026 +/- 0,0145

Note: ^aindices followed by the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$).

Optimiertes Protokoll für die Durchführung von AFLP-Analysen unter stringenten Bedingungen

Extraktion der DNA

Die Extraktion wurde mit dem E.Z.N.A.[®] SP Plant DNA Miniprep Kit (Omega Bio-tek, Doraville, USA) durchgeführt: Etwa 0,1g Blattmaterial werden in ein Eppendorftube abgewogen und in flüssigen Stickstoff gefriergetrocknet. Das Blattmaterial wird mit einem Stößel zu feinem Pulver zermahlen. 400 µl des SP1 Puffer und 5 µl RNase A Stammlösung werden zugegeben und die Mischung gevortext, so dass keine Gewebeklumpen zurückbleiben. Man inkubiert das Eppendorfgefäßes bei 65°C für 30 Minuten im Thermoblock. Ab und zu invertiert man es.

140 µl des Puffers SP2 werden hinzugegeben, invertiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert.

Die Lösung wird bei 10000x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird auf die „Omega Homogenizer“ Säule gegeben und für zwei Minuten bei 10000x g zentrifugiert. Der Durchfluß wird mit der Pipette aufgenommen und in ein neues 2 ml Tube gegeben. 1.5 x Volumen des SP3/Ethanol Puffer werden schnell zu dem Lysat hinzugefügt und invertiert. 650 µl des Lysats wird in eine „HiBind[®] DNA“ Säule gegeben und eine Minute bei 10000x g zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen und der Vorgang wird mit dem restlichen Lysat wiederholt. Das Säulchen wird auf ein neues Tube gesetzt und 650 µl Puffer SPW hinzugegeben. Für eine Minute bei 10000x g zentrifugiert und den Durchfluß verworfen. Der letzte Schritt wird noch einmal wiederholt.

Das Säulchen wird auf ein 1.5 ml Tube gesteckt und 50-100 µl erwärmter (65 °C) Elution Puffer hinzupipettiert, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und danach für eine Minute bei 10000x g zentrifugieren. Erneut wird 50 µl erwärmter Elution Puffer hinzugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wird bei 10000x g zentrifugieren. Die Proben

werden bei -20 °C gelagert.

Verdau, Ligation und PCRs mit Hilfe der AFLP-Methode (modifiziert nach Vos et al. (1995))

Nach der Extraktion der DNA spaltet man die DNA mit Hilfe eines Restriktionsenzym (EcoRI) und eines zweiten Restriktionsenzym (MseI). Adapter, die komplementär zu den Restriktionsfragmenten sind, werden ligiert, dies garantiert die Spezifikation der Fragmente. Während der Preamplifikation werden spezielle Primer an die Fragmente angelagert. Danach wird eine selektive Amplifikation mit bestimmten Fluoreszenz-markierten Primerpaaren durchgeführt. Das Protokoll ist wie folgt:

Verdau (25µl Ansatz): EcoRI (1,8 U/µl)
 MseI (18 U/µl)
 Restriktionspuffer (1x)
 DNA
 H₂O

Inkubation: 1,5 h bei 37°C
 2 h bei 65°C
 15 min bei 85 °C

Ligationsmix (5 µl Ansatz): EcoRI-Adapter (0,167 pmol)
 MseI-Adapter (1,67 pmol)
 ATP (0,33 mM)
 Ligasepuffer (1x)
 Ligase (0,48 U)
 H₂O

Verdau und Ligationsmix (5:1 gemixt) über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.

Preamplifikation: EcoRI(0)-Primer (1,5 pmol)
(15µl Ansatz) MseI(0)-Primer (1,5 pmol)
 dNTPs (0,2 mM)
 MgCl₂ (3 mM)
 PCR-Puffer (1x)
 Taq DNA Polymerase (0,067 U)
 DNA (von der über Nacht Inkubation, 1:5 verdünnt)
 H₂O

PCR Konditionen: 1 x 1 min bei 94 °C
 (30 sec bei 94 °C
 26 x 1 min bei 56 °C
 1 min bei 72 °C)
 1 x 6 min bei 72 °C

PCR II (Ansatz 20 µl):
 EcoRI-Primer (0,5 pmol)
 MseI-Primer (0,5 pmol)
 dNTPs (0,2mM)
 MgCl₂ (2,5mM)
 PCR-Puffer (1x)
 Taq DNA Polymerase (0,075 U)
 DNA (1:10 verdünnt)
 H₂O

PCR II Konditionen:

1x	1 min	bei 94 °C
	(30 sec	bei 94 °C
12 x	30 sec	bei 65 °C (touchdown: -1°C pro Zyklus)
	1 min	bei 72 °C)
	(30 sec	bei 94 °C
26 x	30 sec	bei 56 °C
	1 min	bei 72 °C)
1x	6 min	bei 72 °C

Kontrollen

Jeder experimentelle Ansatz inkludiert biologische (Replikation von Genotypen und DNA) und technische/methodische Kontrollen (Mastermix-Kontrollen). Zusätzlich werden „Ankerproben“ mit definiertem Bandenspektrum analysiert und dienen der Verknüpfung bekannter Datensätzen und erlauben den direkten Vergleich verschiedener Gele, experimenteller Ansätze und AFLP-basierender Methoden.

Bandendetektion und -auswertung

Zur Herstellung des Acrylamidgels werden zwei Glasplatten zuerst gereinigt und danach zweimal mit 70% Ethanol sorgfältig abgerieben. Die Platten werden mit Spacern versehen und in die Gelvorrichtung eingespannt. Nun kann das 20% LI-COR-Gel zwischen die beiden Platten gegossen und der Kamm eingesetzt werden. Nach ungefähr einer Stunde ist das Gel fest und kann in den LI-COR (Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA) eingespannt werden. Der TBE-Puffer wird in die LI-COR (Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA) Pufferkammern eingefüllt und die Elektroden angeschlossen. Das Gerät wird gestartet. Nun läuft es 20 Minuten ohne Proben vor. Inzwischen werden die mit dem Farbpuffer versetzten Proben ca. drei Minuten bei 95 °C denaturiert. Sie müssen danach sofort auf Eis verwahrt werden, damit sich die DNA-Fragmente nicht wieder renaturieren. Nachdem das Gel vorgelaufen ist, können die Proben und die Leiter pipettiert werden. Danach muß das Gel mindestens sechs Stunden laufen.

Die Banden werden simultan via Software detektiert und ausgewertet. Man verwendet hierfür das Programm SagaTM Automated AFLP[®] Analysis Software (LI-COR Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA). Die Banden werden als vorhanden/nicht vorhanden (1/0) ausgewertet. Zusätzlich erfolgt eine visuelle Kontrolle. Dabei wird bei der Bontur unterschieden zwischen: Deletionen, Insertionen und „solitären“ Banden.

Anhang: 2:

Weiterführendes Material für das Telexperiment 2: (gekürztes Manuskript aus Dissertation Hoffmann 2008). **Note der Verfasser:** Bitte nicht zur Publikation verwenden, da die Dissertation noch nicht eingereicht bzw. approbiert.

Detailinformation der verwendeten Methoden im Telexperiment 2

Spezifische Primer Entwicklung

Die Grundlage der Forschungsarbeiten war die Diplomarbeit von Vaclavicek (2004), die an einer Auswahl von Klonen ein Sequenzunterschied zwischen lockeren und kompakten Klonen mit dem Primer ExpF11 entdeckte. Der Primer basiert auf dem "EST Flower Bloom" (CF 207762, Da Silva *et al.* 2003). In ca. 50% aller Anwendungen funktionierte dieser Primer nicht. Deswegen konnte der Primer ExpFL1 nicht für weiterführende Versuche eingesetzt werden, so dass das Ziel entstand einen Primer zu entwickeln, der hundertprozentig Funktionstüchtig ist. Für weiter führende Versuche diente dieselbe Auswahl an Klonen (We M 848, We M 242, 1-1 Gm, Fr 13 L, 18 Gm, 20 Gm, 2-53, WWL33), wie bei Vaclavicek (2004), als Kontrolle des Experiments. In diesem Zusammenhang wurde der spezifischen Primers ExpF12 mit Primer3 Software (Rozen & Skaletsky 2000) entwickelt und die PCR Bedingungen optimiert. Der Primer ExpF12 weist eine höhere Spezifität zudem EST Sequenz (CF 207762, Da Silva *et al.* 2003) als der Primer ExpF11 auf.

Optimierte PCR Bedingungen

Die PCR war auf ein Volumen von 10 µl ausgelegt und enthält 10 pM von jeden Primer, 0,2 dNTPs, 0,25 U *Taq* polymerase, 1 µl 10 x PCR Puffer, 1,5 mM MgCl₂ (High Fidelity PCR Enzyme Mix, Fermentas, St Leon Rot, Deutschland) und 1 µl template DNA. Das Programm des Mastercyclers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) besteht aus einer anfänglichen einmenütigen Denaturation bei 94°C. Anschließend folgen 29 Zyklen bei 94°C für 30 sec. Die Annealing Temperatur der Primer dauert 45 sec. bei 72 °C. Die Extensionszeit ist 10 min. bei 72 °C.

Aufreinigung von Amplifikationsprodukten und Sequenzierung

Auf zwei verschiedene Vorgehensweisen wurden die interessanten Fragmente für die Sequenzierung vorbereitet. Einerseits wurden die Fragmente aus einem TAE-Agarosegel ausgeschnittenen und aufgereinigt mit einem Perfectprep[®] Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die ausgeschnittenen Produkte wurden gewogen und in einem 2 ml Röhrchen (Maximum vom 400 mg) gegeben. Das Dreifache des Volumens des ausgeschnittenen Fragment wurde an Binding Puffers dazugeben (1 mg des Gewichtes entspricht 1 µl vom Volumen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Suspension wurde für 10 min. bei 50°C in einem

Eppendorf Heizblock inkubiert, alle 2-3 min. gemischt und bei 1000 g (Galaxy 14D VWR, Österreich) zentrifugiert. Es wurde das einfache Volumen des Fragmentes an Isopropanol zu dem aufgelöstem Fragment gegeben. Die Lösung wurde gemischt und inkubiert. Das Spin Säulchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde auf ein 2 ml tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gesetzt, in das 800 µl der Lösung gegeben wurden und bei 10000 g (Galaxy 14D VWR, Österreich) zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt mit der restlichen Lösung wiederholt. Weiterhin wurde Wasch Puffer (750 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf das Spin Säulchen gegeben und 1 min. bei 10000 g (Galaxy 14D VWR, Österreich) zentrifugiert. Erneut wurde der Durchfluss verworfen, das Spin Säulchen wieder auf das tube gesetzt und bei 10000 g für eine min (Galaxy 14D VWR, Österreich) zentrifugiert. Das Spin Säulchen wurde auf ein neues 2 ml Röhrchen gesetzt, 30 µl Elution Buffer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hinzugeben und bei 1000 g für eine Minute (Galaxy 14D VWR, Österreich) zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde bei -20°C gelagert. In der zweite Variante wurden „interessanten“ PCR Produkte mit ExoSapIT[®] (USB Amersham, München, Deutschland) zur Sequenzierung aufbereitet.

Die Entwicklung eines SCAR und CAPS Markers

Zur Unterscheidung der lockeren und kompakten Rebklone wurde ein sequence characterized amplified region (SCAR) Marker (Dell) entwickelt. Das PCR Produkt des Markers sollte bei 162 Basenpaaren für lockerbeerige und bei 166 Basenpaaren für kompakte Klone ein Fragment aufweisen. Der SCAR Primer wurde an Hand der identifizierten Sequenz mit der Software Primer 3 v. 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000, Abb. 13) entwickelt.

Das Volumen der PCR ist auf 20 µl ausgelegt, die aus 10 pM des markierten und unmarkierten Primers, 0,2 mM dNTPs, 0,5 U *Taq* polymerase , 2 µl 10 x PCR Puffer, 1,5 mM MgCl₂ (High Fidelity PCR Enzyme Mix, Fermentas, St Leon Rot, Deutschland) und 2 µl template DNA bestehen. Das Mastercycler Programm hat eine Denaturation von einer min. bei 94°C. Dieser folgen 29 Zyklen von 30 sek. bei 94°C, 45 sek. Annealing Temperatur (TabelleX), 45 sek. bei 72°C und am Ende ist eine Extensionszeit von 10 min. bei 72°C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Proben wurden mit dem Licor-Ladepuffer 1:50 verdünnt und ein µl dieser Lösung wurde auf einem acht prozentigen PAGE Gel (19:1 acrylamide/bisacrylamide, 6.2 M urea, 1 x TBE) an einem Li-Cor 4300 DNA Analyzer (Li-Cor, Nebraska, USA) aufgetragen. Das Amplifikationsprodukt zeigte eine Doppelbande, die einen 4 bp Unterschied aufweist. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde dieser Versuch in vierfacher Wiederholung durchgeführt. Das PCR Produkt wurde auf einem 12 % PAGE 19:1 (acrylamide/bisacrylamide, 6.2 M urea and 1 x TBE) an Li-Cor 4300 DNA Analyzer aufgetrennt und mit der SAGA^{MX} Generation 2 AFLP version 3.3 Software (Li-Cor Biosciences, Nebraska, USA) visualisiert. Mit dem Odyssey scanners (Li-Cor, Nebraska, USA) wurden die „interessanten“ Amplifikationsprodukte in zweifacher Wiederholung aus dem Gel geschnitten und

mit dem E.Z.N.A.® Poly-Gel DNA Extraktions Kit (Omega Bio-Tek, Doraville, USA) aufgereinigt. Für die darauf folgende PCR wurden 4 µl der aufgereinigten Probe und ein unmarkiertes Primerpaar, Del1, eingesetzt (Tabelle X). Auf einem TBE-Agarosegel wurde die PCR aufgetrennt, mit ExoSapIT (USB Amersham, Uppsala, Schweden) aufgereinigt und in 5' und 3'Richtung sequenziert (University of Chicago Cancer Centre, USA). Die Sequenzierungen wurden mit der Software BioEdit (Hall 1999) ausgewertet. Die Entwicklung des cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) Marker erfolgte, indem das PCR Produkt des spezifischen Markers ExpF12 mit der Restriktionsendonuclease, SMI, (Fermentas, St Leon Rot, Germany) verdaut wurde. Das Restriktionsenzym schneidet die detektierte Sequenz, die die Mutation der lockerbeerrigen Genotypen aufweist einmal.

```

5' attcagccagagccgattacaatgaccttacaagcaaaatTTTTCAAATAAAGCAAATTACAACCTCAGATACTAG base pairs
3' taagtcggctcctcgctaagtgttactggaatggttcgTTTTAAAAGTTTTATTCGTTAATGTTGAGTCTATGATC 1 to 75

tgggcgggtggtaaaagaccacctctgccatgaaaaagggcctcaagaataagggtctctgaatagggtacccta base pairs
accgccaccattttctggtggagacggtaactttttcccgagttcttattccagagacttatccccatggggat 76 to 150
                                     SMI

ccctacaaggccacattgacaaatgcaaaatttaaatgacagggctatttcaaaaaagcccttctcctcctttt base pairs
ggggatggtccggtgtaactgtttacggttaaatcttagtcccgataaagTTTTTTTCGGAAGGAGGGAAAA 151 to 225
                                     SwaI

cttttctttaccacaagaaaagggaagactgaccccccaaggacaacagtatatcctctaacaagctaaattggcc base pairs
gaaaagaaaatgggttcttttccggtctgactgggggttctgttgcataataggagattgttcgatttaaccgg 226 to 300

atactaattcctaaacttagtatatatatgatattatcacctagcaaaactataggtattataggagtagggact base pairs
tatgattaaggatttgaatcatatataataactaaatagtgatcggtttgatatccataatcctcatcctoga 301 to 375

ccaaagcgttttagcgaactgtgctccactgaaggctcggcacaaggaccagtgagcgggacacaattgtaggag base pairs
ggtttcgcaaatcgctttgacacgaggtgacttccagaccggttctcgtggtcactcgcctgtggttaacatcctc 376 to 450

acaatagtgtggccattactggtggtgaccttgaatgagaggtcctgtccattaagataggtgttgcctctgccag base pairs
tgttatcacacgggtaatgaccaccactggaacttactctccgagacaggttaattctatccacaacgagacggtc 451 to 525

ttttggccccagttctcctggacatagactgccagccagtccttgacc'3 base pairs
aaaaccggggtcaaggacctgtatctgacggtcggtcaggaactggg'5 526 to 572

```

Abbildung: Identifizierte Sequenz in Webcutter 2.0. Die rot markierten Basenpaare sind die Enzymschnittstelle, grün die Mutation und blau der Primer ExpF12.

Das PCR Produkt des Primer ExpF12 wurde mit der Restriktionsendonuclease, anstelle der genomischen DNA, verdaut um ausschließen zu können, das das Enzym noch an einer anderen Stelle im Rebengenom schneidet und diese Amlifikationsprodukte auf dem Gel amplifiziert werden. Der Verdau war auf ein Volumen von 19 µl ausgelegt, indem 10 µl jeder Probe, 50 mM Tris-HCL (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA und 10 U SMI enthalten sind. Diese Lösung wurde 2 Stunden bei 30°C und 20 min. bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit dem Licor-Ladepuffer 1:10 verdünnt und ein µl der Verdünnung auf das Gel aufgetragen. Die verdaute PCR wurde auf einem 12 % PAGE Gel an einem Li-Cor 4300 DNA Analyzer (Li-Cor, Nebraska, USA) amplifiziert, mit der SAGA^{MX} Generation 2 AFLP version 3.3 Software (Li-Cor, Nebraska, USA) visulisiert, ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert wie bei der Entwicklung des SCAR Marker beschrieben.

Sequenzierung und Analyse des Expansin-Gen gekoppelten Locus

Die Ergebnisse des PCR Produkt des Primers ExpFL1, der kloniert und sequenziert wurde, zeigten einen Sequenzunterschied zwischen locker und kompakten Pinot noir Klone (Vaclavicek 2004). Diese Sequenz diente als Vorlage für weitere Versuche und als Kontrolle für die Untersuchung weiterer Klone. Weitere Versuche wurden mit dem Primer ExpFL2 und modifizierten PCR Bedingungen durchgeführt und direkt sequenziert um Kosten zu sparen. Die Amplifikationsprodukte wurden in zweifacher Wiederholung durchgeführt, aufgereinigt mit ExoSapIT (USB Amersham, Uppsala, Schweden), wie vorher beschrieben und in beide Richtungen sequenziert. Die Sequenzierungen wurden mit dem Programm BioEdit analysiert. Mit der Sequenz wurde ein nbalsted in der NCBI durchgeführt um ähnliche oder identische Sequenzen und Gene zu finden. Die identifizierte Sequenz ist ein Teil der Sequenz AB482589 (Velasco et al. 2007, NCBI 1-2008) und des Expansin Gens *Vlexp-1* (Ishirmaru et al. 2003, 2007, NCBI 1-2008). Mit der Sequenz wurde ein tbasted in der NCBI gemacht um eine Übereinstimmung zu einem Protein zu finden. Die Position unserer Sequenz und die Identifizierung anderer Gene in der Nähe der detektierten Sequenz wurden mit der Datenbank softberry herausgefunden, indem die Sequenz AB482589 analysiert wurde. Der EST (Da Silva, CF207762), auf dem unsere Sequenz basiert wurde in Spider (NCBI) auf Exon oder Introns untersucht. Das Ende des identifizierten Exons konnte mit der Sequenz AB10442.1. bestimmt werden, sowie andere Exons und Introns des Gens. Spider vergleicht die Sequenz AB10442.1. mit der Sequenz AB482589 von *Vitis Vinifera*. Die Datenbank Softberry hingegen vergleicht die Sequenz AB482589 mit einer Sequenz von Arabidopsis. Zusätzlich bietet diese Datenbank die Möglichkeit Gene zu identifizieren.

Entwicklung eines SNP-Markers (SNP1 und SNP2)

Zur Detektion der C/T Mutation wurden die Primer SNP1 und SNP2 (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) entwickelt. Die PCR wurde mit dem CodeREd™ SNP Genotyping Kit (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) durchgeführt. Der Primer SNP1 ist spezifisch für die Sequenz der kompakten Trauben, die keine 4bp Deletion besitzen und der Primer SNP2 basierend auf Sequenz für lockerbeerige Trauben, die eine 4 bp Deletion zeigen, entwickelt. Die Reaktion der PCR ist auf ein Volumen von 20 µl ausgelegt. Diese beinhaltet 10 pM jedes Primers, 0,2 mM GAUC Mischung (CodeREd™ SNP Genotyping Kit), 0,5 U Taq polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 20 mM Tris-HCL (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂ und 1µl template DNA. Die Thermocycler Bedingungen sind: 94°C für 3 min, Denaturation bei 94°C für 20 sec., Annealing Temperatur für 20 sec. bei 53°C, Extension bei 72°C für 40 sec. für 36 Zyklen und die endgültige Extension bei 72°C für 5 min. Auf einem einprozentigen Agarosegel wurde das PCR Produkte an einer Gelelektrophorese aufgetrennt um die Funktionstätigkeit der PCR zu kontrollieren. Deren Laufbedingungen waren 120 V für 45 min. Zur Herstellung der SNP Reaktion wurden 3,5 µl des

PCR Produktes, 1 µl Exol (CodeRED™ SNP Genotyping Kit) invertiert und inkubiert bei 37°C für 30 min. und 15 min bei 80°C. Ein µl Uracil-DNA Glycosylase Enzym (CodeRED™ SNP Genotyping Kit) wurde zu 10 µl der Reaktion hinzugegeben, gemischt und für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zwei µl Cleavage Agent (CodeRED™ SNP Genotyping Kit) dazugegeben und 15 min. bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden 1:5 verdünnt, indem zwei µl Reaktion und 8 µl Rox Ladepuffer gemischt wurden. Die Verdünnung wurden auf einem Abi Prism 3100 Genetic Analyzer aufgetrennt und mit der Software Genotyper 3.7® (Applied Biosystems, Forster City, USA) analysiert.

Detailinformation zum Teil Ergebnisse des Telexperimentes 2

Heterozygotes Merkmal

Der SCAR Marker Del1 wurde zur Unterscheidung der lockeren und kompakten Klone auf ein Licor Gel aufgetragen. Die ersten drei Klone sind lockerbeerig (M1, 1-84 Gm, 1-44 Gm, M242) und die folgenden kompakt (18 Gm, 20 Gm, INRA 777, WVWL 33). Das Gel zeigt eine Bande bei 162 bp für Lockerbeerigkeit und eine Bande bei 166 bp für den Kompakten Phänotypen.

Zur weiteren Überprüfungen des Merkmales auf Heterozygotie wurde der CAPS (ExpF12) Marker entwickelt. Das Enzym (SMI) schneidet die identifizierte Sequenz (601 bp) bei 187 bp. Das verdaute Produkt sollte eine Bande bei 283 bp für die lockerbeerigen Klone und eine Bande bei 287 bp für die kompakten Klone amplifizieren. In allen analysierten Pinot noir Klonen wurden zwei Banden amplifiziert (283 bp, 287 bp). Die detektierten Fragmente stimmen mit der lockerbeerigen Sequenz bei 283 bp und mit der kompakten Sequenz bei 287 bp überein. Zusätzlich würde der SCAR Marker (Del1) an einer geselbsteten Pinot noir Population getestet und kartiert. Der Locus für Lockerbeerigkeit liegt 10 cM entfernt von dem Marker VVIb09 (pers. Mitteilung. Pelsy 2007), der auf der Koppelungsgruppe 17 liegt (Doligez et al. 2006).

Expansin-Gen gekoppelter Polymorphismus

Mit der detektierten Sequenz, die die Mutation für Lockerbeerigkeit besitzt, wurde ein nblast in der NCBI durchgeführt. Diese zeigte eine 100 % ige Übereinstimmung mit der Sequenz *Vitis vinifera* ssp Pinot noir whole genome shotgun sequence, contig VV78X272246.11, Klon ENTAV 115 (AM482589, Velasco et al. 2006, NCBI 1-2008). Die Sequenz AB104442.1 (Ishimaru et al. 2003, 2007 E value 0.0, NCBI 1-2008) stimmt zu 98 % mit der identifizierten Sequenz überein. Diese ist als Expansin *Gene Vlexp-1* detektiert, das zu der Gruppe der α -expansin gehört (Ishimaru et al. 2003, 2007). Das Expansin gehört zu der Genontology (GO:0005554, GO:0009505, GO:0009826, GO:0009831 and GO:000828), die für die Zellwandveränderungen und Zellwachstum verantwortlich sind und der Gruppe TC62965 (6-2007 Tiger) angehören. In weiteren Analysen mit

dem EST (CF 207762 Da Silva et al. 2003), der identisch zu unserer Sequenz ist, wurde ein Exon von 30 bp bis 753 bp gefunden (an dieser Stelle endet die ursprüngliche Da Silva Sequenz). Die Sequenz, die über den EST CF 207762 (Da Silva et al. 2003) hinausgeht sind die Sequenzen CTG1027347, CTG1013433 und CTG1010185 (Cook, 2007, pers. Mitteilung). Die Sequenz AB104442.1 (Ishimaru et al. 2003, 2007) ist 1245 Basenpaare und wird für weitere insilico Analysen verwendet. Das Ende des Exons, sowie drei weitere Exons konnten detektiert werden, indem die Sequenz AM482589 (Velasco et al. 2006) mit der Sequenz AB10442.1 (Ishimaru et al. 2003, 2007) in Spider (NCBI) analysiert wurden (Abb). Das Exon, indem unsere Mutation liegt ist in der Sequenz AM482589 bei 6725 - 7449 Basenpaaren (Spider, NCBI, Tabelle 5). Ein widersprüchliches Ergebnis zu der Identifizierung von 4 Exons in der Sequenz AB10442.1 (Ishimaru et al. 2003, 2007 Abb. 19) mit Spider, ergibt sich bei der Verwendung der Datenbank softberry, die nur drei Exons analysiert. Doch in dieser Datenbank wird die Sequenz AM482589 mit einer Arabidopsis Sequenz verglichen und nicht wie in Spider, NCBI zwei *Vitis vinifera* Sequenzen miteinander. Darauf könnte die unterschiede Anzahl an Exon beruhen.

Tabelle: Exon Position im Genom, Länge, auf mRNA Eben, Spider NCBI 01-2008

Exon	Genregion bp	mRNA bp	Länge bp	Identität
Exon 1	6724-7513	1-789	789	99,2 %
Exon 2	7877-8186	790-1099	310	99,7 %
Exon 3	8298-8423	1100-1225	126	100 %
Exon 4	8541-8598	1226-1283	58	100 %

Anhang 4

Wegscheider, E., Benjak, A., Forneck, A. (2009): Clonal Variation in Pinot noir Revealed by S-SAP involving Universal Retrotransposon-Based Sequences. AM J ENOL VITICULT, 60:1, 104-109; ISSN 0002-9254

Anhang 5

Detailinformation der verwendeten Methoden im Telexperiment 5

Tabelle: Pflanzenmaterial, verwendet in Telexperiment 5.

<i>Vitis</i> species	N°	Cultivar	Clone/accession	Origin
<i>V. v. sativa</i>	1	Pinot	We 242	LVWO Weinsberg, Germany
			We 111	
			20 Gm	
			1-84 Gm	
	2	Riesling	198-44 Gm	Institute of Grapevine Breeding Geisenheim , Germany
			64-183 Gm	
			110-14 Gm	
			24-195 Gm	
			239-17 Gm	
		R. Riesling	23 Gm	
	3	Chardonnay	50 Gm	
			1 Gm	
			33 Gm	
	4	Cabernet Sauvignon	3 Gm	LVWO Weinsberg, Germany
			52 Gm	
	5	Cabernet Mitos	-	Rebveredler Antes, Heppenheim, Germany
	6	Cabernet Cortis	-	
	7	Cabernet Carbon	-	
	8	Cabernet Dorsa	We 750	LVWO Weinsberg, Germany
	9	Lemberger x Cab. Sau.	We 70-281-37	
10	Acolon			
<i>V. v. sylvestris</i>	11	-	CA4-4	INIA, Madrid, Spain
	12	-	S 47-7	
	13	Grésigne-1	Sample V6037a	INRA, Montpellier, France
	14	-	N1VS	BOKU, Vienna, Austria (samples derive from the area of Germany and Switzerland)
	15	-	N6BVS	
	16	-	N26AVS	
	17	-	N29AVS	
	18	-	N31VS	
	19	-	N32AVS	
<i>V. rufotomentosa</i>	20	-	DVIT 1416	Department of Viticulture and Enology, UC Davis, USA
<i>V. champinii</i>	21	-	DVIT 9036	
<i>V. cinerea</i>	22	Barrett 9	DVIT 1363	
<i>V. riparia</i>	23	Riparia Gloire	DVIT 1437	LVWO Weinsberg
<i>V. ruperstris</i>	24	St. George	UCD2A	
<i>V. riparia</i>	25	Michaux	-	

Originalmanuskript eingereicht bei Genome Biology and Evolution

Benjak, A., Boue, S., Forneck, A., Casacubert, J.M. (in prep): Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.). in revision Genome Biology and Evolution.

<i>Vitis</i> species	N°	Cultivar	Clone/accession	Origin
<i>V. v. sativa</i>	1	Pinot	We 242	LVWO Weinsberg, Germany
			We 111	
	2	Riesling	20 Gm	Institute of Grapevine Breeding Geisenheim, Germany
			1-84 Gm	
			198-44 Gm	
			64-183 Gm	
			110-14 Gm	
			24-195 Gm	
	R. Riesling	23 Gm		
	3	Chardonnay	50 Gm	LVWO Weinsberg, Germany
1 Gm				
<i>V. v. sylvestris</i>	4	Cabernet Sauvignon	33 Gm	Rebveredler Antes, Heppenheim, Germany
			3 Gm	
	5	Cabernet Mitos	52 Gm	BOKU, Vienna, Austria (samples derive from the area of Germany and Switzerland)
			-	
			-	
			-	
			-	
			-	
			-	
			-	
6	Cabernet Cortis	-	LVWO Weinsberg, Germany	
7	Cabernet Carbon	-		
8	Cabernet Dorsa	We 750	LVWO Weinsberg, Germany	
9	Lemberger x Cab. Sau.	We 70-281-37		
10	Acolon	-	INIA, Madrid, Spain	
11	-	CA4-4		
12	-	S 47-7	INRA, Montpellier, France	
13	Grésigne-1	Sample V6037a		
<i>V. v. rufotomentosa</i>	14	-	N1VS	Department of Viticulture and Enology, UC Davis, USA
			N6BVS	
			N26AVS	
			N29AVS	
			N31VS	
			N32AVS	
15	-	DVIT 1416	LVWO Weinsberg	
16	-	DVIT 9036		
17	Barrett 9	DVIT 1363	LVWO Weinsberg	
18	Riparia Gloire	DVIT 1437		
19	St. George	UCD2A	LVWO Weinsberg	
20	Michaux	-		
<i>V. champinii</i>	21	-	-	LVWO Weinsberg
<i>V. cinerea</i>	22	-	-	
<i>V. riparia</i>	23	Barrett 9	DVIT 1363	LVWO Weinsberg
<i>V. ruperstris</i>	24	St. George	UCD2A	
<i>V. riparia</i>	25	Michaux	-	LVWO Weinsberg