

Anwendung der DNA Analytik zur genetischen Analyse von Rebsorten

F. REGNER

Will man heute Rebsorten analysieren, so steht ein breites Spektrum an Möglichkeiten zur Verfügung, welches von Blattformen über Inhaltsstoffe (z.B. Aromastoffe, Phenole) bis hin zur Erbsubstanz (DNS) reicht. Als zweifellos tauglichstes Mittel z.B. für Sortenidentifizierung haben sich genetische Fingerprints mittels Mikrosatelliten herausgestellt. Generell kann man Methoden, die einen genetischen "Fingerabdruck" einer Rebsorte liefern, für derartige Studien heranziehen.

Wir haben ca. 1300 verschiedene Rebstöcke auf ihr genetisches Profil hin untersucht und konnten dabei ca. 350 Rebsorten und 40 Unterlagsreben sowie *Vitis*-Arten unterscheiden und in weiterer Folge charakterisieren. Mit den Daten aus dieser Analyse haben wir eine Datenbank aufgebaut, die der Sortenidentifizierung dient. Soll nun eine Rebe auf ihre Identität hin untersucht werden, so steht vorrangig die Präparation der Erbsubstanz (DNS) an. Diese Trägersubstanz der Erbinformation findet sich in allen lebenden Teilen einer Pflanze wie z.B. Blatt, Traube (in den Beerenhäuten) aber auch in Wurzel und Holz. Da verholzte Gewebesteile den größten Teil des Rebverkehrs bzw. Rebhandels betreffen, ist mit dieser Methodik vor allem ein Instrument geschaffen worden, das eine eindeutige Identifizierung und somit eine Kontrollmöglichkeit des Rebmateriale ermöglicht.

Bedenkt man z. B., dass der Großteil der Schnittreben importiert wird, ohne je Blätter zu entwickeln, so ist die besondere Bedeutung einer derartigen Methode offensichtlich. Mittels SSR-Genotypisierung kann die Erkennung von Rebsorten bereits an Hand einiger weniger Genort-Untersuchungen durchgeführt werden.

Wenn also eine zu untersuchende Rebsorte an diesen Genorten analysiert wurde, sollte eine Identifizierung möglich

sein. Bei Eingabe der Werte in die Datenbank erhält man Vorschläge für die Sortenzuordnung. Handelt es sich um eine Standardsorte so wird eine 100%ige Übereinstimmung z.B. mit der Sorte Grüner Veltliner ausgewiesen. Aber auch geringere Übereinstimmung läßt sich aufzeigen. Sinnvolle Ähnlichkeiten sind jedoch bei mehr als 50 % Übereinstimmung angesiedelt, vor allem wenn es sich um Genotypen innerhalb der Europäerrebe *Vitis vinifera* L. *sativa* handelt. Mittels eines anderen Analysenmodus kann die Beziehung der Rebsorten in Hinblick auf Einkreuzungen untersucht werden. Stimmt von zwei Sorten an allen Genorten je ein Wert überein, so kann eine Abstammungsbeziehung nicht ausgeschlossen werden. Allerdings benötigt man dazu wesentlich mehr Genorte, um eine gewisse Sicherheit über die Richtigkeit dieser Beziehung zu erlangen.

Wir haben bei Abstammungsanalysen bis zu 40 Genorte pro Sorte untersucht. Trotz der großen Anzahl gibt es vorerst keine Hinweise, in welche Richtung sich die Entwicklung vollzogen hat, sprich welche Sorte die Elternsorte und welche die Nachkommenschaft darstellt. Mit genetischen Markern lässt sich die Vielgestaltigkeit der Rebsorten bestens untersuchen, ihre Unterschiede, aber auch ihre Gemeinsamkeiten besser darlegen und über die Differenzierung hinaus die Identifizierung von Rebsorten vornehmen.

Für das Erkennen von Rebsorten bewährten sich Mikrosatelliten Marker (THOMAS et al., 1993) außerordentlich gut. Diese Marker bieten eine hohe Stabilität der Ergebnisse bei gleichzeitig ausreichendem Unterscheidungspotential.

Außerdem lassen sich die Erbgänge aufgrund der codominanten Vererbung nach Mendel leicht verfolgen, die Daten gut speichern und in einer Datenbank lagern. Die Überlegenheit gegenüber anderen Systemen besteht aber vorwiegend darin, dass die Reproduzierbarkeit der Er-

gebnisse orts- und systemunabhängig ist. Einerseits hat die Mikrosatelliten-Analyse in der Sortenidentifizierung einen wesentlichen Stellenwert erlangt und dient der Qualitätssicherung im Rebverkehr, andererseits steigt der Informationsstand über Zusammenhänge bezüglich der Rebsorten und sinkt das Risiko von Falschbenennungen oder fehlerhaften Zuordnungen.

Folgende sechs Genorte werden verwendet, um alle wirklichen Sorten voneinander zu trennen: VVS2, (THOMAS et al., 1993) VVMD5, VVMD7, VVMD27, (BOWERS et al., 1996) VRZAG62 und VRZAG 79¹ (SEFC et al., 1999). Allerdings ist es nicht möglich, mit derselben niederen Anzahl an Genorten auch Typen oder Klone zu unterscheiden. Selten aber dennoch konnten Unterschiede in den Allelen von Klonen einer Sorte aufgefunden werden.

Bedenkt man z.B. die beschränkten Möglichkeiten, Rebmateriale im Handel auf die Sortenechtheit hin überprüfen zu wollen, so wird bewusst, dass mit der genetischen Analyse ein wesentlicher Mangel in der Rebenzüchtung behoben wurde.

Letztendlich stellt die genetische Analyse jene Analytik zur Verfügung, die auch für Reben eine sehr exakte Darstellung erlaubt. Alle Gewebeteile, aus denen DNS präpariert werden kann, sind für die Mikrosatelliten-Analyse geeignet. So konnte aus Blättern, einjährigem Holz, Wurzeln und Beerenhäuten DNS für die genetische Analyse präpariert werden. Identifizierung mittels genetischer Marker wird vor allem dort angewendet werden, wo Ampelographie schwierig oder unmöglich zu einer Erkennung von Sorten beitragen kann. Schließlich ist die Sortenbezeichnung erst glaubwürdig und sinnvoll, wenn diese auch überprüfbar ist. Dabei soll die genetische Analyse die klassische Ampelographie nicht verdrängen, sondern Hilfestellung dort anbieten,

Autor: Dr. Ferdinand REGNER, HBLA u. BA für Wein- und Obstbau, Wiener Straße 74, 3400 KLOSTERNEUBURG

wo die klassische Ampelographie keine Lösung oder zuwenig Aussagekraft erkennen lässt. So wird die klassische Ampelographie weiterhin für alle Standard- und Routineidentifizierungen herangezogen werden, sollten sich jedoch aufgrund der Bedingungen Probleme ergeben oder ist die Exaktheit nicht ausreichend, wird mit genetischen Markern eine perfekte Alternative zur Verfügung stehen. In unserer Datenbank sind die genetischen Fingerabdrücke von über 400 Rebsorten und 40 Unterlagsreben sowie Vitis-Arten gespeichert. Mittels eines eigens dafür entworfenen Programmes lassen sich die Rohdaten aus der Sortenanalyse für eine Identitätsrecherche benutzen. Dabei werden jene Sorten aufgelistet, die möglichst viele gemeinsame Fingerabdrücke mit der analysierten Sorte aufweisen.

Nur bei einer 100 %-igen Übereinstimmung kann von einer Identifizierung ausgegangen werden. Jedoch konnte bei manchen alten Sorten auch beobachtet werden, dass es an einzelnen Genorten Abweichungen geben kann, ohne dass eine andere Sorte vorliegt.

Spiegelt sich diese Abweichung des genetischen Profils im Phänotyp wider, so ist die Sorte meist als eigenständiger Typ oder Klon charakterisiert. Letztendlich können diese extrem seltenen Abweichungen bei Mikrosatelliten aber herangezogen werden, um Typen oder Klone von Sorten zu charakterisieren (*Abbildung 1*). Mit steigender Anzahl der Marker ergibt sich damit ein Potential, um genetische Unterschiede von Typen und Klone einer Sorte darstellen zu können. Somit kann mittels Mikrosatellitenmarker eine weitestgehende Abgrenzung zu anderen Klonen stattfinden, sodass eine Identifizierung über den Sortenstatus hinausgehend möglich ist. Züchterischer Schutz für Klone entspricht jedoch zur Zeit nicht den geforderten Kriterien der UPOV, dieser kann ja nur bei Voraussetzungen wie Stabilität, vorherige Abgrenzung zu bestehenden registrierten Klonen und Homogenität der Individuen gegeben sein. Daher fehlt im Moment die gesetzliche Basis für den schon lang erhofften Klonschutz.

Eine weitere Komponente der Identität betrifft die Zusammenhänge der Rebsorten, also ihre Gemeinsamkeiten. In un-

serer Mikrosatelliten-Datenbank ist es möglich, das Aufzeigen des Ausmaßes an Übereinstimmung neben der Identifizierung zu erfassen. Sorten, bei denen an allen Genorten zumindest ein Allel pro Genort mit der Vergleichssorte ident ist, können eine direkte Abstammungsbeziehung aufweisen. Erst bei Auffinden einer zweiten Elternsorte kann die Abstammung definiert werden. Allerdings lassen sich von wesentlich mehr Sorten Abstammungen erkennen, als sich dann konkret in Kreuzungen darstellen lassen. Einerseits, weil die klassischen Rebsorten durchwegs aus Zufallsbestäubungen stammen und andererseits, weil durch die jahrhundertlange Veränderung der Rebsortenbestände nur die für den Weinbau jeweils am besten geeigneten Reben erhalten geblieben sind.

Was sich aber insgesamt gut erkennen lässt ist, dass die historischen Bezeichnungen der Rebsorten vielleicht auch mit Synonymen oder Homonymen eine tiefere Ursache aufweisen und daher nicht ganz einfach ohne Informationsverlust wegzulassen sind. Der einfachste Weg wäre sicherlich, die Sortenbezeichnung wie sie heute aufgrund der Ampelographie vorgeschlagen wird und als Ergänzung die synonyme Bezeichnung trotzdem anzuführen.

Besonders gut lassen sich mit diesen genetischen Markern Sortenfamilien erkennen und vielleicht auch neue Zusammenhänge zwischen Rebsorten definieren. Im Verlauf unserer Analysen konnten wir dabei erkennen, dass speziell für den mitteleuropäischen Weinbau einige wenige Leitsorten zu definieren sind, aus denen sich zahlreiche andere Sorten entwickelt haben. Als die wichtigsten Sorten für den Mitteleuropäischen Weinbau kristallisierten sich Heunisch und Traminer heraus.

Heunisch ist eine der ältesten Sorten im europäischen Weinbau, die heute noch kultiviert wird und die zu der frühesten Sortenbenennung zählt. Die Sorte gilt als Relikt der Hunneninvasion in Europa zur Zeit der Völkerwanderung. Somit stellt die Sorte möglicherweise den wichtigsten nachvollziehbaren Import von *Vitis vinifera* in Europa dar. Im Mittelalter war die Unterscheidung zwischen den Rebsorten sehr oberflächlich, die ältesten Beschreibungen nennen beispielsweise

nur die Sorte Heunisch im Gegensatz zur Sortenfamilie Fränkisch.

Tatsächlich handelt es sich bei beiden Sorten um Familien, die aber letztendlich eine Leitsorte im Zentrum besitzen. Von dieser Sorte gibt es dann zahlreiche Mutanten und ausgekreuzte Nachkommenschaft. Im Zentrum der Sorte Heunisch konnten wir den Weißen Heunisch finden, der ident mit Heunisch aus den Sortensammlungen Krems (Ö), Pecs (U) und Freiburg (D) oder unter dem Namen Gouais in Frankreich kultiviert wurde. Die Anzahl der Nachkommenschaft von Heunisch ist überwältigend groß, daran kann die Bedeutung dieser Sorte für die Entwicklung der heutigen Rebsorten erkannt werden. Im engsten Kreis gibt es Typen, die sich genetisch nur geringfügig unterscheiden, aber zusätzlich gibt es zahlreiche Auskreuzungen, die trotzdem alle unter der Bezeichnung Heunisch in den Sammlungen vorkommen. Dies betrifft jedoch nur jene Nachkommenschaft, die ampelographisch der Sorte Heunisch sehr ähnlich ist. Andere Nachkommen der Sorte Heunisch sind eindeutig schon früher als eigenständige Sorten erkannt worden und haben dementsprechend eigene Namen. Die Sorten Chardonnay, Aligote, Melon, Auxerrois, Riesling, Elbling, Ortlieber, Furmint, Gamay, Blaufränkisch (LEMBERGER) und viele andere entsprechen einer Heunisch Kreuzung (REGNER et al., 1998a). Die Frage, warum sich derart viele Sorten von einer einzigen, noch dazu wahrscheinlich eingeführten Sorte entwickelt haben, lässt sich am besten mit den vererbten Eigenschaften der Nachkommen erklären. Charakteristisch für Heunisch ist eine hohe Fruchtbarkeit und sehr vitale, wuchsstarke Reben. Allerdings kann in schlechten Jahren ein zu hohes Säureniveau wegen später Reife verbleiben. Will man die Sorte kürzer definieren, so könnte sie als historischer "Massenträger" bezeichnet werden. Einerseits sind diese Eigenschaften ein Indiz für eine Herkunft aus südlicheren oder östlichen Regionen, andererseits zeigt sich daran, dass andere Sorten damals vermutlich durch geringe Erträge gekennzeichnet waren. Wie aber ist es möglich, dass sich Qualitätssorten wie Chardonnay, Riesling, Silvaner und andere in der Nachkommenschaft von Heunisch auffinden lassen? Das Geheimnis

Tabelle 1: Die Allele von 10 verschiedenen Riesling Klone zeigen die Möglichkeit der Unterscheidung auf, jedoch treten diese Unterschiede (Nullallele) eher an einigen wenigen Genorten auf.

Locus	239 Gm	Kl 23	Kl 20	Kl 1/6	TR 356	239/20Gm	239/12Gm	237/20Gm	110/11Gm	198-30Gm
VVS 1	189:189	189:189	189:189	189:189	189:189	189:189	189:189	189:189	189:189	189:189
VVS 2	142:150	142:150	142:150	142:150	142:150	142:150	142:150	142:150	142:150	142:150
VS 3	212:218	212:218	212:218	212:218	212:218	212:218	212:218	212:218	212:218	212:218
VVS 4	167:167	167:167	167:167	167:167	167:167	167:167	167:167	167:167	167:167	167:167
VVS 29	168:176	168:176	168:176	168:176	168:176	168:176	168:176	168:176	168:176	168:176
VVMD 5	224:232	224:232	224:232	224:232	224:232	224:232	224:232	224:232	224:232	224:232
VVMD 6	208:210	208:210	208:210	208:210	208:210	208:210	208:210	210	208	210
VVMD 7	246:254	246:254	246:254	246:254	246:254	246:254	246:254	246:254	246:254	246:254
VVMD 8	140:144	140:144	140:144	140:144	140:144	140:144	140:144	140:144	140:144	140:144
VVMD 14	228	228	228	228	228	228	228	228	228	228
VVMD 17	220:220	220:220	220:220	220:220	220:220	220:220	220:220	220:220	220:220	220:220
VVMD 21	248	248	248	248	248	248	248	248	248	248
VVMD 24	207:215	207:215	207:215	207:215	207:215	207:215	207:215	207:215	207:215	207:215
VVMD 25	250:256	250:256	250:256	250:256	250:256	250:256	250:256	250:256	250:256	250:256
VVMD 26	251	251	251	251	251	251	251	251	251	251
VVMD 27	180:188	180:188	180:188	180:188	180:188	180:188	180:188	180:188	180:188	180:188
VVMD 28	228:234	228:234	228:234	228:234	228:234	228:234	228:234	228:234	228:234	228:234
VVMD 31	203:213	203:213	203:213	203:213	203:213	203:213	203:213	203:213	203:213	203:213
VVMD 32	251:271	251:271	251:271	251:271	251:271	251:271	251:271	251:271	251:271	251:271
VVMD 36	252:262	252:262	252:262	252:262	252:262	252:262	252:262	252:262	252:262	252:262
VRZAG 7	155:155	155:155	155:155	155:155	155:155	155:155	155:155	155:155	155:155	155:155
VRZAG 12	154-173	154	154-173	154-173	154	154-173	154-173	154-173	154-173	154-173
VRZAG 15	165:165	165:165	165:165	165:165	165:165	165:165	165:165	165:165	165:165	165:165
VRZAG 21	202:206	202:206	202:206	202:206	202:206	202:206	202:206	202:206	202:206	202:206
VRZAG 25	225:225	225:225	225:225	225:225	225:225	225:225	225:225	225:225	225:225	225:225
VRZAG 29	112:116	112:116	112:116	112:116	112:116	112:116	112:116	112:116	112:116	112:116
VRZAG 30	147:151	147:151	147:151	147:151	147:151	147:151	147:151	147:151	147:151	147:151
VRZAG 47	159:167	159:167	159:167	159:167	159:167	159:167	159:167	159:167	159:167	159:167
VRZAG 62	193:203	193:203	193:203	193:203	193:203	193:203	193:203	193:203	193:203	193:203
VRZAG 64	137:159	137:159	137:159	137:159	137:159	137:159	137:159	137:159	137:159	137:159
VRZAG 67	139:152	139:152	139:152	139:152	139:152	139:152	139:152	139:152	139:152	139:152
VRZAG 79	242:244	242:244	242:244	242:244	242:244	242:244	242:244	244	244	242:244
VRZAG 83	188:194	188:194	188:194	188:194	188:194	188:194	188:194	188:194	188:194	88:194
VRZAG 93	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188
VRZAG 112	240:242	240:242	240:242	240:242	240:242	240:242	240:242	240:242	240:242	240:242
VRG 1	226	226	226	226	226	226	226	226: 228	226	226
VRG 2	157	157	157:167	108:157	157	157	157	157	157	157:167
VRG 3	214	214	214	214	214	214	214	214	214	198:214
VRG 4	193	193	150:193	150:193	193	193	193	193	193	193
VRG 5	167-193	167-193	167-193	167-193	167-193	167-193	167-193	167-193	167-193	167-193

liegt in der Kombination mit anderen Sorten, die für hochqualitative Weine stehen. In grober Vereinfachung wurden diese Sorten als Fränkisch bezeichnet und genetisch verbirgt sich dahinter der autochtone Teil der Rebsorten, der aus Wildreben entwickelt worden war. Bei einigen Sorten lassen sich die Spuren der Wildrebenabstammung noch tatsächlich erkennen. Eine bestimmte Allel Länge am Genort VVMD 7 zeigt z.B. bei Cabernet franc die Auslese aus Wildreben an. Ebenfalls konnte die Sorte Traminer als ein Hybrid aus Wildreben erkannt werden. So sehr der fränkische Teil auch heterogen erscheint, so gibt es doch so etwas wie eine Leitsorte für diesen Gen-

pool. Die Sorte Traminer und in der Folge Traminer Kreuzungen können schlechthin als der Fränkische Genpool der europäischen Rebsorten betrachtet werden. Als direkte Traminer Nachkommenschaft haben sich die Sorten Burgunder, Silvaner, Sauvignon, Rotgipfler, Kurzstingler und Grüner Veltliner herauskristallisiert. Zahlreiche andere Sorten lassen zwar den Traminereinfluss erkennen, sind aber bereits eine Nachkommenschaft eines Traminer Sämlings. So wurden die Sorten Chardonnay, Aligote und Melon sowie Auxerrois als Burgunder Sämlinge erkannt und weisen folglich Traminer als Großelternsorte auf (*Abbildung 1*). Dasselbe gilt für Silva-

ner und Sauvignon Nachkommenschaft. An zahlreichen Abstammungsbäumen lässt sich Traminer als eine Ursprungssorte eruieren. So kann man auch für Cabernet Sauvignon einen respektablen Einfluss der Sorte Traminer attestieren. Unter den *Vitis silvestris* Genotypen konnte der Typ Gmelin auch genetisch als äußerst homolog zu Traminer bestätigt werden. Die zahlreichen identen Allele, aber auch die großen Ähnlichkeiten in der Morphologie erhärten den Verdacht, dass sich Traminer aus Wildreben (*V. silvestris* var. Gmelin) entwickelt hat. Die Wildreben als solche, sind eher von heterogener Natur und lassen verschiedene Entwicklungsstadien erkennen.

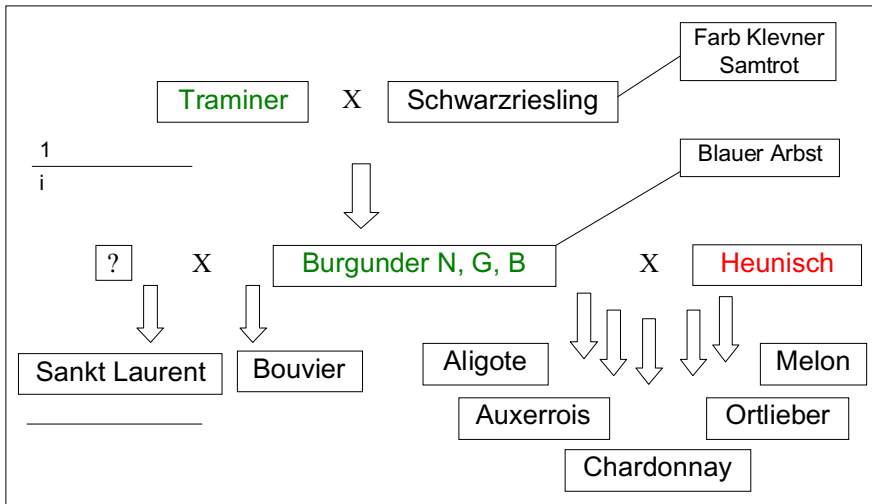


Abbildung 1: Burgunder Stammbaum

Dabei läßt sich von stark homozygoten Genotypen die Entwicklung bis zu *Vitis vinifera* ähnlichen Typen wie z.B. der oben genannten Gmelin erkennen. Durch die intensive Einkreuzung einiger weniger Leitsorten ergibt sich ein Verwandtschaftsverhältnis zahlreicher Sorten und generell kann festgestellt werden, dass die genetische Breite von *Vitis vinifera* als eher eng zu betrachten ist. Abschließend kann festgestellt werden, dass sich der Überblick über die Rebsor-

ten nur sehr schwer gewinnen lässt, aber mittels genetischer Marker konnten zahlreiche Abstammungen ermittelt und die wichtigsten Zusammenhänge innerhalb unserer Rebsorten erkannt werden. Die wahrscheinlich erfolgreichste Zuchtstrategie seit es Rebenselektion gibt, ist die Kombination Heunisch x Fränkisch, auch wenn die Strategie sich eher durch die gemeinsame Anpflanzung der Elternsorten als auf aktive Zuchtarbeit zurückführen lässt. Was sich durch Jahrhunderte

im Weinbau behaupten konnte, bedarf keiner extra Beurteilung. Besonders interessant dürfte dabei auch der Umstand sein, dass diese Sorten heute weltweit gut zu kultivieren sind und Neupflanzungen zum Großteil mit Sorten aus der Heunisch x Fränkisch Abstammung durchgeführt werden.

Literatur

- BOWERS J.E., DANGL G.S., VIGNANI R., MEREDITH C.P., (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). Genome 39: 628-633.
- REGNER F., STADELBAUERA., KASERER H. und EISENHELD C. (1998) Evaluierung von Burgunder Klonen unter agrarisch genetischen Aspekten. Mitteilungen Klosterneuburg 48: 193-202.
- REGNER F, STADLBAUERA. und EISENHELD C. (1998a) Heunisch x Fränkisch - ein wichtiger Genpool europäischer Rebsorten. Vitic. Enol. Sci. 53 (3): 114-118.
- SEFC K., REGNER F., TURETSCHKE E., GLÖSSL J., and STEINKELLNER H. 1999 Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability to genotype different *Vitis* species. Genome 42: 367-373.
- THOMAS M.R., SCOTT N.S. (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence tagged sites (STSs) Theor. Appl. Genet. 88: 1-6.