

Sortensicherheit bei Obst und Wein mittels genetischer Analysen

F. REGNER

Sortenidentifizierung

Mittlerweile gehört die genetische Identifizierung von Obst- und Rebsorten zum Standardrepertoire der modernen Botanik. Dort wo es sortenmäßige Unsicherheiten gab, kann jetzt mit analytischer Sicherheit vorgegangen werden. Die auf Mikrosatelliten beruhende Identifizierung hat sich von allen genetischen Verfahren als die brauchbarste herausgestellt. Die Vorteile sind vor allem: die hohe Reproduzierbarkeit, die Stabilität der Ergebnisse, die Vergleichbarkeit der Daten, die Datenbanktauglichkeit und Kenntnis der Sequenz, die vervielfältigt wird. Alle diese Vorteile führten auch zur Gerichtstauglichkeit dieses Verfahrens. Die genetische Identifizierung versteht sich aber nicht als alleiniges Instrument sondern als zusätzliche Möglichkeit. Jedenfalls sollte damit eine Sortensicherheit von bisher nicht gekanntem Niveau möglich werden.

Rebenidentifizierung

Die häufigsten Probleme der Weinbaupraxis in der Identifizierung gab und gibt es zwischen Weißburgunder und Chardonnay, St. Laurent und Blauer Burgunder, Cabernet und Merlot sowie anderen internationalen Rotweinsorten. Aber auch unbekannte Sorten können des öfteren nach einer genetischen Analyse als eigenständige Sorte erkannt werden. Noch wichtiger ist die genetische Analyse für die Sortenbestimmung bei Unterlagsreben. Dort wurden bisher sehr große Mängel in der Sortensicherheit festgestellt. Doch wenn man sich die verschiedenen Klone und Typen dieser und vieler anderer Sorten in vivo genauer ansieht, so entdeckt man sehr wohl eine erstaunliche Variation innerhalb einer Sorte. Diese Variation geht eben bei manchen traditionellen Rebsorten über die Sortengrenze hinaus und verhindert somit die klare Abgrenzung zu benach-

barten Rebsorten. Vor allem bei Rebsorten, bei denen es auf engem genetischem Raum zahlreiche Sorten, Typen und Mutanten gibt, verschwimmt das eindeutige Sortenprofil. Wenn man aus diesen Erkenntnissen einen Schluß ziehen wollte, so läßt sich feststellen, dass es unterhalb der Sorten noch die Ebene des Types (Genotypes) gibt. Dieser kann manchmal sogar phänotypisch in Erscheinung treten, dann sollte visuell eine Trennung möglich sein. In vielen Fällen wird man aber Typen erst nach einer genetischen Analyse in sogenannte Genotypen unterteilen können. Diese Erkenntnis ist vom Prinzip nicht wirklich etwas neues, sondern wird in der Klonenzüchtung bereits seit Jahrzehnten umgesetzt. Natürlich ist der genetische Aspekt einer Rebe zusätzlich noch von zahlreichen Einflüssen wie Boden, Klima und Phytopathologie überlagert, sodass es erst der Methoden der Molekularen Biologie bedurfte, um dieses Problemfeld einigermaßen lösen zu können. Da aber für die Winzer neben der Sorte vor allem der Klon von Bedeutung ist, reicht es nicht aus, bloß die Sorte zu erkennen. Was aber kann die genetische Analyse zur Klonenidentifizierung beitragen?

Klonenidentifizierung

Ähnlich wie bei der Sortenidentifizierung benötigt man bestimmte genetische Marker, die ein Erkennen eines Klones ermöglichen. Während man sich aber bei der Sortenanalyse auf möglichst stabilen Regionen im Genom bewegt, wird man für die klonalen Unterschiede eher die hypervariablen Abschnitte aufsuchen. Für die analytische Sortenidentifizierung mittels Mikrosatelliten wurden daher jene Genorte ausgewählt, die zwar genug Unterscheidungspotenzial innerhalb der Rebsorten aufweisen, aber sich auf einer stabilen Region befinden, sodass der Genort in den meisten Sorten noch vorhanden ist. Bei der Klonenidentifizie-

rung kann dann auf jene Marker zurückgegriffen werden, die keine ausreichende Stabilität in der Sortenanalyse erkennen lassen. Es ist aber auch wesentlich schwieriger mit diesen Markern umzugehen, da sie bei Veränderung der Reaktionsbedingungen mit erheblichen Änderungen im Bandenmuster reagieren können. Wichtig erscheint uns jedoch die Verwendung einer Markerklasse, die eine hohe Reproduzierbarkeit erlaubt. Daher erscheinen AFLP und RAPD für eine Identifizierung nicht geeignet zu sein. Obwohl beide Technologien für die Differenzierung und Unterscheidung von Genotypen gut geeignet sind. Mittels derartiger Mikrosatelliten konnten wir eine klonale Unterscheidung von Traminer (REGNER et al. 2002) und Riesling Klone (REGNER et al. 2000) durchführen. Dabei haben diese Sorten natürlich den Vorteil, dass sie beide sehr alte Sorten sind und somit sich eine große Variation innerhalb der Sorten auffinden läßt.

Letztendlich scheint es nur mehr eine Frage der Zeit zu sein, bis sich die heutigen technischen Möglichkeiten weit genug verbreitet haben, um von einer Kontrollmöglichkeit zu einem Klonenschutz vorzudringen. In letzter Zeit vollzog sich im Rahmen des EU Projektes GenRes 081 ein Durchbruch in der Vergleichbarkeit der genetischen Identifizierungsergebnisse. Dies birgt auch die Chance in sich, auf dem Weg zur Kloncharakterisierung auf genetischer Basis vorwärts zu kommen.

Standardisierung

Im Rahmen des Projektes wurde versucht, die Sortenidentifizierung auf gemeinsame Füße zu stellen. Neben den schon bisher gebräuchlichen beschreibenden Daten und Messparameter wurden genetische Marker zur Sortenidentifizierung eingesetzt. Dabei war die Entscheidung welche Genorte verwen-

Autor: Dipl. Ing. Ferdinand REGNER, Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg, Abteilung Rebenzüchtung, Rehgraben 2, A-2103 LANGENZERSDORF



det werden sollen, der einfachere Teil. Da zu diesem Zeitpunkt nur ca 20 Genorte veröffentlicht waren, wurden aus diesen jene 6 Genorte ausgewählt, die bis dahin ein sehr hohes Differenzierungspotenzial zeigten. Die Anzahl an Markern reicht bei weitem aus, um alle Sorten (die genetisch eine eigenständige Sorte sind) zu unterscheiden. Folgende Mikrosatelliten Marker wurden für die Sortenidentifizierung ausgewählt: VVS 2 entwickelt in Australien (THOMAS et al. 1993), VVMD 5, VVMD 7, (BOWERS et al. 1996) VVMD 27 BOWERS and MEREDITH 2000) entwickelt in Kalifornien und VRZAG 62 und VRZAG 79 (SEFC et al. 2000) entwickelt von unserer Arbeitsgruppe.

Es wurden DNA Proben in einem Ringversuch analysiert. Die Ergebnisse waren allerdings ernüchternd. Nur an einigen Genorten und nur in einigen Labors stimmten die Werte überein. Da ein Genort aber durch die Basenabfolge definiert ist, hat er auch eine absolute Länge in Basenpaaren. Würden nun alle Labors unter den selben standardisierten Bedingungen die Allellängen-Messung auf Sequenzermittlungs-Basis durchführen, so könnte man diesen Anspruch der absoluten Länge gerecht werden. Der Versuch scheiterte am Widerstand der einzelnen Teilnehmer, die ihre Daten abändern hätten müssen.

In der herkömmlichen Sortenbeschreibung wird zu verschiedenen Ausprägungsstufen jeweils eine Referenzsorte genannt. Man könnte die Allele eines Genortes auch so definieren, indem man von der absoluten Länge absieht, und eine relative Länge mit Bezug zu einer bekannten Rebsorte anführt. Daher kann z.B. die Allellänge für Riesling am locus VVMD 5 in einem deutschen Labor länger sein als in Österreich, aber es wird in beiden Fällen als Rieslingallel erkannt. Um aber die, in den verschiedenen Rebsorten vorkommenden Allellängen abzudecken, wurden im Rahmen des Projektes weitere Sorten analysiert und gleichsam einem Längenstandard eine Abfolge von typischen Sortenallelen entworfen. Ein derartig definierter Genort kann als genetischer Deskriptor in Analogie zu den ampelographischen Deskriptoren verwendet werden (Tabelle 1). Der einzige Unterschied zu den bisherigen Deskriptoren ist, dass man nach der Bestim-

Tabelle 1: Genetischer SSR Marker VRZAG 79 wie er dem OIV als offizieller Deskriptor zur Beschreibung von Reben vorgeschlagen wurde*

VRZAG79 Rel. Allellänge	Code Beispiel Allele	Sorten
n	BLFR 1	Blaufränkisch 1, Romorantin 1, Furmint 1
n+2	BU 1,	Burgunder 1, St Laurent 1
n+4	PR 1	Primera 1
n+6	CH 1	Chardonnay 1, Barbera N1, Rheinriesling 1
n+8	CH 2	Chardonnay 2, Burgunder 2, Traminer 1, Rheinriesling 2
n+10	CF 1	Cabernet Franc 1, Sultanina 1,
n+12	SY 1	Sylvaner 1, Gr. Veltliner 1
n+14	TR 2	Traminer 2, Muskateller1, Roter Veltliner 1
n+16	Vital 2	Vital B2, Arneis 2, Mettisage N2
n+18	MU 2	Muskateller 2, Kober 5BB 2
n+20	AD 2	Admirable B2, Gloria Hungaria 2, Nimrang 2
n+22	CF 2	Cabernet Franc 2, Gutedel 2
n+24	BI 2	Bianca 2, Mourvedre N2, Seyval 2
n+26	RI99 2	Richter 99 2, Paulsen 1103 2,
n+28	EI 2	Elvira 2
n+30	FR 2	Freedom 2, LN33 2

* Die Allele sollen keine absoluten Werte sondern relative im Bezug zu bekannten Rebsorten aufweisen. Zusätzlich wird auch die Primersequenz genannt. Der gesamte locus ist bei der HBLA u BA Klosterneuburg einsehbar.

mung aller 6 Genorte die Sorte einwandfrei zuordnen kann. Da die Standardisierung der Sortenidentifizierung zwar ein weiterer Meilenstein in der genetischen Analyse von Rebsorten ist, kann gespannt darauf geachtet werden, ob eine Harmonisierung im Bereich Klonenidentifizierung realisierbar sein wird. Die Zielrichtung geht aber in Richtung der Suche nach Markern, die mit einer spezifischen Eigenschaft verbunden sind. An diesen Utopien wird weltweit gearbeitet. Vielleicht haben wir schon bald den genetischen Überblick über die quasi gläserne Rebe, bei der vieles alleine durch die Erbsubstanz vorhersehbar ist.

Obstsortenidentifizierung

Ähnliche Identifizierungssysteme wie bei Rebe werden zur Zeit gerade für Apfel aufgebaut. Dabei läßt sich bemerken, dass die Erkennung von modernen Apfelsorten in Analogie zur Rebe ablaufen kann. Bei alten Sorten wie zum Beispiel dem Brünnerling, gibt es das massive Problem der Sortenechtheit. Unter einem Namen tauchen dann sehr viele verschiedene Genotypen auf. Eine endgültige Festlegung der Sortenbezeichnung kann aber sinnvollerweise nur in Übereinstimmung mit der Pomologie stattfinden. In etwa werden aber 4-6 Marker ausreichen um die Apfelsorten eindeutig identifizieren zu können. Sehr viele der Apfelmarker sind aber nicht öffentlich zugänglich. Einige dieser

Marker können auch für die Identifizierung von Birnensorten (*Pyrus communis*) verwendet werden. Eine nationale Datenbank ist im Aufbau.

Für die Prunus Arten gibt es zwei wesentliche Quellen von SSR Markern. Der Vorteil bei diesen Markern ist die weitreichende Verwendungsmöglichkeit. So gibt es einige SSR Marker, die aus Pfirsich soliert wurden und die für die Erkennung von Marille (*Prunus armeniaca*), Pfirsich (*Prunus persica*), Zwetschke (*Prunus domestica*) und Kirsche (*Prunus avium*) sowie Mandeln verwendet werden können. Jedoch ist die Anzahl an zu verwendenden Marker zur eindeutigen Identifizierung wesentlich größer als bei Rebe und Apfel. Dies beruht einerseits auf den weniger polymorphen Genorten, andererseits auf die genetisch ähnlicheren Genotypen im Sortenstatus. Für nicht heimische Obstarten wie Olive, Kiwi, Kastanien, Zitrusfrüchten und andere gibt es ebenso die Möglichkeit einer genetischen Identifizierung mit Mikrosatelliten.

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
- BOWERS, J. E., DANGL, G. S., MEREDITH, C. P. 1999. Development and Characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. Am. J. Enol. Vitic. 50 (3): 243-246

- REGNER, F., STADLBAUER A., KASERER, H., Eisenheld, C., 2000. Genetic relationships among Pinots and related cultivars Amer. J. of Enol. & Vitic. 51: 7-14
- REGNER, F., WIEDECK, E., STADLBAUER, A. 2000. Differentiation of White Riesling clones by genetic markers. Vitis 39 (3): 103-107
- REGNER, F., KASERER, H., EISENHELD, C., HAAS M., 2002 Unterscheidungsmöglichkeiten innerhalb der Sorte Traminer Mitt. Klosterneuburg eingereicht
- SEFC, K. M., REGNER, F., TURETSCHKE, E., GLOESSL, J., STEINKELLNER, H. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability to genotype different Vitis species. Genome 42: 1-7
- THOMAS, M. R., SCOTT, N. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet. 86: 985-990

