

Rebsortenbestimmung mit «kriminaltechnologischen» Methoden

An der Agroscope FAW Wädenswil wurde im letzten Jahr eine Methode weiter ausgearbeitet, die ermöglicht, unabhängig von der Jahreszeit und von Expertenwissen Rebsorten innerhalb kurzer Zeit zu identifizieren. Dem Verfahren zu Grunde liegt die Multiplex-Analyse eines genetischen Fingerabdrucks. Die Erkennungsmerkmale werden in eine Datenbank aufgenommen, die neben häufig kultivierten Sorten vor allem auch alte Schweizer Rebsorten umfasst. Die Einträge sind dank Standardisierung international mit Daten aus anderen Labors vergleichbar.

ANDREA FREI, NAOMI A. PORRET, DANIEL BAUMGARTNER,
JÜRIG FREY UND JÜRIG GAFNER, AGROSCOPE FAW WÄDENSWIL
andrea.frei@faw.admin.ch

Der Vergleich mit der Kriminaltechnologie ist kein Grund zur Beunruhigung. Die Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen der Agroscope FAW Wädenswil werden für die Bestimmung von Rebsorten auch in Zukunft weder an zweifeltigen Tatorten auftauchen, noch unter Polizeischutz zur Probenbeschaffung ausrücken. Einzig die Bestimmungsmethode lässt sich vergleichen mit der DNA-Analyse, die zur kriminologischen Überführung von Tätern oder bei Vaterschaftstests angewendet wird. Die Grundlage für den Nachweis liefert ein genetischer Fingerabdruck, dessen Muster einmalig ist für eine Person, eine Art oder eben eine Rebsorte.

Welche Sorte wächst denn da?

Historisch werden Rebsorten auf Grund morphologischer und physiologischer Merkmale bestimmt. Bei der so genannten Ampelografie werden das Aussehen, die Form und Farbe der Blätter, der Beeren und des Holzes beurteilt. Dies setzt langjährige Erfahrung und Übung in der Sortenbestimmung voraus. Die genetischen Methoden bedeuten eine Ergänzung der klassischen Sortenbestimmung. Sie basieren auf Merkmalen des Erbguts, die – im Gegensatz zu den konventionellen Merkmalen – nicht von Klima, Bodenbeschaffenheit und anderen Faktoren beeinflusst werden. Ausserdem können die Tests theoretisch das ganze Jahr hindurch durchgeführt werden. Alles, was man dazu an Pflanzenmaterial braucht, ist im besten Fall ein kleines Rebenblatt.

Die genetische Analyse einer Sorte kann zwar verschiedene Pflanzen innerhalb kurzer Zeit unterscheiden und zuordnen, sie sagt aber nichts über den Sortennamen aus. Oder genauer: Jemand muss erst einmal ganz klar definieren, dass die Sorte XY Rauschling genannt wird. Dann wird von dieser Pflanze ein genetisches Profil erstellt. Aufgrund dieses Profils

wird dann in Zukunft entschieden, welche anderen Rebstöcke ebenfalls dem Profil Rauschling entsprechen und welche nicht. Es ist deshalb ungemein wichtig, dass die Sorten ursprünglich richtig bezeichnet sind, um darauf basierend eine verlässliche Datenbank aufbauen zu können.

Es mag zunächst etwas erstaunlich klingen, aber man muss allgemein davon ausgehen, dass in Rebsortensammlungen etwa 5 bis 10% der Sorten falsch benannt, also nicht «true-to-type» (sortenecht) sind. Auch existieren zum Teil bis zu 100 Synonyme (= verschiedene Namen) für die gleiche Sorte sowie zahlreiche Homonyme (gleicher oder sehr ähnlich ausgesprochener Name, aber anders geschrieben). Die Klärung von Synonymen, Homonymen und Falschbenennungen ist ein anerkanntes Problem in den zirka 130 Rebsortensammlungen, die weltweit existieren (Dettweiler et al. 2000).

Prominentes Verwechslungsbeispiel: die Sorte Müller-Thurgau

Eines der bekanntesten Abstammungs- und Sortenprobleme war in der jüngeren Vergangenheit die Suche nach dem «Vater» der berühmten Müller-Thurgau-Rebe, bei uns bekannt unter dem Namen Riesling × Silvaner. Die «Mutter» dieser Sorte ist unumstritten ein Riesling, dass der «Vater» aber ein Silvaner sein soll, daran hat offenbar schon der Züchter Müller gezweifelt. Eindeutige Beweise dafür hat man aber erst seit den 90er Jahren, als die genetische Analyse erste Resultate lieferte. Die Geschichte ist aber verworren und wegen ein paar weiteren Verwechslungen auch etwas kompliziert. Schliesslich kamen die Versuchsanstalt Geilweilerhof (D) wie auch die Bundeslehranstalt Klosterneuburg (A) zum Schluss, dass der Pollenspender die Sorte Madeleine Royale – die königliche Magdalenentraube – gewesen sein muss. Das Resultat konnte auch an der FAW bestätigt werden, wo die Urrebe Müller-Thurgau wächst, der Stock No. 58. Somit gilt heute: Müller-Thurgau ist gleich Riesling × Madeleine Royale (Tab. 1).

Tab. 1: Fallbeispiel Müller-Thurgau. Genetisches Profil von vier Rebsorten an sechs Marker-Orten mit je zwei Allelen (Längen in Basenpaaren). Sind alle 12 Allele von gleicher Länge, handelt es sich um zwei identische Sorten. Hier dargestellt kann man sehen, dass die Sorte Müller-Thurgau als Nachkomme von Riesling und Madeleine Royale je ein Allel von Mutter und Vater geerbt hat. Diese sind rot hervorgehoben. Man sieht auch, dass der Silvaner als Vater nicht in Frage kommt.

Rebsorte	Status	Marker 1	Marker 2	Marker 3	Marker 4	Marker 5	Marker 6
Müller-Thurgau («Riesling × Silvaner»)	Kind	141 – 150	223 – 225	245 – 255	180 – 180	194 – 194	242 – 244
Riesling	Mutter	141 – 150	223 – 231	247 – 255	180 – 188	194 – 204	242 – 244
Madeleine Royale	Vater	150 – 154	225 – 233	241 – 245	180 – 188	188 – 194	244 – 258
Silvaner		150 – 152	223 – 229	241 – 245	188 – 192	188 – 204	248 – 250

Die Mikrosatelliten: Weltraumforschung?

Zugegeben, die Bezeichnung Mikrosatelliten erinnert spontan an Mikroskope und Weltraumforschung, hat aber damit nichts zu tun. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um eine spezielle Form von genetischen Markern, also um bestimmte Abschnitte der DNA. Sie sind deckungsgleich bei Pflanzen der gleichen Sorte, unterscheiden sich aber deutlich in verschiedenen Sorten. Die Mikrosatellitenanalyse ist eine von vielen Möglichkeiten zur DNA-Bestimmung und wird weltweit bei der Identifikation von Rebsorten eingesetzt. An jedem Gen-Ort kommen zwei so genannte Allele

vor, die bezüglich ihrer Länge gleich oder unterschiedlich sein können. Bestehen zwischen zwei Pflanzen Unterschiede in den Allel-Längen an einem festgelegten Gen-Ort, so gehören die Individuen zwei verschiedenen Sorten an. Sind die Längen an allen (untersuchten) Gen-Orten gleich, kann von der gleichen Sorte ausgegangen werden (Tab. 2).

In Tabelle 1 ist als Beispiel die Abstammung der Sorte Müller-Thurgau dargestellt. Gemäss der Vererbungslehre müssen je ein Allel des Kreuzungsprodukts vom Vater und eines von der Mutter stammen. Aus der Aufstellung ist ersichtlich, dass das Müller-Thurgau-Profil nur aus der Kombination Riesling ×

Tab. 2: Completer und Lafnetscha, zwei alte Schweizer Sorten. Häufig wird in der Literatur behauptet, dass es sich um die gleiche Sorte handelt. Mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei diesen beiden Namen nicht um Synonyme, sondern um zwei verschiedene Sorten handelt. Ausserdem konnten fälschlicherweise als Lafnetscha oder Humagne blanc bezeichnete Stöcke analysiert, mit der Datenbank verglichen und als eine andere Sorte identifiziert werden.

DNA Nr ¹	Rebsorte beschriftet	True-To-Type	Rebsorte korrigiert	Marker 1	Marker 2	Marker 3	Marker 4	Marker 5	Marker 6
123 (2)	Completer A41,5	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
128 (alt)	Completer A41,4	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
248 (alt)	Completer T1	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
249 (alt)	Completer P3	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
250 (alt)	Completer B1	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
251 (alt)	Completer B2	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
252 (alt)	Completer A41,6	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
276 (alt)	Completer PH16_1	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
278 (alt)	Completer PH15_1	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
280 (alt)	Completer PH1	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
283 (alt)	Completer Bo5	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
284 (alt)	Completer Bo6_1	ja		137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
117 (2)	Lafnetscha A46,4	ja		131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258
124 (2)	Lafnetscha A46,5	ja		131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258
254 (2)	Lafnetscha A46,6	ja		131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258
288 (neu)	Lafnetscha T8,2	ja		131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258
292 (neu)	Lafnetscha V1	ja		131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258
293 (neu)	Lafnetscha V2	ja		131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258
255 (alt)	Lafnetscha T2	nein	Completer	137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
289 (neu)	Lafnetscha T1	nein	Completer	137 – 154	225 – 229	231 – 237	178 – 184	194 – 196	244 – 258
253 (2)	Lafnetscha V3	nein	Heida	150 – 150	229 – 235	241 – 255	188 – 188	188 – 194	244 – 250
330 (2)	Humagne blanc A46,2	nein	Lafnetscha	131 – 154	225 – 233	237 – 251	178 – 184	194 – 200	238 – 258

¹ Die DNA wurde entweder nur mit der alten Methode (alt), nur mit der neuen Methode (neu) bzw. mit beiden Methoden analysiert (2). Die Resultate sind kompatibel.

Madeleine Royale entstehen konnte, nicht aber aus der Kreuzung Riesling × Silvaner. Für die Analysen von Verwandtschaftsverhältnissen sind Untersuchungen an sechs Marker-Orten allerdings nicht ausreichend, es braucht etwa 30 bis 50 davon, aber zur Veranschaulichung genügt dieses Beispiel.

Einfacher ist das Problem der Sortenbestimmung. Dabei müssen die genetischen Profile bei gleicher Sorte 100% übereinstimmen, also hier an sechs Marker-Orten mit total zwölf Allelen. Ist die Sorte nicht gleich, unterscheiden sich immer mehrere Marker. Von einer unbekanntem Sorte kann also zunächst das genetische Profil bestimmt werden. Dieses wird dann mit den Angaben in einer Datenbank verglichen, worauf eindeutig festgelegt werden kann, ob die Daten denjenigen einer bereits vorhandenen Sorte entsprechen.

Das Erstellen einer Rebsorten-Datenbank

Das nächste Problem: Wie kommt man zu einer zuverlässigen Datenbank mit genetischen Profilen, die als Vergleichsgrundlage herangezogen werden können? Als Grundlage dienen Rebsorten, die eindeutig bestimmt sind und zu einer definierten Sorte gehören. Dies ist relativ einfach bei bekannten Sorten wie Pinot noir, Chasselas, Silvaner etc. Etwas schwieriger wird es bei alten und wenig bekannten Sorten. Besonders bei nicht klar definierten Sorten ist es wichtig, Material von verschiedenen Pflanzen aus verschiedenen Anbaugebieten zu erhalten, die nicht aus der gleichen Rebschule stammen. Dies ist in der kleinen Schweiz nicht immer einfach.

In der Literatur finden sich zudem häufig Synonyme, die sich als falsch herausstellen, oder Sorten erweisen sich als identisch. Als Beispiel seien hier die alten Bündner respektive Walliser Sorten Completer und Lafnetscha aufgeführt: Sie werden in der älteren Literatur als Synonyme geführt. Diese Zuordnung auf Grund von ampelografischen Ähnlichkeiten hat sich aber als falsch herausgestellt. Es handelt sich um zwei verschiedene Sorten (Vouillamoz et al. 2004). Unsere DNA-Resultate bestätigen diese Beobachtung. Ein anderes Beispiel wären die beiden alten Schweizer Sorten Brigler und Hitzkircher, über die ebenfalls in der Literatur zu lesen ist, dass es sich um ein und dieselbe Sorte handelt. Eine Analyse in unserem Labor konnte aber eindeutig zeigen, dass es zwei verschiedene Sorten sind.

Um ein verlässliches Profil einer Sorte, des «true-to-type-Vertreters» zu erhalten, ist es wie erwähnt nötig, Blattproben von möglichst vielen verschiedenen Standorten zu sammeln und die genetischen Daten zu vergleichen. Im Falle von Completer und Lafnetscha wurden Blätter von zwölf als Completer bezeichneten Pflanzen an fünf verschiedenen Standorten gesammelt. Im Falle Lafnetscha waren dies neun Proben von drei verschiedenen Standorten. So konnte schliesslich sowohl der Sorte Completer als auch der Sorte Lafnetscha ein eindeutiges Profil zugeordnet werden, das durch mehrere Repetitionen aus verschiedenen Gegenden der Schweiz abgestützt ist (Tab. 2). Die Profile sind eindeutig verschieden; es handelt sich also um zwei verschiedene Sorten.

Gleichzeitig gab es aber auch Sorten, die nicht in das Profil passten und die das Vorhandensein von Falschenennungen bestätigen: Vier untersuchte Proben entsprachen nicht der Bezeichnung: Bei drei «Lafnetscha» und einer «Humagne blanc» handelte es sich um zwei Completer, eine Heida/Savagnin blanc und andererseits eine Lafnetscha.

Methodenoptimierung – Zeiteinsparung

Einer der Gründe, weshalb die FAW mit der Bestimmung der Rebsorten trotz Ressourcenknappheit weiterfahren will, ist die Verbesserung der Methode. Mikrosatelliten-Analysen waren in der Vergangenheit sehr aufwändig. Die Rebenblätter mussten in flüssigem Stickstoff gemörsert und die DNA in mehreren Schritten extrahiert werden – mit teilweise giftigen Chemikalien. Danach musste für jeden Mikrosatelliten-Marker separat mittels der so genannten PCR-Reaktion die DNA-Menge erhöht werden. Anschliessend wurden die Produkte auf grossen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, mit Silbernitrat angefärbt und die entstandenen Farbbanden (Abb. 1) lokalisiert und verglichen.

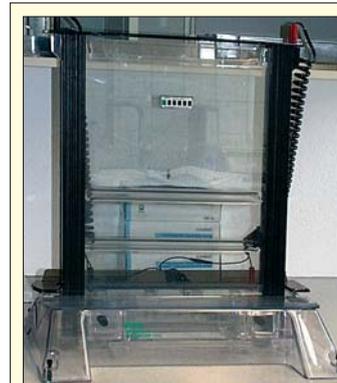


Abb. 1: Bei der alten Methode der genetischen Analyse wurden die bei der PCR-Reaktion entstandenen Produkte auf grossen Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (links), diese mit Silbernitrat angefärbt und «von Auge» auf dem Gel abgelesen (unten).



Im vergangenen Jahr konnte eine Methode, die ursprünglich durch unsere Gruppe für molekulare Diagnostik für die Analyse von Apfelbäumen entwickelt wurde (Frey et al. 2004), erfolgreich für die Rebenanalysen angepasst werden. Die DNA-Extraktion umfasst jetzt eine Schnellmethode, die PCR-Reaktion wird mit sechs Markern gleichzeitig durchgeführt, die Auftrennung geschieht auf einem 16-Kapillar-Sequenziergerät und die Daten werden mit einem Computerprogramm ausgewertet (Abb. 2). Insgesamt konnte die Analysezeit auf etwa einen Viertel reduziert werden.

European Vitis Database

Das EU-Projekt GenRes 081 (1997 bis 2002) hatte die Erstellung eines «Europäischen Netzwerks zur Kon-

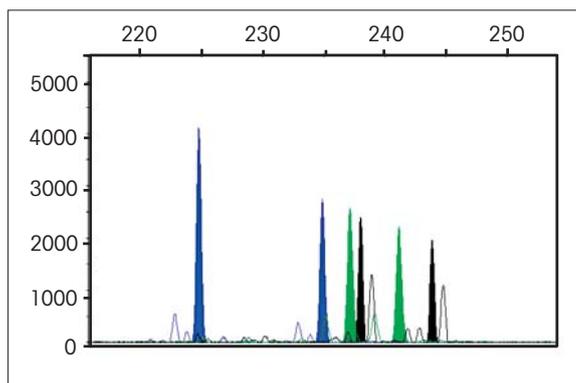


Abb. 2: Bei der neuen Methode der genetischen Analyse werden die Produkte der PCR-Reaktion auf einem Sequenziergerät in Kapillaren aufgetrennt. Es können 16 Proben in 16 Kapillaren gleichzeitig analysiert werden. Der Computer berechnet die Resultate und gibt sie in Form von Peaks bzw. Längen an.

servierung und Charakterisierung der genetischen Vielfalt von Reben» zum Inhalt. Im Rahmen dieses Projekts wurde eine europäische Reben-Datenbank, die «European Vitis Database» erstellt, die über Internet zugänglich ist. Diese Datensammlung enthält bis anhin morphologische Sortenbeschreibungen, soll aber zukünftig auch mit genetischen Profilen ergänzt werden. In einer Projektgruppe zur Definition und zum Vergleich der genetischen Markerprofile nahmen zehn Partner aus sieben europäischen Ländern und den USA teil. Dabei wurden sechs Mikrosatelliten-Marker als Minimum zur eindeutigen Definition einer Rebsorte festgelegt. Im Rahmen dieses EU-Projekts wurde auch eine Codierung zum Vergleich der Resultate entwickelt. Sie basiert auf den genetischen Profilen weltweit bekannter Referenzsorten. Wir verwenden an der FAW die gleichen sechs Marker und die Codierung kann mit wenig Aufwand auch auf die von uns generierten Daten angewendet werden, was sie international vergleichbar macht. Bis anhin wurden in der Schweiz noch nicht viele Rebsorten genetisch charakterisiert. An der FAW wurde schon vor ein paar Jahren mit dem Aufbau einer entsprechenden Datenbank begonnen. Diese konnte in diesem Jahr dank der verbesserten Methode um über 30 Sorten erweitert werden. Im Moment verfügen wir über die genetischen Profile von etwa 180 Rebsorten.

Zur Umsetzung des globalen Aktionsplans der FAO zur Erhaltung der Artenvielfalt unterstützt das Bundesamt für Landwirtschaft mehrere Projekte im Rahmen des «Nationalen Aktionsplan für die Erhaltung und Nutzung von pflanzengenetischen Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft (NAP)». Mehrere solcher Projekte werden aktuell in der Schweizerischen Kommission zur Erhaltung von Kulturpflanzen (SKEK), der Pro Specie Rara sowie in andern Kommissionen oder an Landwirtschaftlichen Schulen durchgeführt. Im Moment arbeitet die FAW im Rahmen eines Projektanstosses des Forums Forschung Wein bei der Charakterisierung eines Sortengartens in Frumsen (SG) mit. Mit der genetischen Analyse können die Sortenbeschreibungen ergänzt werden, wobei auch die Datenbank der FAW erweitert und allenfalls korrigiert werden kann. Im Rahmen des NAP-Projekts wird zudem in Zusammenarbeit mit der Fachhochschule Wädenswil das Sortiment der Sortengartens Halbinsel Au definiert und überprüft.

Auf Ende des Jahres wird angestrebt, die Datenbank öffentlich zugänglich zu machen (Internet) und die Möglichkeit einer Zusammenarbeit mit der Europäischen Datenbank wird abgeklärt. Möglicherweise kann auch eine Dienstleistung zur Verifizierung unbekannter Rebsorten angeboten werden. Weitere Auskünfte erteilt: Andrea Frei, Agroscope FAW Wädenswil, E-Mail: andrea.frei@faw.admin.ch, Tel. 044 783 63 82.

Literatur:

Frei A., Baumgartner D., Frey J.E. and Gafner J.: Optimized identification of grapevine cultivars using multiplex microsatellite markers. *Botanica Helvetica* 114/2: 169–179, 2004.

Frey J.E., Frey B., Sauer C., and Kellerhals M.: Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breeding*, 123, 554–557, 2004.

Detweiler E., Jung A., Zyprian E. and Töpfer R.: Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true to type descent. *Vitis* 39: 63–65, 2000.

Vouillamoz J.F., Maigre D. and Meredith C.P.: Identity and parentage of two alpine grape cultivars from Switzerland (*Vitis vinifera* L. Lafnetscha and Himbertscha). *Vitis* 43(2): 81–87, 2004.

RÉSUMÉ

Comment fonctionne l'identification génétique des cépages?

Une méthode d'analyse génétique spéciale faisant appel aux microsattellites a été perfectionnée à l'Agroscope FAW Wädenswil pour l'identification sûre et précise des cépages. Elle permet d'identifier les cépages en peu de temps sans l'aide d'un spécialiste. La banque de données en résultant contient en plus des cépages courants de nombreux cépages suisses typiques et anciens. Les données se basent sur la caractérisation aux six points de marquage recommandés par un groupe du projet UE GenRes 081 (European Vitis Database). Elles peuvent être comparées avec les données d'autres instituts à l'aide d'un codage international. Grâce à la nouvelle méthode beaucoup plus rapide et qui permet des comparaisons bien plus étendues, il a été possible, entre temps, d'identifier plusieurs cépages inconnus, de rectifier des erreurs de nomenclature et d'établir des nouveaux profils variétaux typiques. Ainsi, des noms de cépages que l'on croyait synonymes (Brigler, Hitzkircher) ont pu être attribués sans l'ombre d'un doute à deux profils génétiques différents. Inversement, des cépages que l'on pensait différents se sont avérés identiques. Il est prévu de rendre la banque de données accessible librement sur internet à l'avenir, afin de faciliter les comparaisons internationales.