

## Genetische Analyse von Wildreben aus den Donau-Auen

Erika MAUL<sup>1)</sup>, Aron GRIESBACHER<sup>2)</sup> und Reinhard TÖPFER<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> JKI - Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

<sup>2)</sup> Nationalpark Donau-Auen GmbH, Orth an der Donau, Österreich

### Einführung

Die Bestände der europäischen Wildrebe *Vitis sylvestris* sind durch Einschleppung der Mehltaukrankheiten und der Reblaus sowie durch Zivilisationsmaßnahmen, wie Dammbau oder die Tulla'sche Rheinbegradigung im 19. Jahrhundert drastisch reduziert worden. Eine weitere Bedrohung stellt die Verunreinigung der Wildrebenpopulationen durch Polleneintrag von europäischen Kulturreben und von Rebsorten mit Erbgut nordamerikanischer Wildreben dar. Aufkeimende Sämlinge solcher Kreuzungsnachkommen sind zu identifizieren und müssen entfernt werden, um den *V. sylvestris* Genpool in seiner Originalität zu erhalten.

Ziel der Arbeit war es daher, in einer Zusammenarbeit vom Nationalpark Donau-Auen GmbH und

dem Julius Kühn-Institut (JKI), die aus den Donau Auen und aus dem WWF Auenreservat Marchegg – March-Thaya-Auen durch die Nationalpark Donau-Auen GmbH gesammelten 189 Individuen auf ihre Zugehörigkeit zum Taxon *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* zu untersuchen.

Der Nationalpark Donau-Auen erstreckt sich entlang der Donau von Wien bis zur slowakischen Grenze. Die Tieflandflüsse March und Thaya grenzen an die Slowakei beziehungsweise an Tschechien, siehe Abb. 1.

### Material und Methoden

Die von der Nationalpark Donau-Auen GmbH gesammelten Blätter wurden in getrocknetem Zustand (d.h. durch Einstreu von Silikagel) an das Institut für



Abb. 1: Verbreitungsgebiet der Wildreben.

Rebenzüchtung Geilweilerhof geschickt. Es handelte sich um folgende Proben:

- 129 Individuen aus den Donau Auen, inklusive einer Probe mit Rindenmaterial (Genotyp-Nr.: DA19\_37\_Vitis\_Gen19\_5);
- 40 Individuen aus dem WWF Auenreservat Marchegg – March-Thaya-Aue;
- 20 Taxon-echte *Vitis sylvestris* Referenzen.

Die folgenden neun SSR-Mikrosatellitenmarker (SSR = Simple Sequence Repeat) VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79 wurden zur Echtheitsbestimmung eingesetzt. Ihre Eignung zur Sortenidentifikation war durch Untersuchungen an über 3000 Rebsorten im Rahmen des EU-Projekts GrapeGen06 (2007-2011) belegt worden. Dabei gelang es die analysierten Rebsorten mit ca. 98%-iger Treffsicherheit zu differenzieren.

Bei *V. sylvestris* sind SSR-Marker weniger polymorph als bei der Kulturrebe. Das bedeutet, die Anzahl der Allele an einem SSR-Lokus sind bei *V. sylvestris* geringer und außerdem sind meist nur ein oder wenige Allele in hoher Frequenz vertreten. Da jede *V. sylvestris*-Population spezifische Allele und Allelhäufigkeiten aufweist, lieferte die Nationalpark Donau-Auen GmbH 20 Taxon-echte *V. sylvestris*. Diese Proben wurden mitanalysiert und dienten als Referenzen.

Ein sicheres Merkmal zur Beurteilung der Echtheit einer Wildrebe ist das Geschlecht. *V. sylvestris* ist immer zweihäusig. Aus diesem Grund wurden die drei Geschlechtsmarker ATP3, VVIB23 und GF02-31 eingesetzt. Die ersten beiden Marker ergänzen sich in der Geschlechtsbestimmung. Jeder für sich allein kann weiblich, männlich und hermaphrodit nicht eindeutig zuordnen. Da es sich beim Geschlecht um ein wichtiges die Echtheit von *V. sylvestris* belegendes Merkmal handelt, wurde zur Sicherheit noch ein dritter SSR-Marker (GF02-31) analysiert. Die Interpretation der Allelgrößen lautet wie folgt:

- ATP3: 268 = weiblich; 336 = weiblich und nicht *V. vinifera* (gibt Hinweis auf Einkreuzung durch eine Unterlagsrebe); 466 ist männlich oder hermaphrodit (gibt Hinweis auf Ein-

kreuzung durch Kulturrebe). Männlich und hermaphrodit sind dominant.

- VIB23: 291 = weiblich; 307 = männlich und dominant (Allel 305 ist sehr selten und nicht männlich).
- F02-31: 247-247 = weiblich; 247-259 = männlich.

Die Allel-Längenanalyse erfolgte auf einem Sequencer (Applied Biosystems 3130xl) und wurde mit der Software GeneMapper 5.0 ausgewertet.

Zur Berechnung der Allelfrequenz und zur Identifikation von Duplikaten wurde die Cervus 3.0.7 Software (S.T. KALINOWSKI, M.L. TAPER and T.C. MARSHALL. 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping) eingesetzt. Die Zuweisung von „Fremdallelen“, die nicht zum Wildrebenpool der „Donau Auen“ und „WWF Auenreservat Marchegg – March-Thaya-Auen“ gehören, sondern auf Introgression durch Kulturreben, Unterlagen oder pilzfeste amerikanische Rebsorten zurückzuführen sind, geschah durch Recherchen in der JKI-SSR-Markerdatenbank für Rebsorten am Geilweilerhof. Diese SSR-Markerdatenbank enthält die genetischen Fingerabdrücke von über 6.000 Rebsorten.



Abb. 2: Links im Bild das herunterhängende Holz der abgestürzten Wildrebe. Jungtrieb klettert entlang des Birkenstammes wieder nach oben (Foto: Aron GRIESBACHER).

## Ergebnisse

Die Ziele der Genotypisierung waren:

- Bestimmung der reinen *V. sylvestris*-Individuen.
- Identifikation der Genotypen, die nicht zum österreichischen Donau-Auen und Marchegg – March-Thaya-Auen *V. sylvestris*-Genpool gehören. Nutzung der Geschlechtsmarker und Bewertung der Zusammensetzung der Fremddallele für Hinweise zur Art der Fremdbestäuber.
- Identifikation von Duplikaten.

Die DNA-Extraktion und PCR-Analyse basierte auf getrockneten Blättern von 188 Pflanzen und Rindenmaterial von einer Pflanze (Genotyp-Nr.: DA19\_37\_Vitis\_Gen19\_5). Die DNA aus dem Rindenmaterial lieferte keine Amplifikate, während von allen 188 Blattproben PCR-Produkte und auswertbare Fragmentlängen erzeugt werden konnten.

### Bestimmung der *Vitis sylvestris*-Individuen

Die Donau-Auen-spezifischen *V. sylvestris* Allele wurden für jeden Marker ermittelt. Anhaltspunkte für die Spezifität der Allele lieferten:

- die zwanzig mitgelieferten *V. sylvestris*-Referenzen;
- der Allele-Vergleich mit *V. sylvestris*-Populationen aus Kroatien und Deutschland;
- die Zuhilfenahme der Studie von LAUCOU *et al.* 2011 (High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. Theor. Appl. Genet. **122**, 1233-1245), in der *V. sylvestris* Allele, die bis dato gefunden wurden, aufgeführt sind.

Die Allelhäufigkeiten je Marker wurden mit der Cervus-Software ermittelt. Die sehr seltenen Allele, die auf Introgression hindeuten könnten, wurden auf Zugehörigkeit zu *V. sylvestris* geprüft. Um Fremddallele zu erkennen, wurden in der JKI-SSR-Markerdatenbank diejenigen Genotypen gefiltert, die diese seltenen Allele tragen. Bei dem Allel 252 des VVMD28 Markers

waren zunächst Zweifel angebracht, ob es tatsächlich zu *V. sylvestris* gehört, denn es kommt zu 99 % bei französischen Hybriden (Keltertrauben und Unterlagen) vor. Es tritt nur bei einer Handvoll *vinifera*-Rebsorten aus dem Kaukasus und Usbekistan auf. Es scheint dennoch ein *V. sylvestris*-spezifisches Allel zu sein, da alle anderen Loci zu 100 % typische *V. sylvestris*-Allele aufweisen. Das VVMD28 Allel 252 wurde bislang in keiner anderen *V. sylvestris*-Population gefunden. Tab. 1 fasst das Ergebnis der Analyse zusammen:

- 174 der 188 analysierten genetischen Profile gehören eindeutig *V. sylvestris* an.
- 80 Individuen sind weiblich und 94 Individuen sind männlich.

### Identifikation von „Hybriden“ (Kreuzungen *V. sylvestris* x nicht *V. sylvestris*)

Vorangestellte Bemerkung: Der Einfachheit halber werden in diesem Bericht sämtliche Rebsorten, bzw. Kreuzungsnachkommen, die nicht *V. sylvestris* angehören als Hybriden bezeichnet. Die Geschlechtsmarker lieferten erste Hinweise auf Kreuzungsnachkommen von *V. sylvestris* mit amerikanischen Hybriden, denn das ATP3-Allel 336 kommt bei *V. vinifera* und *V. sylvestris* nicht vor. Insgesamt trat es bei dreizehn Proben auf, siehe Tab. 1. Dazu konnten in der SSR-Markerdatenbank zwei eindeutige Elternteile identifiziert werden: die amerikanische Rebsorte ISABELLA und die Unterlage CASTEL 196-17. Vier der dreizehn Proben besaßen an fast jedem Locus zwei Hybridallele, die auf Kreuzungen zwischen Unterlagen selbst oder mit anderen Amerikanerreben

Tab. 1: Listung der *V. sylvestris* Individuen nach Standort und Geschlecht

Standort	Weibliche Individuen	Männliche Individuen	Anzahl <i>V. sylvestris</i> -Individuen
Donau-Auen	51	63	114
Marchegg – March-Thaya-Auen	20	20	38
<i>V. sylvestris</i> Referenzen	9	11	20
Alle Standorte	80	94	174

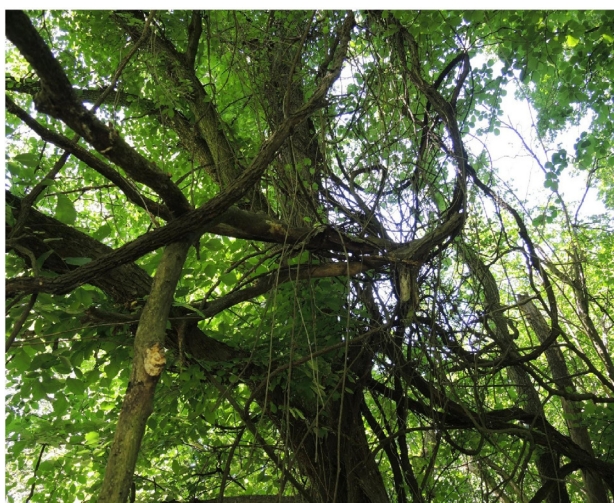


Abb. 3: Quer durcheinander wachsende Stämme und Triebe in luftiger Höhe (Foto: Aron GRIESBACHER).

hindeuten. Die Kommentarspalte in Tab. 2 enthält Details zu der genetischen Nähe zu Unterlagen und Amerikanerreben. Die Rebe mit der Probenbezeichnung MA19\_1248\_MA19\_T3 konnte eindeutig als NEUBURGER-Kind ausgewiesen werden. Diese Erkenntnis, dass Pollen von Kulturreben in die Donau-Auen flogen, deckt sich mit den Untersuchungen von Claire ARNOLD, beschrieben in der 2017 erschienen Arbeit „Insights into the *Vitis* complex in the Danube floodplain (Austria)“ (open access-Artikel in Ecology and Evolution **7**, 7796-7806). Sie berichtet von 165 untersuchten Individuen. Darunter fand sie zwei Pflanzen, die Nachkommen von jeweils *V. sylvestris* x BLAUFRÄNKISCH und *V. sylvestris* x GRÜNER VELTLINER waren.

Tab. 2: Aufstellung der Hybriden: Fünfzehn Genotypen mit Erbgut von Amerikanerreben und ein *V. sylvestris* x NEUBURGER-Genotyp

Labor-Nr.	Probenbezeichnung	Zuordnung	Kommentar zur Abstammung
2	DA19_101_Vitis_Gen19_8	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, an mehreren Loci zwei Hybridallele	F2; (Unterlage x Unterlage x <i>sylvestris</i> )?
5	DA19_104_Vitis_Gen19_8	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	OTHELLO passt außer an VVMD25, OTHELLO besitzt auch das weibliche ATP3-Allel 336; ( <i>sylvestris</i> x ?)
6	DA19_105_Vitis_Gen19_8	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	( <i>sylvestris</i> x ?)
7	DA19_106_Vitis_Gen19_8	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, an mehreren Loci zwei Hybridallele	MILLARDET ET GRASSET 101-14, außer an MD28, MD32 fehlt, F2 Hybridkreuzung
9	DA19_108_Vitis_Gen19_8	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, an mehreren Loci zwei Hybridallele	SCHWARZMANN-Kind außer an VVMD32
47	DA19_25_Vitis_Gen19_2	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, an mehreren Loci zwei Hybridallele	RIPARIA GLOIRE DE MONTPELLIER und weitere Hybriden
78	DA19_53_Vitis_Gen19_4	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, an mehreren Loci zwei Hybridallele	COUDERC 161-49-Erbmasse (keine F1)
81	DA19_56_Vitis_Gen19_4	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	ISABELLA-Kind passt auf 9 Markern; ( <i>V. sylvestris</i> x Isabella)
82	DA19_57_Vitis_Gen19_4	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, an mehreren Loci zwei Hybridallele Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	SCHWARZMANN-Kind außer an VVMD32
107	DA19_7_Vitis_Gen19_1	Hybrid, siehe VVMD27 Allel 213 und VVMD28 Allel 216, etc.	Amerikaneranteile, Elternteil nicht gefunden; ( <i>V. sylvestris</i> x ?)
117	DA19_89_Vitis_Gen19_7	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	( <i>V. sylvestris</i> x ?)
118	DA19_8_Vitis_Gen19_1	Hybrid, wegen VVMD27 Allel_213, etc.; weiblich	Amerikaneranteile, Elternteil nicht gefunden; ( <i>V. sylvestris</i> x ?)
120	DA19_91_Vitis_Gen19_7	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	( <i>V. sylvestris</i> x ?)
121	DA19_92_Vitis_Gen19_7	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	( <i>V. sylvestris</i> x ?)
135	MA19_1248_MA19_T3	NEUBURGER-Kind. Hermaphrodit	NEUBURGER-Kind, passt perfekt auf 9 Markern
156	MA19_1280_MA19_T7	Hybrid, ATP3: 336=weibliches nicht- <i>vinifera</i> -Allel, Hybrid Allele	CASTEL 196-17-Kind (CASTEL 196-17 ist männlich, war also Bestäuber); <i>sylvestris</i> x CASTEL 196-17

Tab. 3: Die fünf identifizierten *V. sylvestris* Duplikate und ein Duplikat, das *V. vinifera*-fremde Allele aufweist

Labor-Nr.	Probenbezeichnung	Geschlecht		Labor-Nr.	Probenbezeichnung	Geschlecht
184 (Referenz)	VV19_2_Vitis_Gen19_10	männlich/ <i>V. sylvestris</i>	=	133	MA19_1245_MA19_T3	männlich/ <i>V. sylvestris</i>
191 (Referenz)	VV19_9_Vitis_Gen19_10	männlich/ <i>V. sylvestris</i>	=	36	DA19_14_Vitis_Gen19_1	männlich/ <i>V. sylvestris</i>
40	DA19_18_Vitis_Gen19_1	männlich/ <i>V. sylvestris</i>	=	41	DA19_19_Vitis_Gen19_1	männlich/ <i>V. sylvestris</i>
45	DA19_23_Vitis_Gen19_2	männlich/ <i>V. sylvestris</i>	=	46	DA19_24_Vitis_Gen19_2	männlich/ <i>V. sylvestris</i>
94	DA19_68_Vitis_Gen19_6	männlich/ <i>V. sylvestris</i>	=	97	DA19_70_Vitis_Gen19_6	männlich/ <i>V. sylvestris</i>
9	DA19_108_Vitis_Gen19_8	weiblich/Unterlage	=	82	DA19_57_Vitis_Gen19_4	weiblich/Unterlage

### Identifikation von Duplikaten

Besonders ältere Wildrebenexemplare weisen ein weit verzweigtes Lianengeflecht auf und es ist nicht immer feststellbar, ob es sich dabei um ein oder mehrere Individuen handelt. Die Cervus Software ermittelte sechs identische Paare (Tab. 3).

Fünf Paare gehörten *V. sylvestris* an. Der Einfachheit halber werden im Folgenden die Labornummern genannt. Die Labor-Nummern 184 und 191 sind sozusagen Wiederholungen und stellen keine Duplikate im Wildreben-Habitat dar. Diese Blätter wurden als Referenzen für echte *V. sylvestris*-Pflan-

zen mitgeliefert. Sie waren identisch mit jeweils der Labor-Nr. 133 aus dem „WWF Auenreservat Marchegg – March-Thaya-Auen“ und der Labor-Nr. 36 aus den „Donau Auen“. Auf Grund der genetischen Enge der *V. sylvestris*-Populationen reichen neun SSR-Marker nicht immer aus um Genotypen zu differenzieren. Hier jedoch ist die Lage eindeutig. Da es sich bei den Labor-Nummern 40/41 und 45/46 um aufeinanderfolgende Nummern, bei 94/97 um dicht beieinanderstehende Pflanzen handelt, dürfte es sich an diesen drei Standorten tatsächlich nur um einen Genotyp handeln. Nach Auskunft von Herrn GRIESBACHER



Abb. 4: Quer durcheinanderliegende Stämme zwischen Kleinem Springkraut (*Impatiens parviflora*) auf Auenboden (Foto: Aron GRIESBACHER).

stehen die Unterlagen-Duplikate mit den Labor-Nummern 9 und 82, die Trauben-tragend sind und *Vitis riparia*- und *Vitis rupestris*-Erbgut besitzen, nahe am Donauufer entlang von Forststraßen und könnten gepflanzt worden sein.

### Ausblick

In vielen westeuropäischen Ländern sind ganze *V. sylvestris*-Populationen verschwunden oder die Anzahl der Individuen in den Habitaten stark geschrumpft. Aus dieser Sicht gehören der vom Nationalpark Donau Auen betreute Donau-Auen-Wildreben-Bestand (129 Proben) und der vom WWF Naturreservat Mar-

chegg betreute Wildreben-Bestand (40 Proben) der Marchauen zu den größeren in Europa.

Allerdings ist die Ursprünglichkeit der *V. sylvestris*-Populationen mit der Bestäubung der Wildreben durch europäische Kulturreben und Amerikanerreben bedroht.

Dies war auch hier der Fall. Fünfzehn der untersuchten Individuen enthielten Erbgut von Amerikanerreben und eine Rebe war durch Kreuzung von *V. sylvestris* mit NEUBURGER entstanden. Diese „Eindringlinge“ sind unbedingt zu roden. Da der Wurzelstock gerne wieder austreibt muss in den Folgejahren der Erfolg der Rodung kontrolliert werden.