

Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Untersuchung alter Apfelsorten (*Malus domestica* (BORKH.)) in der Steiermark und Teilen Sloweniens

STEPHAN MONSCHHEIN¹, MARTIN GRUBE², KARIN HERBINGER¹, MELANIE HOFER³; HERBERT KEPPEL⁴ und DIETER GRILL¹

¹ Institut für Pflanzenwissenschaften
A-8010 Graz, Schubertstraße 51
E-mail: Stephan.Monschein@stud.uni-graz.at

³ Land- und forstwirtschaftliches Versuchszentrum Laimburg
I-39040 Post Auer

² Institut für Pflanzenwissenschaften
A-8010 Graz, Holteigasse 6

⁴ Landwirtschaftliches Versuchszentrum Steiermark
Versuchsstation für Obst- und Weinbau Haidegg
A-8047 Graz, Ragnitzstraße 193

*Alte Apfelsorten (*Malus domestica* (BORKH.)) sind ein wesentlicher Bestandteil der Kulturlandschaft „Streuobstwiese“ in der Steiermark und in Teilen Sloweniens. Diese Sorten sind durch unterschiedliche natürliche und anthropogene Gefahren vom Aussterben bedroht. Es ist daher notwendig, deren genetische Diversität zu erkennen, um dem Verlust genetischer Ressourcen gezielt entgegenwirken zu können. Da bei der pomologischen Beschreibung sowie Identifikation alter Apfelsorten Mehrdeutigkeiten auftreten können, wurden diese Sorten auch genetisch charakterisiert. Zu diesem Zwecke wurde von uns mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode die genetische Diversität der Streuobstbestände hinsichtlich ihrer Apfelsortenzusammensetzung erhoben. Insgesamt wurden 480 Proben untersucht. Dabei konnten 190 Sorten bzw. Typen unterschieden werden. Es hat sich herausgestellt, dass die Verwendung von drei Mikrosatellitenloci für ein breites Screening der genetischen Diversität alter Apfelsorten im Untersuchungsgebiet ausreichend war.*

Schlagwörter: Apfel, Mikrosatelliten, Genetische Diversität, Streuobst

*Microsatellite analysis as a screening method for native apple cultivars (*Malus domestica* (BORKH.)) in Styria and parts of Slovenia. Native apple cultivars (*Malus domestica* (BORKH.)) play an important role in traditionally managed orchards in Styria and parts of Slovenia. These varieties are endangered by several natural and anthropogenic influences. Therefore it is essential to detect the genetic diversity of these cultivars to prevent the loss of genetic resources. The traditional description and identification of apple varieties by pomological parameters may cause ambiguous results, hence the cultivars were characterised genetically. Thus the genetic diversity of native apple varieties was investigated by microsatellite analysis. A total number of 480 apple trees was tested, and 190 varieties could be differentiated. The use of three microsatellite loci proved to be sufficient in a general screening of genetic diversity of native apple cultivars in the investigated area.*

Key words: apple, microsatellite, genetic diversity, native apple cultivars

*Examen des variétés anciennes de pommes (*Malus domestica* (BORKH.)) par analyse microsatellite en Styrie et dans quelques régions de la Slovénie. Les variétés anciennes de pommes (*Malus domestica* (BORKH.)) sont un élément important du paysage transformé par la culture extensive d'arbres fruitiers en Styrie et dans quelques régions de la Slovénie. Ces variétés sont menacées de disparition en raison de différents dangers naturels et causés par l'homme. Il est donc nécessaire de connaître leur diversité génétique afin de pouvoir prendre les mesures ciblées permettant d'éviter la perte de ressources génétiques. Étant donné que des ambiguïtés peuvent apparaître lors de la description pomologique et de l'identification des variétés anciennes de pommes, ces variétés sont également caractérisées génétiquement. à cette fin, nous avons relevé la diversité génétique des peuplements de pommiers à l'aide de la méthode des*

microsatellites en vue de déterminer la composition des variétés de pommes. Un total de 480 échantillons a été examiné. On a pu y distinguer 190 variétés et/ou types. L'utilisation de trois loci microsatellites s'est avérée suffisante pour un screening approfondi de la diversité génétique des variétés anciennes de pommes dans les régions examinées.
Mots clés : pomme, analyse par microsatellites, diversité génétique, culture extensive d'arbres fruitiers

Streuobstwiesen mit ihren hochstämmigen und großkronigen Kernobstbäumen gehören zum prägenden Bild der Kulturlandschaft in der Steiermark und Teilen Sloweniens. Durch unterschiedliche Rationalisierungsmaßnahmen in der Landwirtschaft wie auch durch die Einschleppung und Verbreitung verschiedenster Krankheiten (z. B. Feuerbrand, *Erwinia amylovora*) sind diese Streuobstbestände bzw. die diese Bestände zusammensetzenden Kernobstsorten vom Aussterben bedroht (ÖSTAT, 2001). Zusätzlich kommt es zu einer immer stärker werdenden Vereinheitlichung und Einschränkung des Sortenspektrums (KEPPEL et al., 2002).

Um einer Verarmung an genetischen Ressourcen entgegenzuwirken, ist es notwendig, umfangreiche Erhebungen und Bestimmungen der Streuobstbestände durchzuführen. Nur durch den Erhalt der Sorten kann verhindert werden, dass noch nicht ausreichend untersuchte Eigenschaften verloren gehen. Für die Erhaltung und eventuelle Förderung von Streuobstsorten ist daher eine Auspflanzung und Konservierung *ex situ* in Genbanken unbedingt erforderlich (KEPPEL et al., 2001). Dafür ist aber eine genaue Beschreibung und Bestimmung dieser Sorten notwendig, um effizient genetische Ressourcen zu erhalten und den Betrieb solcher Genbanken möglichst kostengünstig zu gestalten.

Bisher erfolgte die Sortenbeschreibung aufgrund unterschiedlichster morphologischer Parameter (z.B. Fruchtgröße und Ausfärbung, Kerngehäuse, Fruchtfleisch usw.), physiologischer Charakteristika (z.B. Zuckersäure-Gehalte der Früchte), unterschiedlichen Verhaltens gegenüber Pathogenbefall und biochemischer Variabilität (z.B. Isoenzymmuster) (HODGKIN et al., 2001). Trotz dieser Fülle an Bewertungskriterien kommt es bei der Bestimmung und Charakterisierung seltener und unbekannter Sorten oft zu erheblichen Problemen. Die Gründe hierfür liegen in der großen Veränderlichkeit der Sorten hinsichtlich ihrer pomologischen Bestimmungsmerkmale aufgrund des Einflusses äußerer biotischer und abiotischer Faktoren (phänotypische Varianz). Zusätzlich stellt auch die genotypische Varianz eine große Herausforderung dar, da zwischen Zufallssämlingen, Klonen, Populationssorten und Sprossmutationen zu unterscheiden ist (GABER, 1994) und eindeutige Sortengrenzen oft nicht zu ziehen sind. Sprossmutationen, Zufallssämlinge und Klone werden

in Folge nach SILBEREISEN et al. (1996) zum Sammelbegriff 'Typ' zusammengefasst. Die Bestimmungsliteratur (z.B. JAHN et al., 1865; LÖSCHNIG, 1946; SILBEREISEN et al., 1996) ist teilweise sehr alt und das Aussehen der Früchte unterliegt auf Grund wechselnder Umweltbedingungen unterschiedlichsten Veränderungen (BERNKOPF et al., 1996; KEPPEL, 1989). Um eine verlässliche und von äußeren Faktoren weitgehend unabhängige Identifizierung und Charakterisierung unterschiedlicher Sorten zu gewährleisten, werden genetische Analysemethoden eingesetzt, mit denen das Genom eines Organismus unter Verwendung geeigneter und aussagekräftiger molekularer Marker untersucht wird. Diese Methoden haben sich als sehr hilfreich erwiesen, um Annahmen über das Ausmaß der genetischen Diversität zu treffen und um deren Beziehung zu geographischen (HODGKIN et al., 2001) und ökologisch-physiologischen Parametern darzustellen. Für die genetische Analyse der alten Apfelsorten wurde in dieser Arbeit die Mikrosatellitenanalyse angewandt.

Mikrosatelliten (simple sequence repeats oder SSRs) sind kurze Bereiche der DNA, die aus einer sich wiederholenden Einheit eines Nukleinsäureabschnittes bestehen.

Wegen der unterschiedlichen Anzahl dieser Wiederholungen in nah verwandten Organismen stellen sie interessante polymorphe molekulare Marker für intraspezifische Untersuchungen dar. Unterschiede in der Anzahl der repeats und daher in der Länge der SSRs lassen sich durch deren elektrophoretische Auftrennung feststellen. SSR-Marker haben verschiedene Vorteile gegenüber anderen molekularen Markern. Sie sind in großer Zahl über das gesamte Genom verteilt, sie sind hypervariabel und codominant und stellen daher einen sehr hohen Informationsgehalt zur genetischen Charakterisierung unterschiedlicher Sorten dar. Die Selbstunfruchtbarkeit von Äpfeln und der daraus resultierende hohe Heterozygotiegrad bedingen die Verwendung solcher informativer Marker (LIEBHARD et al., 2002), wobei auch die Automatisierbarkeit dieser genetischen Analysemethoden hervorzuheben ist.

In dieser Arbeit wird dargestellt, inwieweit diese Methode zur Feststellung der genetischen Zusammensetzung der Streuobstgärten der Steiermark und in Teilen Sloweniens bezüglich verschiedener Apfelsorten geeig-

net ist bzw. wie viele genetische Marker nötig sind, um einen Überblick über die genetische Diversität dieser Kulturlandschaften zu erlangen.

Für die Untersuchungen der genetischen Diversität der Streuobstwiesen in der Steiermark und Teilen Sloweniens war zunächst eine Erhebung der diese Bestände zusammensetzenden Apfelsorten (*Malus domestica* (Borkb.)) notwendig. Dies erfolgte mittels standardisierter Fragebögen, die von Herrn Ing. HERIGAR STROH-HÄUSL (Landwirtschaftliche Fachschule in Kobenz, A-8720 Knittelfeld) zusammengestellt und von unserer Arbeitsgruppe modifiziert und erweitert wurden. Diese Fragebögen wurden an steirischen Volks-, Haupt- und Landwirtschaftlichen Fachschulen mehrmals verteilt, um so eine breite Streuung der primären Erhebung der Sorten im Untersuchungsgebiet zu erhalten. Aus diesen erhobenen Daten wurden schließlich jene landwirtschaftlichen Betriebe ausgewählt, deren Apfelsorten einer genetischen Untersuchung unterzogen werden sollten. Die Auswahlkriterien für die zur genauen Analyse bestimmten Sorten waren unbekannte bzw. ungewöhnliche Namensgebungen, alte Bäume (80 bis 100 Jahre), solche mit besonderem Verwendungszweck, Varietäten, die noch nicht in der Steirischen Genbank archiviert wurden, und Bäume mit einer Verbreitung bis in große Seehöhen (KEPPEL et al., 2002).

Von diesen ausgesuchten Bäumen wurden junge Blätter geerntet, da diese mehr Zellen pro Gewichtseinheit enthalten und deshalb eine höhere DNA-Ausbeute und bessere DNA-Qualität zu erwarten ist. Außerdem enthalten junge Blätter weniger Polysaccharide und Polyphenole und sind deshalb leichter zu bearbeiten. Die jungen Blätter wurden von den Zweigen geschnitten, in Pergaminsäckchen gefüllt und vor Ort in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren. Anschließend wurden die Proben vier Tage gefriergetrocknet und danach bei -25 °C eingefroren. Die trockenen Blätter wurden schließlich zu einem feinen Blattpulver vermahlen. Aus diesem Blattpulver wurde die genomische DNA mit Hilfe des Dneasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Wien) isoliert, gereinigt und schließlich, gelöst im Elutionspuffer, eingefroren.

Amplifikation der Mikrosatelliten mittels PCR

Mit Hilfe der PCR (Polymerasekettenreaktion) ist es möglich, aus der gesamten isolierten genomischen DNA jene Bereiche, die von Interesse sind, mit Hilfe von spezifischen Primerpaaren (Oligonukleotiden) und

einer DNA-Polymerase in großer Zahl zu vervielfältigen (WEBER und MAY, 1989). Für die genetische Charakterisierung der alten Apfelsorten wurden drei verschiedene Primerkombinationen (forward und reverse primer) verwendet, welche von GIANFRANCESCHI et al. (1998) publiziert wurden: CH01F02, CH02C06 und CH02D12. Der jeweilige forward primer dieser Kombinationen wurde am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (FAM, NED, HEX). Die PCR-Amplifikationen wurden in einem 15 µl Ansatz durchgeführt, dessen genaue Zusammensetzung in GIANFRANCESCHI et al. (1998) beschrieben ist. Alle Amplifikationsschritte erfolgten in einem GeneAmp[®] PCR-System 2700 (Applied Biosystems, Wien) Thermocycler unter folgenden Bedingungen: Initial-Denaturierung bei 95 °C für 5 min; darauf folgten 35 Zyklen mit folgenden Denaturierungs-, Annealing- und Extensionstemperaturen und -zeiten: 94 °C für 30 sec, 60 °C für 30 sec. und 72 °C für 30 sec. Schließlich wurde ein letzter Extensionsschritt mit einer Temperatur von 72 °C für 5 min durchgeführt.

Analyse der Mikrosatellitenlängen

Nach der Amplifikation der Mikrosatelliten wurden mit Hilfe des ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Mikrosatelliten erfolgte über ihre Fluoreszenzfarbstoffmarkierung mit Hilfe eines Lasers. Durch Anregung der farbstoffmarkierten Fragmente senden diese Fluoreszenzlicht aus, welches nach Fokussierung auf einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten und auf den Chip einer CCD (Charged Coupled Device)-Kamera verteilt wird (GENESCAN, 2000). Die CCD-Kamera ermöglicht eine simultane Detektion verschiedener Farbstoffe. So können gleichzeitig mehrere unterschiedlich farbstoffmarkierte DNA-Fragmente untersucht werden. Das Ergebnis wird in Form von Elektropherogrammen dargestellt. Die Längenbestimmung der Fragmente erfolgte über einen ebenfalls fluoreszenzfarbstoffmarkierten Größenstandard (Genescan 500 ROX - Applied Biosystems, Wien). Dieser enthält Fragmente unterschiedlicher genau definierter Längen, er wird jeder Probe beigefügt, elektrophoretisch mit ihr aufgetrennt und dient als Standard zur Berechnung der Mikrosatellitenlängen. Die daraus resultierenden Allelen, Mikrosatelliten unterschiedlicher Länge, dienen der Charakterisierung und Identifizierung der alten Apfelsorten.

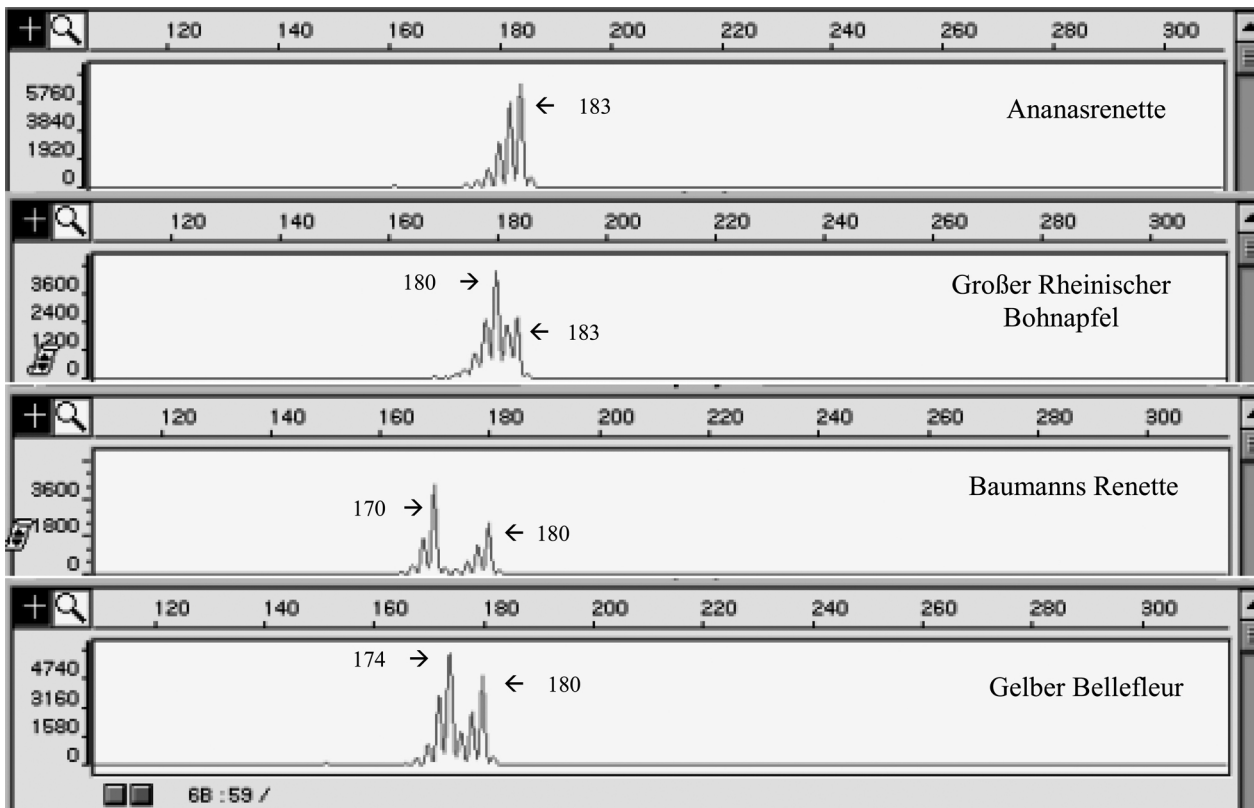


Abb. 1: Elektropherogramme des Markers CH01F02 bei vier Apfelsorten

Ergebnisse und Diskussion

Elektropherogramme

Aus den gesamten Erhebungen der Streuobstwiesen in der Steiermark und Teilen Sloweniens wurden 480 Apfelbäume nach bereits erwähnten Kriterien ausgewählt und mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse untersucht. Die Elektropherogramme stellen die Rohdaten nach der spezifischen Vervielfältigung der SSR mittels PCR und deren Farbstoffmarkierung dar. Die Abbildung 1 zeigt solche Elektropherogramme von vier verschiedenen Apfelsorten, die mit einem SSR-Marker (CH01F02) untersucht wurden. SSR-Allele lassen sich von PCR-Artefakten durch das Vorhandensein von sog. Stotter-Peaks unterscheiden. Die jeweiligen Zahlenwerte geben die Allellängen des Markers in Basenpaaren (bp) an. Diese Werte stellen die Basis für weitere Auswertungen der Proben hinsichtlich ihrer Sortenechtheit dar (Abb. 1).

Charakterisierung der Sorten/Typen durch deren Allellängen

Mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse ist es möglich, die jeweils untersuchten Sorten anhand ihrer Allellängen an den verwendeten SSR-Loci zu charakterisieren. Jede untersuchte Sorte bzw. Probe zeichnet sich durch eine spezifische Allelkomposition aus, die als genetisches Charakteristikum zur Sortendifferenzierung herangezogen wird. Bei der genetischen Analyse von 480 Proben, die homogen verteilt aus dem gesamten Untersuchungsgebiet stammen, konnten unter Verwendung dreier Mikrosatellitenloci 190 verschiedene Sorten bzw. Typen voneinander abgegrenzt werden. Bis auf wenige Ausnahmen waren die drei Mikrosatelliten für ein erstes großes Screening der Sortenzusammensetzung der Streuobstwiesen im Untersuchungsgebiet ausreichend. In der Tabelle 1 sind einige Sorten bzw. Typen und lokale Sortenbezeichnungen mit ihren charakteristischen Allelzusammensetzungen angeführt. Die Art der Allelkomposition (Tab. 1) der jeweiligen SSR bei den verschiedenen Sorten lässt sich nach LIEB-

HARD et al. (2002) und GIANFRANCESCO et al. (1998) wie folgt beschreiben: Fehlt ein Allel eines SSR-Locus, so kann das fehlende Allel entweder die gleiche Länge aufweisen und so nicht vom anderen getrennt dargestellt werden, es handelt sich hierbei um ein in diesem Merkmal homozygotes Individuum oder es kann sich um ein sogenanntes Null-Allel handeln, das dann vorliegt, wenn Mutationen in den flankierenden Regionen die Bindung der Primer stört und es so zu keiner Amplifikation kommt. In diesem Fall handelt es sich um ein in diesem Merkmal heterozygotes Individuum, dessen zweites Allel an diesem Locus nicht nachweisbar ist. Ein Beispiel für ein fehlendes Allel zeigt der 'Rote Herbstkalvill' im Marker CH01F02. Werden pro Locus zwei Allele ausgewiesen, kann es sich um ein diploid heterozygotes Individuum handeln (z. B. Marker CH02D12 beim 'Roten Herbstkalvill'). Drei Allele lassen das Vorkommen von zwei verschiedenen Loci vermuten (sog. Multilocus-SSR), welche vom gleichen Primerpaar amplifiziert werden, oder es besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine triploid heterozygote Sorte handelt (z.B. Marker CH01F02 bei 'Haslinger'). Außerdem kann eine Chimäre auf diesem Genort vorliegen, die aber nicht unbedingt stabil sein muss.

Identifikation unbekannter bzw. pomologisch nicht bestimmter Sorten

Die allelische Zusammensetzung in den Mikrosatelliten der untersuchten Proben bildet die Grundlage für deren Zuordnung zu pomologischen Sortenbezeichnungen. Die Identifikation und Bestimmung alter Apfelsorten basiert auf dem Vergleich der genetischen Merkmalskomposition von unbekanntem Nennungen mit der von als sicher definierten Sorten (Referenzsorten). Die Festlegung solcher Referenzsorten ist hingegen mit gewissem Aufwand verbunden. Eine solche Definition kann nur in Abstimmung der genetischen Daten (Ergebnisse der Mikrosatellitenuntersuchungen) mit pomologischen Parametern (z.B. Fruchtgröße, Deckfarbe, Berostung) und durch Untersuchung einer großen Anzahl gleicher Sorten unterschiedlicher geographischer Herkunft erfolgen. Eines der Ziele unserer Arbeit ist daher die Erstellung einer Datenbank mit klar festgelegten Referenzsorten. Relativ leicht funktioniert dies

Tabelle 1:

Allelische Zusammensetzung (bp) ausgewählter Apfelsorten

Sorten	SSR Locus		
	CH01F02	CH02C06	CH02D12
Kronprinz Rudolf	170:183	241:249	177:198
Roter Herbstkalvill	174	249	183:198
Haslinger	170:180:183	249	177:183:190
Steir. Pogatschenapfel	170:180:183	249	177:183:190
Steir. Maschanzker	170:182	249	198:206
Eisapfel	170:182	249	198:206
Roter Stettiner	170:180:187	227:241	183:198
Zwiefler	170:180:187	227:241	183:198
Weißer Klarapfel	182:187	215:249	179:198
Butterapfel	182:187	215:249	179:198
Harberts Renette	183:185	241:249	181:198
Goldrenette	183:185	241:249	181:198
Goldrenette v. Blenheim	183	241:249:257	198
Welschbrunner	170:180	249	181:198
Gr. Böhm. Brünnerling	170:180	249	181:198
Schöner von Boskoop	183	227:237	181:194
Roter Boskoop	183	227:237	181:194
Wildböhrmer	170	229:231	183:206
Kalterer Böhrmer	170	229:231	183:206

mit Sorten, die spezielle pomologische Kennzeichen aufweisen, wie z.B. der 'Rote Herbstkalvill' (rot marmoriertes Fruchtfleisch unter der Schale, kantiges Fruchtreilief), oder mit solchen, die noch über große Gebiete verbreitet vorkommen und so einen hohen Bekanntheitsgrad aufweisen.

Schwieriger ist die Festlegung für Sorten, die eine große Anzahl von gebräuchlichen Synonymen aufweisen, wie z. B. 'Steirischer (eigentlich Roter) Pogatschenapfel' für 'Haslinger' oder 'Eisapfel' für den 'Steirischen Maschanzker'. Eine Herausforderung für die pomologische Sortenzuweisung ist das Vorkommen lokaler Bezeichnungen, etwa 'Zwiefler' für den 'Roten Stettiner' und 'Butterapfel' für den 'Weißen Klarapfel'. Die synonyme Bezeichnung 'Goldrenette' stellt ein besonderes Beispiel für irreführende Namensgebungen dar, sie bezeichnet nicht, wie vielleicht vorschnell angenommen, die 'Goldrenette von Blenheim', sondern die 'Harberts Renette' (HARTMANN, 2000). Nach der Analyse dreier Mikrosatellitenloci wurden auch der 'Welschbrunner' und der 'Große Böhmische Brünnerling' als ein und dieselbe Sorte ausgewiesen. Das wurde bereits von SILBEREISEN et al. (1996), der den 'Welschbrunner', den 'Großen Böhmischen Brünnerling' und den 'Welschbrunner' miteinander in Beziehung bringt, vermutet. Interessant ist auch das Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse des 'Roten Boskoops' und des 'Schönen von Boskoop', welche nach diesen genetischen Gesichtspunkten das gleiche Ergebnis lieferten. Laut BERNKOPF et al. (1996)

ist der 'Rote Boskoop' aus einer Sprossmutation des 'Schönen von Boskoop' entstanden. In diesem Fall ist die Anwendung weiterer aussagekräftiger Mikrosatelliten notwendig, um eingehender zu überprüfen, ob diese beiden Sorten tatsächlich als eigenständige Sorten einzustufen sind. Die Sorten 'Wildböhrer' und 'Kalterer Böhrer' zeigen eine gleiche genetische Merkmalausprägung in den untersuchten Loci, wie auch bei den Brünnerlingen sind zusätzliche Marker zur Sortenabklärung (KICKENWEIZ und REGNER, 2002) anzuwenden (siehe auch Tab. 1). Diese Ergebnisse, die hier für wenige Sorten/Typen beispielhaft dargestellt wurden, zeigen, dass nur durch eine systematische Abgleichung der genetischen mit den pomologischen Parametern und Untersuchungsergebnissen das Ziel einer verlässlichen Referenzsortendatenbank erreicht werden und mit deren Hilfe schließlich relativ schnell eine gesicherte Überprüfung von Sortenechtheit und Sortendiversität alter Apfelsorten erfolgen kann.

Schlussfolgerungen

Es hat sich herausgestellt, dass die Mikrosatellitenanalyse alter Apfelsorten eine geeignete Methode ist, um einen Überblick über die Zusammensetzung der Streuobstbestände in der Steiermark und in Teilen Sloweniens zu erhalten. Einerseits konnten lokale Namensgebungen durch echte Sortenbezeichnungen ersetzt werden, andererseits wurde für verschiedene Sorten eine Fülle von Synonymen festgestellt. Mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse wurden bei 480 Apfelbäumen in den Untersuchungsgebieten 190 Sorten bzw. Typen unterschieden. Die pomologische Identifizierung dieser Sorten stellte sich oftmals als äußerst anspruchsvoll dar, zudem mussten auch Mängel in der Bestimmungsliteratur festgestellt werden (Qualität der Abbildungen, Richtigkeit der Sortenbezeichnung). Referenzsorten aus Genbanken und Erhaltungsanlagen stellten sich nicht immer als verlässlich heraus, auch hier wurden einige synonyme und lokale Sortenbezeichnungen identifiziert. All dies zeigt die Notwendigkeit einer genetischen Untersuchung und Charakterisierung von Apfelsorten. Mit den vorliegenden Allellängen der 190 Sorten bzw. Typen, die mittels SSR-Analyse unterschieden wurden, kann nun eine Zuordnung unbekannter oder pomologisch nicht bestimmter Sorten durch Vergleich der Allelzusammensetzung erfolgen, auch wenn diese aufgrund verschiedenster biotischer und abiotischer Einflüsse Ausprägungen zeigen, die nicht sortentypisch

sind. Die genetische Zuweisung solcher unbekannter Proben zu bestimmten Sorten kann nur dann erfolgen, wenn möglichst viele Sorten in einer Datenbank erfasst wurden und deren Sortenechtheit durch den Vergleich der Mikrosatellitendaten mit pomologischen Parametern, wie bereits dargestellt, abgesichert wurde. Das Ziel der Erfassung der genetischen Diversität in den Streuobstbeständen ist es also, eine Referenzsortendatenbank in großem Umfang zu erstellen, diese Sorten aufzusammeln, zu veredeln und in einer Genbank zu kultivieren (KEPPEL et al., 2001). Dies setzt Zusammenarbeit und Datenaustausch zwischen verschiedenen Labors voraus, was einen Abgleich der verwendeten Methoden zur Mikrosatellitenanalyse sowie der gewonnenen Allellängen ermöglicht. In diesem Sinne werden die Allele der untersuchten Sorten in einen relativen Bezug zu einer bekannten Apfelsorte gestellt. Ein diesbezüglicher Ansatz wurde bereits von REGNER (2002) für die genetische Analyse bei Reben entwickelt. Mit dem Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrum in Laimburg (Italien) werden zur Zeit bereits Vorbereitungen bezüglich eines solchen Datenaustauschs getroffen.

Danksagung

Diese Arbeit erfolgte im Zuge zweier Projekte, die durch ein INTERREG IIIA Programm und eine Bund-Bundesländerkooperation finanziert wurden.

Literatur

- BERNKOPF, S., KEPPEL, H. und NOVAK, R. (1996): Neue Alte Obstsorten. 4. Aufl. - Wien: Agrarverlag, 1996
- GABER, R. (1994): Obstsortenerhaltung. Grüne Reihe des Bundesministeriums für Umwelt. Bd. 7. - Graz: austria medien service, 1995
- Genescan (2000): Genescan[®] Reference Guide Chemistry Reference for the ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer. Applied Biosystems
- GIANFRANCESCHI, L., SEGLIAS, N., Tarchini, R., KOMJANC, M. and GESSLER, C. 1998: Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076
- HARTMANN, W. (2000): Farbatlas Alte Obstsorten. - Stuttgart: Ulmer, 2000
- HODGKIN, T., ROVIGLIONI, R., DE VICENTE, M.C. and DUDNIK, N. 2001: Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Horticulturae* (546): 107-118
- JAHN, F., LUCAS, E. und OBERDIECK, J.G.H. (1865): Illustriertes Handbuch der Obstkunde, Vol. 4: Äpfel. - Ravensburg: Dorn, 1865

- KEPPEL, H. 1989: Pomologische Beschreibung alter Mostapfelsorten aus der Steiermark. Mitt. Klosterneuburg 39: 13-20
- KEPPEL, H., HOFER, M., TAUSZ, M. und GRILL, D. 2001: Eine Genbank für Kernobstsorten in der Steiermark und eine Analyse ihrer Apfelsorten (*Malus domestica*, Rosaceae-Maloideae). Mitt. Naturwiss. Ver. Steiermark 131: 129-139
- KEPPEL, H., FUSSI, B., HOFER, M. und GRILL, D. 2002: Alte Kernobstsorten im Bezirk Murau. Mitt. Naturwiss. Ver. Steiermark 132: 139-148
- KICKENWEIZ, M. und REGNER, F. 2002: Genetische Analyse der Apfelsorte 'Brünnerling'. Mitt. Klosterneuburg 52(1/2): 39 - 44
- LIEBHARD, R., GIANFRANCESCO, L., KOLLER, B., RYDER, C.D., TARCHINI, R., VAN DE WEG, E. and GESSLER, C. 2002: Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). Molecular Breeding 10: 217-241
- LOSCHNIG, J. (1946): Praktische Anleitung zum rationellen Betriebe des Obstbaues, 7. Aufl. - Wien und Leipzig: Hartleben, 1946
- ÖSTAT (2001): Österreichisches Statistisches Jahrbuch 2001. - Wien: Statistisches Zentralamt, 2001
- REGNER, F. (2002): Sortensicherheit bei Obst und Wein mittels genetischer Analysen. Bericht Jahrestagung ALVA 2002: 215-217
- SILBEREISEN, R., GÖTZ, G. und HARTMANN, W. (1996): Obstsorten-Atlas. 2. Aufl. - Stuttgart: Ulmer, 1996
- WEBER, J.L. and MAY, P.E. 1989: Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44: 388-396

Manuskript eingelangt am 9. April 2004