

## Vorwort

Diese Arbeit entstand im Rahmen zweier „Kernobst-Projekte“, die am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführt wurden: „Genetische Charakterisierung alter Kernobstsorten in der südlichen Steiermark und angrenzenden Gebieten (Interreg III A)“, und „Bestimmung, Beschreibung und Kartierung alter Kernobstsorten in der nördlichen Steiermark einschließlich Untersuchungen der Variabilität von Fruchthaltsstoffen (Bund-Bundesländer-Kooperation)“.

Um sich der Thematik der Beurteilung der gegenwärtigen Diversität alter Apfel- und Birnensorten (*Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L.) im Untersuchungsgebiet entsprechend annähern zu können, bedarf es der Auseinandersetzung mit der ökologischen und kulturgeschichtlichen Bedeutung der Streuobstwiese. Die Anwendung und kritische Beurteilung pomologischer und genetischer Sortencharakterisierungsmethoden bilden den analytischen Hintergrund dieser Diversitätsstudie.

In der „Einleitung“ dieser Dissertation wird diesen Anforderungen wie folgt Rechnung getragen; so wird die „Ökologie der Streuobstwiese und alter Kernobstsorten“ beleuchtet, die „Geschichtliche Entwicklung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten“ stellt die dynamische, natur- und kulturgeschichtlich bedingte Entwicklung der Diversität lokaler Varietäten im Untersuchungsgebiet in den Vordergrund, schließlich werden die Herausforderungen an die „Beurteilung der gegenwärtigen Sortenvielfalt“ und die in diesem Projekt angewandte genetische Methode zur Sortendifferenzierung, die „Mikrosatellitenanalyse“ vorgestellt.

Die konkrete Frage- bzw. Aufgabenstellung dieser Arbeit bildet den Abschluss der Einleitung. Das Kapitel „Material und Methode“ befasst sich eingehend mit der analytischen Durchführung der Mikrosatellitenmethode.

Die Darstellung der „Ergebnisse“ der genetischen Sortencharakterisierung und deren „Diskussion“ reflektieren die Resultate der Mikrosatellitenanalyse hinsichtlich der Feststellung der Diversität alter Kernobstsorten.

Die Vorstellung verschiedener Projekte, welche auf Basis dieser Forschungsarbeiten realisiert wurden, bildet den Abschluss dieser Doktorarbeit.

## **1. Einleitung**

Um die Notwendigkeit der Feststellung der gegenwärtigen Diversität alter Kernobstsorten zu unterstreichen, wird einleitend die „Ökologie der Streuobstwiese und alter Kernobstsorten“ und die „Geschichtliche Entwicklung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten“ im Allgemeinen und im Besonderen für das Untersuchungsgebiet dargestellt. Die „Beurteilung der gegenwärtigen Sortenvielfalt“ mit Hilfe klassisch pomologischer Methoden sowie die daraus resultierende Erfordernis einer genetischen Sortendifferenzierung werden im anschließenden Kapitel beleuchtet. Die konkrete „Frage- und Aufgabenstellung“ an den Verfasser dieser Dissertation bildet den Abschluss der Einleitung.

## 1.1 Ökologie der Streuobstwiese und alter Kernobstsorten

Streuobstwiesen mit ihren hochstämmigen und großkronigen Kernobstbäumen gehören zum prägenden Bild der Kulturlandschaft in der Steiermark und Teilen Sloweniens (KEPPEL et al. 2002).

Um den Begriff der Streuobstwiese bzw. des Streuobstes zu konkretisieren finden sich unterschiedliche Definitionen, wie etwa die folgenden:

- *Streuobst/Streuobstbau* ist die „Traditionelle Pflanzung von Hochstamm-Obstbäumen unter extensiver Bewirtschaftung“ (LOTT 1993), oder
- *Streuobstwiese* ist die „Extensiv genutzte Kombination von Hochstamm-Obstbäumen und Grünland (RÖSLER 1992).

Die Charakteristika einer Streuobstwiese liegen in der Verwendung von Hochstammbäumen mit einem Kronenansatz von ca. 1,8 m, in einer bunten Arten- und Sortenmischung mit ihren spezifischen Wuchsformen und -größen, in der Erkennbarkeit eines jeden Baumes als Einzelindividuum und in der Struktur der Streuobstwiese aufgrund geomorphologischer Gegebenheiten und nicht streng struktureller Vorgaben. Die Umtriebszeit von Hochstämmen ist im Vergleich zu niederstämmigen Obstanlagen wesentlich höher. Pflege und Schnittmaßnahmen sind im Vergleich zu Intensivobstanlagen minimal, sie erfolgen nur fallweise und nicht regelmäßig. Der Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden ist im Normalfall geringfügig. Die Verteilung der Obstbäume im Streuobstbau kann neben einer klassischen Flächenstruktur (z. B. Obstbaumgärten in Dörfern) auch eine Gruppen- (z. B. Gruppen auf Böschungen), Linien- (z. B. Obstbaumalleen entlang von Straßen und Wegen) oder Einzelstruktur (z. B. Solidärbäume in Höfen oder an markanten Stellen wie z. B. Marterln) einnehmen (ERLACH 1994).

Die ökologische Bedeutung der Streuobstwiese stellt sich als kleinklimatische Pufferzone, als Rückzugsgebiet (Ersatzbiotop) und Lebensraum für viele seltene und gefährdete Tier- und Pflanzenarten und daher nicht zuletzt auch als Genreservoir, nicht nur für verschiedene Kernobstsorten, sondern auch für die heimische Fauna und Flora dar. Je nach Mäßigkeit des Einsatzes von Pestiziden und Düngemitteln (in Streuobstwiesen vor allem Jauche und Stallmist) lässt sich eine Vielzahl von auf intensiv bewirtschafteten Flächen nicht vorkommenden Pflanzenarten finden, wie z. B. *Orchis morio* L., *Dianthus carthusianorum* L.,

*Euphorbia cyparissias* L., *Bromus erectus* HUDS., *Festuca rupicola* HEUFF. Durch extensive Pflege der Flächen können Gräser und Kräuter aussamen (ein- bis zweimalige Mahd pro Jahr nach der Blüte bzw. Samenbildung in der Kraut- und Grasschichte), die Tierwelt bleibt weitgehend ungestört, zudem sorgen wechselnde Licht-, Feuchte- und Klimaverhältnisse im Baumbestand, in Baumhöhlen und –nischen unterschiedlich alter, zum Teil abgestorbener Bäume für eine Fülle an Kleinhabitaten (Abb. 1).

Die vielgestaltige, heterogene Struktur von Streuobstwiesen ermöglicht einer Reihe unterschiedlichster Vogelarten das Überleben; sie finden für sich optimale Nistbedingungen (z. B. Grünspecht [*Picus viridis* L.] bzw. Grünspechthöhlen für den Wiedhopf [*Upupa epops* L.]) vor, die Fülle unterschiedlichster Insektenarten aber auch das Fallobst selbst stellen eine breite und abwechslungsreiche Nahrungspalette dar. Als Beispiel sei hier der Wiedehopf erwähnt. Der bevorzugte Lebensraum dieser Vogelart in der Steiermark sind extensiv bewirtschaftete Streuobstwiesen. Diese Beobachtung wird auch durch die Übereinstimmung der Verbreitungskarten: „Gebiete mit potentiell Streuobstwiesenbau“ und „Potentielle Brutgebiete des Wiedehopfs“ in der Steiermark bestätigt. Die enge Bindung dieser Vogelart an die Kulturlandschaft Streuobstwiese führte, aufgrund des Rückganges dieser Bestände, zu einer starken Gefährdung der Wiedehopfpopulation in der Steiermark (SACKL & SAMWALD 1997, FAULAND et al. 2005).

Dieser naturnahe Lebensraum wird aber auch von verschiedensten Wildbienen und Hummelarten bevölkert, sie sorgen nicht nur zuletzt für eine ausreichende Bestäubung der Kernobstbestände selbst (MONSCHEIN 2006), sondern auch benachbarte Kulturen unterschiedlicher Nutzpflanzen profitieren so von dieser vermehrten Bestäubungsaktivität.

Die extensive Form der Bewirtschaftung von Streuobstwiesen und das dadurch bedingte natürliche Gleichgewicht von so genannten Schädlingen und Nützlingen führen nicht nur zu vermindertem oder völligem Ausbleiben von Pestizideinsätzen aufgrund fehlenden Bedarfs in diesen Beständen, sondern auch zu einer positiven Beeinflussung der Ökologie benachbarter, intensiv bewirtschafteter Agrarflächen.

Streuobstwiesen stehen häufig im Spannungsfeld – Siedlungsraum, intensiv genutzte Agrarflächen und naturnahe Ökosysteme – sie verbinden im so genannten Biotopverbund die verschiedensten Lebensräume, was gerade in Zeiten weitgehend ausgeräumter Kulturlandschaften immer bedeutender wird (Abb. 2) (ERLACH 1994, MONSCHEIN 2006).

Die Streuobstwiese als Lebensraum hat heute eine Nischenfunktion übernommen, deren Bedeutung angesichts der immer stärker um sich greifenden Intensivierung und Rationalisierung der Landwirtschaft und dem Wegfall naturnaher Ökosysteme wohl kaum in Frage zu stellen ist.

Neben der ökologischen Relevanz spielen die Streuobstwiesen auch als Schutzbepflanzungen landwirtschaftlich bzw. siedlungstechnisch genutzter Flächen eine große Rolle. Streuobstwiesen wurden und werden oft an schwierig zu bewirtschafteten Flächen gepflanzt, die sich aufgrund ihrer inhomogenen Geomorphologie bzw. extremen Hangneigungen für Ackerbau als nicht geeignet erweisen.

Hangsicherung, Schutz vor Erosion und Rutschungen sowie die Gewährleistung eines natürlichen Wasserrückhaltes stellen nur einige direkt positive Effekte für den Menschen bzw. für die von ihm genutzten Flächen durch Streuobstwiesen dar (Abb. 2) (OTTO et al. 2005).

Gerade in Zeiten zunehmender Häufigkeit extremer Wetterkapriolen sollten aber diese hier angeführten Effekte der Kulturlandschaft Streuobstwiese nicht vernachlässigt, sondern in eine ganzheitliche Kulturlandschaftsplanung miteinbezogen werden, um der Beeinträchtigung von Siedlungsgebieten und landwirtschaftlich genutzter Flächen durch Naturgewalten entgegenwirken und so meist beträchtliche finanzielle Einbußen vermeiden zu helfen.



Abb. 1: Lebensraum Streuobstbaum



Abb. 2: Streuobstwiese; Biotopverbund und Hangsicherung

Gegenwärtig spielen Streuobstbestände als geschichtlich gewachsene Kultivierungsform von Apfel und Birne, aufgrund ihres ästhetischen Wertes, eine immer größere Bedeutung für den stärker werdenden „sanften Tourismus“ (MONSCHEIN 2006).

Die Interaktion des Tourismus mit dem Erhalt von Streuobstwiesen kann sich als gegenseitig äußerst befruchtend und synergistisch herausstellen (HEHENBERGER 2005).

Mostbuschenschänken als Alternative zu herkömmlichen Heurigen und Buschenschänken und die Vermarktung und kulinarische Verarbeitung von Streuobstprodukten wird durch den Tourismus belebt. Dies bedingt einerseits die Notwendigkeit der Neupflanzung alter hochstämmiger Kernobstsorten zur Erhaltung der Attraktivität des Erscheinungsbildes dieser Kulturlandschaft, auf der anderen Seite benötigt man den Rohstoff Apfel und Birne zur Herstellung veredelter, aufgrund regional spezifischer Sortenverteilung, kleinräumig charakteristischer Kernobstprodukte.

Das Zusammenspiel nachhaltiger Nutzung der Streuobstwiesen hinsichtlich Ökonomie und Ökologie ermöglicht nicht nur den Erhalt, sondern auch eine mögliche räumliche Ausweitung dieser bedeutenden Natur- und Kulturlandschaft.

Wie bereits dargestellt bieten Streuobstwiesen aufgrund ihres extensiven Bewirtschaftungscharakters ein wichtiges Rückzugsgebiet (Ersatzbiotop) für gefährdete Tier- und Pflanzenarten (ERLACH 1994). Somit dienen sie dem Erhalt der genetischen Vielfalt der heimischen Fauna und Flora.

Bestandesbildend in Streuobstwiesen sind jedoch die Hochstammobstbäume, im Untersuchungsgebiet vor allem Apfel und Birne. Die natur- und kulturhistorische Entwicklung sowie das ökologisch-physiologische Potential des Kulturapfels *Malus x domestica* BORKH. und der Kulturbirne *Pyrus communis* L. begründen den Reichtum an unterschiedlichsten Kultivaren und damit die Bedeutung dieser Varietäten als genetische Ressource.

Die Streuobstwiese und die diese landwirtschaftliche Kulturform zusammensetzenden Kernobstsorten waren aber gerade in den letzten Jahrzehnten massiven anthropogenen Beeinflussungen ausgesetzt.

Einerseits führte die Intensivierung der Landwirtschaft mit dem Ziel der Ertragsoptimierung zu einem massiven Rückgang der Streuobstwiesenflächen. Andererseits kam es durch die einseitige Förderung kommerziell ertragreicher Sorten sowie durch die Einführung streng einheitlicher Kriterien bezüglich Form, Farbe und Größe in den EU-Handelsklassen für Obst zu einem Verdrängen alter Kernobstsorten aus dem internationalisierten Obsthandel. Die

Überalterung und die mangelnde Pflege bestehender Steuobstbestände sind ebenfalls für den Verlust der das Untersuchungsgebiet (Steiermark und Teile Sloweniens) so prägenden Kulturlandschaft verantwortlich (KEPPEL et al. 2001, KEPPEL et al. 2002).

All diese Einflüsse bedingen ein dramatisches Abnehmen der genetischen Diversität alter Kernobstsorten (HOKANSON et al. 2001).

Die gegenwärtige, trotzdem noch vorhandene Sortenvielfalt wird hauptsächlich durch zwei Faktoren bedingt: Die gezielte Förderung des Obstbaues im 19. Jahrhundert in der Steiermark und Teilen Sloweniens und die edaphische wie klimatische Vielfalt des Untersuchungsgebietes, aufgrund derer sich eine spezielle, regional angepasste Sortenzusammensetzung entwickelte (FAULAND et al. 2005).

Während die „Geschichtliche Entwicklung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten“ im Kapitel 1.2 genauer behandelt wird, sei hier kurz die regional spezifische, ökologisch bedingte Sortenverteilung im Untersuchungsgebiet erörtert.

Heute finden wir in der Steiermark und Teilen Sloweniens nach wie vor eine große Anzahl kultivierter Hochstammobstbäume. Interessant ist vor allem die kleinräumige Verteilung der unterschiedlichen Sorten, die sich auf deren Anpassungsfähigkeit an bestimmte Klimate und Bodenverhältnisse zurückführen lässt.

Die Landschaftsgliederung der Steiermark spiegelt die geologische, geomorphologische und klimatische Inhomogenität der Steiermark wider (<http://www.umwelt.steiermark.at>). Dem entsprechend sind die verschiedenen Regionen der Steiermark prinzipiell unterschiedlich gut für den Streuobstbau geeignet.

Die Süd-, Ost- und Weststeiermark bietet mit mildem Klima, ausreichend Niederschlägen, tiefgründigen Böden und langen Vegetationsperioden optimale Kulturbedingungen für den Streuobstbau. Weitere potentielle Anbaugelände für Streuobst befinden sich in den großen Flusstälern der Enns, Mur und Mürz in der Obersteiermark, sowie in deren zahlreichen Nebentälern (FAULAND et al. 2005).

Bemerkenswert ist aber, dass, neben diesen begünstigten Lagen, viele Obstbaugelände am südöstlichen Alpenrand orographisch unterschiedlichste Regionen umspannen (von ca. 300 m Seehöhe bis 1300 m) (KEPPEL et al. 2002, FUSSI 2003). Die bis in höhere Lagen vorkommenden Sorten müssen nicht nur mit kürzeren Vegetationsperioden sondern auch mit rauerem Klima zurecht kommen. So findet man Streuobstwiesenbau z. B. in den Bezirken



Murau und Liezen, in der Ramsau und in den Wildalpen in Höhen bis 1300 m vor, hier jedoch meist in besonderen Gunstlagen wie z. B. Südexposition mit damit verbundener Verlängerung der Vegetationsperiode (FAULAND et al. 2005).

Gebiete mit für den Streuobstbau günstigen Klimaten weisen auch den größten Anteil an konzentrierter landwirtschaftlicher Nutzung auf, was die direkt negative Beeinflussung, den Verlust der Streuobstwiesenbestände bedingt.

Ökologisch anspruchsvolle Regionen, wie man sie vor allem in der Obersteiermark findet, zeichnen sich als nicht so geeignet für den großräumig rationalisierten Landbau aus. Solche Gebiete repräsentieren auf der einen Seite Refugien für traditionelle Agrikultur und somit auch für Streuobstbau, daneben stellen diese Regionen hohe klimatische und edaphische Anforderungen an dort kultivierte Kernobstvarietäten. Dem entsprechend wird man hier nur Kultivare vorfinden, die sich durch großes ökophysiologisches Akklimatisationsvermögen auszeichnen (FAULAND et al. 2005, MONSCHEIN 2006).

Die jeweiligen, an unterschiedlichsten Standorten vorkommenden Sorten bilden trotz oder gerade aufgrund verschiedenster abiotischer Einflüsse (z. B. Boden, Klima, Dauer der Vegetationsperiode) Fruchteigenschaften aus, die für den Landwirt bzw. Endverbraucher wünschenswert und somit verarbeitungs- bzw. vermarktungstechnisch nutzbringend sind.

Die unterschiedlichen ökologischen Anforderungen des Untersuchungsgebietes an den Streuobstbau und die alten Kernobstsorten spiegeln sich in der regionalen Sortenverteilung wider.

Manche Kultivare finden sich in allen Regionen der Steiermark, sie können als „Generalisten“ bezeichnet werden. So z. B. der *Kronprinz Rudolf* oder der *Gravensteiner*, wobei am Beispiel des *Gravensteiner* der Einfluss der jeweiligen Anbauregion auf den Verwendungszweck der Frucht besonders interessant erscheint. Während diese Varietät in den südlichen, östlichen und westlichen Gebieten der Steiermark als Sommersorte (Tafelobst, Pflückreife Ende August bis Anfang September, Genussreife September bis November) mit hervorragendem Aroma geschätzt wird, findet der *Gravensteiner* in der Obersteiermark mit einer ein- bis vierwöchig verspäteten Reifezeit als Most- und Lagerapfel (bis ins Frühjahr) Verwendung.

Die als „Spezialisten“ zu betitelnden Kultivare finden sich entweder hauptsächlich in den südlichen Regionen (z. B. *Ilzer Rosenapfel*, *Cox Orange*) oder bevorzugt in der Obersteiermark (z. B. *James Grieve*, *Roter Herbstkalvill*) wieder. Diese Erscheinung lässt sich

mit speziellen Sorteneigenschaften begründen (z. B. Frostempfindlichkeit und hohe Standortansprüche des *Cox Orange*), mit dem Entstehungsort der Sorte korrelieren (z. B. *Ilzer Rosenapfel*, Mutterbaum steht in Ilz), und letztendlich auch mit der Konkurrenz ursprünglich in der gesamten Steiermark verbreiteter Varietäten mit, zu ähnlichen Zeitpunkten reifenden Intensivobstsorten zurückführen (z. B. früher in der Südoststeiermark kultivierte, heute dort nur mehr sehr selten vorkommende Sorte *Roter Herbstkalvill*, Reifezeit September, wird relativ schnell mehlig) (FAULAND et al. 2005).

Neben dieser, durch die oben angeführten Gründe bedingten regionalen Diversität stellt bei der Beschäftigung mit alten Kernobstsorten vorallem die korrekte pomologische Bezeichnung der Varietäten eine große Herausforderung dar.

Viele, vielleicht in der Vergangenheit richtig benutzte Sortenbezeichnungen von Apfel- und Birnenvarietäten, die heute noch in Hausgärten und Streuobstwiesen kultiviert werden, sind in Vergessenheit geraten. Heute haben sich teilweise anstelle ehemals richtiger Züchtungsnamen lokale Sortenbezeichnungen, deren Herkunft oft nicht mehr nachvollziehbar ist (z. B. Türkenapfel für *Baumanns Renette*) eingebürgert. Die Sorten werden aufgrund gewisser Fruchteigenschaften (z. B. Butterapfel für *Weißer Klarapfel*), nach dem äußeren Erscheinungsbild (z. B. Herzapfel für *Roten Herbstkalvill*) oder nach bestimmten Verwendungszwecken (z. B. Nikolausapfel für verschiedene leuchtend rot gefärbte kleinere Äpfel, unter anderem *Roter Jungfernapfel*) benannt. Auch die Zeit der Fruchtreife nahm und nimmt Einfluss auf die lokale Sortenbezeichnung. So werden Birnen, die um den 15. August (großer Frauentag, Maria Himmelfahrt) reif werden, oft als Frauenbirnen bezeichnet (z. B. *Nagowitz*) (MONSCHEIN et al. 2005).

Räumlich weit verbreitete Kultivare, Kernobstsorten mit großer ökologischer Amplitude und allgemein von Produzenten und Konsumenten bevorzugten Frucht- und Baumeigenschaften, weisen hingegen über unterschiedlichste Regionen hinweg die idente und meist korrekte pomologische Nomenklatur auf. Als Beispiel dafür sei hier die Sorte *Kronprinz Rudolf* angeführt, der, abgesehen von der Abkürzung *Kronprinz*, von der Ober- bis in die Südsteiermark mit der korrekten Sortenbezeichnung, d. h. mit dem für die Sorte als ursprünglich anzusehenden Züchtungsnamen geführt wird.

Um die gegenwärtige Diversität alter Kernobstsorten feststellen zu können, ist es unbedingt notwendig, Aufsammlungen mit nicht eindeutiger oder fehlender Sortenbezeichnung zu

bestimmen. Dafür steht eine Reihe pomologischer Charakterisierungsmethoden zur Verfügung.

Die äußere Erscheinungsform der Früchte stellt ein wesentliches Merkmal zur Sortendifferenzierung dar. Fruchtform und -größe, die Ausprägung von Grund- und Deckfarbe sowie die Kennzeichen Kelch- und Stielbucht sind maßgebliche Bewertungskriterien im Zuge klassischer Sortenbeschreibungen.

Gerade die Fruchtfarbe stellt ein markantes, aber von äußeren Einflüssen stark abhängiges Charakteristikum dar. So haben der Boden, Anbau- und Kulturmaßnahmen, Klima sowie die Behangdichte (Lichtexposition der Früchte) der Obstbäume großen Einfluss auf die Ausprägung dieses Sortencharakteristikums; z. B. Schattenfrüchte des *Kronprinz Rudolf* werden kaum oder nur in geringerem Ausmaße jene verwaschen rote Deckfarbe ausbilden wie sie bei sonnenexponierten Exemplaren so sortentypisch ist (MONSCHEIN et al. 2005).

Das Erscheinungsbild der Früchte wird aber auch durch das rauer werdende Klima aufgrund zunehmender Seehöhe bzw. ungünstiger Exposition in höheren Lagen beeinflusst. Früchte, die in Lagen über 1000 m Seehöhe ausgebildet werden, weisen, wie Früchte die in Nordeuropa wachsen, oft eine Streckung der Längsachse auf, d. h. Sorten, die in den Gunstlagen der Ebenen eine eher kugelige, plattrunde Form aufweisen, können bei zunehmender Seehöhe hochkugelig bis fassförmig erscheinen. Zusätzlich ist mit vermehrter UV-Einstahlung höherer Lagen auch mit einer Zunahme des Anthocyangehaltes in der Fruchtschale zu rechnen. Dadurch wird die Deckfarbenausbildung nicht nur intensiviert, sondern kann bei vereinzelt Sorten auch erst ab einer bestimmten Seehöhe auftreten (FUSSI 2003).

Ein weiteres Charakterisierungsmerkmal, die Berostung der Früchte, unterliegt ebenfalls unterschiedlichsten biotischen und abiotischen Einflüssen. Unter Berostung versteht man bräunlich raue Stellen der Fruchtschale, die auf Verkorkungen zurückzuführen sind. Bei manchen Sorten stellt die Berostung das entscheidende Bestimmungsmerkmal dar und kann als sortentypisch (z. B. *Kanada Renette*) bezeichnet werden. Beachtenswert ist jedoch, dass Berostung auch aufgrund mechanischer Verletzungen (Astreibestellen an der Frucht), Mehlaubefall, Rostmilbe, Frosteinwirkungen zur bzw. nach der Blütezeit (Frostringe), zu intensive Sonnenbestrahlung oder falsch gewählte Standorte (Tallagen mit lang anhaltendem Nebel) bei fast jeder Sorte hervorgerufen werden kann (MONSCHEIN et al. 2005).

So reichen, aufgrund der großen Variabilität hinsichtlich der Intensität ihrer Ausprägung, diese augenfälligsten Fruchtmerkmale zur Unterscheidung der verschiedenen Varietäten nicht aus.

In der klassischen Pomologie werden daher weitere Bestimmungskriterien zur Sortencharakterisierung herangezogen.

Längs- und Querschnitte der Früchte geben Aufschluss über die Form des Kernhauses und der Gefäßbündel, die Kernhauskammergröße und schließlich auch über das Aussehen der Kerne selbst.

Ein nicht zu vernachlässigendes Sortencharakteristikum stellen Geschmack und Geruch der Früchte dar. Die organoleptische Beurteilung soll das sortentypische Aroma und den spezifischen Duft der Früchte sowie die Beschaffenheit des Fruchtfleisches (z. B. saftig, trocken; knackig, weich) in die Bewertung miteinbeziehen. Für die geschmackliche Wahrnehmung und Beurteilung der verschiedenen Kultivare stellt das Zucker-Säure Verhältnis der Früchte ein entscheidendes Kriterium dar. So werden Früchte, aufgrund dieses Verhältnisses als harmonisch (z. B. *Kronprinz Rudolf*), als einseitig süß (z. B. *Lavanttaler Bananenapfel*) oder einseitig sauer (z. B. *Grüner Stettiner*) empfunden. Genaue Untersuchungen dieser Sorten hinsichtlich dieser Fruchtinhaltsstoffe mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) haben jedoch gezeigt, dass die z. B. als sauer wahrgenommene Apfelsorte *Grüner Stettiner* einen beinahe dreimal so hohen Zuckergehalt pro 100 g Frischgewicht aufweist als die als einseitig süß empfundene Varietät *Lavanttaler Bananenapfel*. Der Grund hierfür liegt in der geschmacklichen Überlagerung des Zuckergehaltes durch den Anteil an Fruchtsäuren.

Allerdings ist auch die quantitative Zusammensetzung der Fruchtinhaltsstoffe (Zucker, Säuren, phenolische Substanzen) durch äußere Faktoren modifizierbar. Die während der Vegetationsperiode vorherrschende Witterung, aber auch der jeweilige Standort (Höhenlage, Klima, Boden, Bearbeitung, Exposition) und die Unterlage des Baumes haben Einfluss auf diese geschmackbestimmenden Fruchtparameter (HERBINGER et al. 2004/a und b, HOFER et al. 2005).

Die Methoden der klassisch pomologischen Sortencharakterisierung basieren auf der oft vermeindlich sortentypischen Ausbildung der Früchte ein und derselben Varietät. Die oben dargestellten natürlichen und anthropogenen Einflüsse und die daraus resultierenden Variabilitäten in den Bestimmungsmerkmalen stellen nicht nur große Anforderungen an

Pomologen bzw. Diversitätsforscher, sondern sollten auch als ein Kennzeichen für das große genetische Potential ein und derselben Sorte bzw. unterschiedlicher Kultivare angesehen werden.

Letztendlich ist der Einfluss der Sortenvielfalt in Streuobstwiesen auf das Risiko eines flächendeckenden Pathogenbefalls nicht zu vernachlässigen.

Die unterschiedliche Blüte- und Reifezeitpunkte bzw. Fruchtentwicklungsstadien verschiedener Varietäten in den Streuobstbeständen gewährleisten eine verbesserte Risikostreuung hinsichtlich des Befalls der Früchte und Bäume durch verschiedenste Kernobstkrankheiten.

Als Beispiel wäre hier der Feuerbrand *Erwinia amylovora* (BURILL) WINSLOW et al. zu nennen. Die Infektion der Bäume erfolgt über Wunden oder Blüten (Blütennarben) der Wirtspflanzen. Herrscht zum Zeitpunkt der Blüte einzelner Bäume feuchtwarme Witterung (Temperatur über 18 °C und relative Luftfeuchte über 70 %), so können einzelne Bäume über die Blüte mit dem Feuerbrand *Erwinia amylovora* (BURILL) WINSLOW et al. infiziert werden. Sorten, die noch nicht aufgeblüht oder bereits abgeblüht sind, würden von der Blüteninfektion verschont bleiben.

Da der Blütezeitpunkt zwischen unterschiedlichen Sorten variiert (Abb. 3), stellt die Streuobstwiese mit ihrer Kernobstdiversität eine Möglichkeit der verminderten Blüteninfektion durch den Feuerbrand dar.

Dies zeigt auch am Beispiel der Streuobstwiese den Vorteil von Vielfalt gegenüber Monokulturen.



Abb. 3: Unterschiedliche Blütezeitpunkte verschiedener Kernobstvarietäten (Foto: Edith Arzberger)

Die Streuobstwiese als naturnahe, extensiv bewirtschaftete Kulturlandschaft dient als Rückzugsgebiet und Ersatzlebensraum für gefährdete Tier- und Pflanzenarten und damit dem Erhalt der genetischen Diversität der heimischen Fauna und Flora.

Die Bedeutung der Streuobstwiese als Genreservoir begrenzt sich aber nicht nur auf die darin vorkommenden, sich natürlich ansiedelnden Tiere und Pflanzen, sondern erweitert sich um den Aspekt des ökologisch optimal angepassten Genpools alter Kulturapfel – *Malus x domestica* BORKH. und Kulturbirnen – *Pyrus communis* L. Varietäten.

Die diese Streuobstwiesen zusammensetzenden Hochstammobstbäume erfüllen trotz oder gerade aufgrund der an sie gerichteten unterschiedlichsten klimatischen und edaphischen Anforderungen landschaftsästhetische, kulturflächenschützende und natürlich, als landwirtschaftlich genutzte Kulturpflanzen, agrarökonomische Aufgaben.

## 1.2 Geschichtliche Entwicklung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten

Mit einer weltweiten Produktion von ca. 63,8 Millionen Tonnen im Jahre 2006 (Österreich: 509.139 Tonnen, Slowenien: 119.176 Tonnen, China: 26.065.500 Tonnen, FAO 2008) gehört der europäische Kulturapfel (*Malus x domestica* BORKH.) zu den am weitest verbreiteten und ökonomisch bedeutendsten Früchten der gemäßigten Zone (KENIS & KEULEMANS 2005).

Die Produktion an Birnen (vor allem *Pyrus communis* L., *Pyrus pyrifolia* NAKAI) betrug im Jahre 2006 weltweit ca. 19,5 Millionen Tonnen (Österreich: 117.243 Tonnen, Slowenien: 11.447 Tonnen, China: 11.988.000 Tonnen, FAO 2008).

Die Entwicklung, Kultivierung und Selektion alter Apfel- und Birnensorten ist eng mit der Kulturgeschichte der jeweils pomologisch untersuchten Region verbunden. Dieses an lokale klimatische Gegebenheiten und edaphische Bedingungen gut angepasste Sortenspektrum wird heute sehr stark von internationalen Züchtungsprogrammen und Marktbedürfnissen beeinflusst, was zu einer Vereinheitlichung und Einschränkung der historisch gewachsenen Sortendiversität führt.

Bei der Beschäftigung mit alten Sorten fällt daher besonders auf, dass sich viele Sorten in relativ kleinräumigen Gebieten erhalten haben, und es zwischen geographisch wie geschichtlich weit auseinander liegenden Obstbaugebieten eine große Diversität bezüglich der die Streuobstwiesen zusammensetzenden alten Kernobstsorten (z. B. *Kronprinz Rudolf* in der Steiermark, *Kalterer Böhmer* in Südtirol) gibt (MONSCHEIN et al. 2005).

Die Untersuchung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten in der Steiermark und Teilen Sloweniens (Untersuchungsgebiet) bedingt deshalb unwillkürlich eine Auseinandersetzung mit der Geschichte des Obstbaus im Untersuchungsgebiet sowie mit den historischen und gegenwärtigen Veränderungen der Kulturlandschaft Streuobstwiese.

Des Weiteren wird wegen der wesentlich größeren Bedeutung für das Untersuchungsgebiet und der weitgehenden Entsprechung von *Pyrus communis* L. in seiner geschichtlichen Entwicklung vor allem der Kulturapfel (*Malus x domestica* BORKH.) im kulturhistorischen Spannungsfeld dargestellt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die mitteleuropäischen Eichenmischwälder nach der letzten Eiszeit, um ca. 6000 v. Chr., bereits Holzäpfel (*Malus sylvestris* (L.) MILLER) und Holzbirnen (*Pyrus pyraster* (L.) BURGSDORF) enthalten haben. Die ersten konkreten Funde stammen allerdings erst aus den neolithischen (4000 – 1800 v. Chr.) und bronzezeitlichen (1800 – 800 v. Chr.) Pfahlbaustationen Österreichs, Deutschlands und der Schweiz. Im Bereich des Mondsees in Oberösterreich konnten, außer Wildäpfel mit großem Kerngehäuse, auch große Äpfel, welche halbiert und gedörrt wurden, gefunden werden. Aufgrund der unterschiedlich großen Früchte schlossen einige Forscher auf eine, wenn auch primitive Inkulturnahme (z. B. Besserhalten und Pflege der Obstbäume) von Apfel und Birne bereits in dieser Zeit.

Wenn es in der Steiermark auch keine Pfahlbauten gab und somit keine Obstfunde aus dieser Zeit zu verzeichnen sind, so kann man doch aufgrund keramischer Funde schließen, dass die Besiedelung der Steiermark in der Jungsteinzeit besonders im Grazer Feld, Leibnitzer Feld, im Raabtal und in der Hartberger Gegend schon ziemlich dicht war und somit die Kultur des Obstes wie in den angrenzenden Gebieten bekannt sein musste. Die ersten dokumentierten Funde in der Steiermark stammen aus der Hallstattzeit (6. Jhd. v. Chr.). In einem Brandgrab bei Wies wurde Obst als Speisebeigabe gefunden (BERNKOPF 1994, BERNKOPF 2005/b, KARL et al. 1949).

Am Beginn der Kultivierung von Obstbäumen stand die zunächst unbewusste, später die bewusste Selektion durch die Ureinwohner aufgrund primär wichtiger Fruchteigenschaften wie Größe und Geschmack. Die Weiterentwicklung des Obstbaues darf allerdings geographisch nicht isoliert betrachtet werden. Die Entwicklung der Kulturformen der Obstgehölze in unserem Untersuchungsgebiet ist wahrscheinlich sehr komplex abgelaufen. Im Neolithikum, vermehrt aber ab der Bronzezeit, hatten unserer Ureinwohner nachweislich Handelsbeziehungen mit anderen teils erstaunlich weit entfernten Siedlungsräumen, unter anderem auch mit östlichen Hochkulturen. Dies erklärt auch die Beteiligung östlicher Malus-Arten an der Kulturwerdung des europäischen Apfels (*Malus x domestica* BORKH.).

Ab ca. 5000 v. Chr. begannen indogermanische Völker (Ausgangspunkt südlich des Kaukasus bzw. Anatolien) in Richtung Westen zu ziehen. Es ist anzunehmen, dass sie Früchte bzw. Samen östlicher Wild- und Kulturobstarten mitnahmen. Im Laufe der Zeit haben sich Wild- und Kulturformen genetisch durch Rekombination und Hybridisierung, sowie durch Mutation bzw. durch natürliche und anthropogen bedingte Selektion ständig verändert, wobei neue Arten und Kulturformen entstanden sind.



So fand auch in unserem Siedlungsraum eine genetische Vermischung, Hybridisierung, heimischer und östlicher Obstgehölze statt. Heute wird angenommen, dass drei *Malus*-Arten (die Gattung *Malus* umfasst je nach Klassifizierung zwischen 25 und 47 Arten, ROBINSON et al. 2001) an der Entwicklung des europäischen Kulturapfels (*Malus x domestica* BORKH.) maßgeblich beteiligt waren:

- *Malus sylvestris* (L.) MILLER  
„europäischer Holzapfel“, Westeuropa bis Russland (dort vor allem die *ssp. praecox* (PALL.) SCHNEIDER, meist dornelos)
- *Malus orientalis* UGLITZKICH  
„Kaukasus-Apfel“; Kaukasus, Kleinasien, Nordiran
- *Malus sieversii* (LEDEB.) ROEMER  
„Altei-Apfel“; Kasachstan (Almaty = Apfelstadt), Nordafghanistan und Westchina (*ssp. niedwitzkyana* (DIECK) LITHONOS, wird nach ROBINSON et al. 2001 als eigene Art ausgewiesen [*Malus niedzwetzkyana* DIECK. EX KOEHNE]).

Weiters dürften folgende *Malus*-Arten an der Entwicklung von *Malus x domestica* BORKH. beteiligt gewesen sein: *Malus baccata* (L.) BORKH. („sibirischer Holzapfel“, Nordost-China), *Malus mandshurica* (MAXIM.) V. KOMAROV („mandschurischer Holzapfel“, Nordost-China, Japan) und *Malus prunifolia* (WILLD.) BORKH. („chinesischer Holzapfel“) (BERNKOPF 1994, BERNKOPF 2005/a, HOKANSON et al. 2001, JANICK et al. 1996).

Der genaue botanische Ursprung von *Malus x domestica* BORKH. ist noch unklar, wobei wohl *Malus sieversii* (LEDEB.) ROEMER der bedeutendste genetische Vorfahre sein dürfte. Diese Art, welche vom Tien Shan-Gebirge bis zum Kaspischen Meer vorkommt, zeigt eine sehr große Vielfalt bezüglich Fruchtform, Fruchtfarbe und Geschmack, gerade wie man sie auch bei Varietäten des europäischen Kulturapfels findet (MORGAN & RICHARDS 1993).

Taxonomische Untersuchungen mit Hilfe genetischer Analysen von ITS Sequenzen (internal transcribed spacer) der nukleären ribosomalen DNA und der matK-Region des Chloroplastengenoms haben, bezüglich der Aufklärung der an der Entwicklung von *Malus x domestica* BORKH. beteiligten *Malus*-Arten, keine weiteren Erkenntnisse erbracht (ROBINSON et al. 2001, HARRIS et al. 2002).

Bei der Kulturwerdung von *Pyrus communis* L. ist ebenfalls von einer Wechselwirkung zwischen einheimischen (*Pyrus pyraster* (L.) BURGDORF) und asiatischen Wild- und Kultursorten auszugehen (BERNKOPF 2005/a).

Der wesentlichste entwicklungsgeschichtliche Schritt für die Etablierung des Kulturapfels und der Kulturbirne war die „Erfindung“ des Pfropfens, also einer Art der vegetativen Vermehrung von Obstgehölzen. Bis zu dieser Entdeckung waren die kultivierten Sorten Produkte zufälliger Befruchtung (Zufallssämlinge) unterschiedlicher Sorten (Selbstunfruchtbarkeit von Apfelsorten, BROOThAERTS 2003, PIEBER 2007), wobei das Ergebnis meist sehr variable und kleinfrüchtige Varietäten darstellte (ROBINSON et al. 2001). Eine genetische Konservierung bzw. sortenreine (vegetative) Vermehrung von, aufgrund günstiger Frucht- oder Baumeigenschaften selektierter Obstgehölze war den Ureinwohnern Mitteleuropas aber noch nicht bekannt. Die Kunst des Veredelns wurde durch die Römer zu uns gebracht [Pfropfung („insitio“) und Okulation („inoculatio“)], sie selbst erlernten das Veredeln von den Griechen, diese wiederum erwarben ihre obstbaulichen Kenntnisse im Kaukasus und in Persien (BERNKOPF 1994).

Mit der Besitzergreifung Noricums (Noricum wurde 15 v. Chr. Teil des römischen Reiches, ab 45 n. Chr. römische Provinz) durch die Römer ist eine besondere Entwicklung des Obstbaues, also die planmäßige Ausdehnung und Pflege der Obstkultur anzunehmen (Pomona = römische Göttin des Obstsegens). Gaius Plinius Secundus (23 – 79 n. Chr.) verzeichnete bereits 36 Apfel- und 41 Birnensorten. Die Namen erhielten sie aufgrund ihrer Herkunft (z. B. Syrischer Apfel), wurden nach Züchtern benannt, aber natürlich auch nach deren Fruchteigenschaften, Geschmack und Aussehen (z. B. Mehlapfel, Barbarische Birne) (BERNKOPF 2005/b, KARL et al. 1949).

Der Zusammenbruch des römischen Reiches im 5. Jhd. n. Chr. sowie die Völkerwanderungen führten auch bei uns zu einem Niedergang des Obstbaues.

Erst im 8. Jahrhundert wurde wieder mit gezielter landwirtschaftlicher Kultivierung in der Steiermark begonnen. Die Bestrebungen Karl des Großen (748 – 814 n. Chr.) Landwirtschaft und Obstbau zu fördern haben sich auch auf unser Land ausgewirkt. So wurde von Karl dem Großen 812 n. Chr. die Landgüterverordnung „Capitulare de villis et curtis imperialibus“ („Verordnung über die Krongüter und Reichshöfe“) erlassen. Dies ist eine Verordnung, die sehr detailliert die Bewirtschaftung der kaiserlichen Herrnhöfe und Landgüter vorschreibt. Darin sind Nutzpflanzen (z. B. *salviam* = *Salvia officinalis* L., *carvitas* = *Daucus carota* L.) und Bäume aufgelistet, die in jedem Landgut kultiviert werden sollten, so auch diverse Apfelsorten (*malorum nomina*; Geroldinger, Spirauker, Gosmaringer, Crevedeller). In dieser

Zeit übernahm der Benediktinerorden, zu dessen Pflichten die Urbarmachung des Bodens und der Gartenbau gehören, wesentliche Aufgaben des Capitulare. So wurden in den Klostergärten die im Capitulare aufgelisteten Pflanzen und Obstbäume gezogen.

Der Obstbau hat sich in dieser Zeit weitgehend innerhalb der geschützten Mauern von Klöstern, Burgen, Schlössern, vereinzelt auch in den eingezäunten Gärten reicher Bürger und freier Bauern abgespielt. Einen Streuobstbau hat es damals wahrscheinlich noch nicht gegeben (WIKIPEDIA 2007/a, BERNKOPF 1994, KARL et al. 1949).

Die erste Urkunde über den Obstbau Steiermarks findet sich erst Mitte des 12. Jhd., welche bei einem Meierhof des im Jahre 1074 gegründeten Benediktinerstiftes Admont einen großen Obstgarten erwähnt. Es ist daher der Schluss gerechtfertigt, dass bei den übrigen steirischen Klöstern, welche um diese Zeit gegründet wurden (Göß 1020, St. Lambrecht 1096, Rein 1129, Oberburg 1140, Seckau 1140, Voralpe 1163) ebenfalls Obstanlagen bei den Meierhöfen gepflegt wurden (KARL et al. 1949).

In Überlieferungen aus der Zeit des 16. und 17. Jhd. wird erstmals, neben dem bereits bestehenden Streuobstwiesenbau, die Praxis der Spalierzucht erwähnt. Durch diese war es möglich, Wärme liebende Sorten (an Hausmauern) zu kultivieren. Ermöglicht wurde die Spalierzucht durch das Auffinden von schwach wachsenden Apfelunterlagen [*Malus paradisiaca* (L.) MEDIKUS (Paradies- od. Johannisapfel) und *Malus dasyphylla* BORKH. (Splitt-, Filzapfel, Doucin)], von denen erst Jahrhunderte später die heute verwendeten Typenunterlagen selektiert wurden. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Veredelung (Pfropfen, Okulieren) entweder auf Sämlingen oder auf wild vorkommenden und von den Landwirten ausgegrabenen Holzapfelbäumen (BERNKOPF 1994, BERNKOPF 2005/a).

Unter der Regierung von Kaiserin Maria Theresia (1717 – 1780) verzeichnete der Obstbau in der Steiermark einen weiteren Aufschwung. Maria Theresia gründete im Jahre 1764 die k. k. Ackerbaugesellschaft („Agricultur Sozietät“), der neben anderen Aufgaben auch die Förderung des Obstbaues unterlag. In dieser Zeit wurden bereits bedeutende Mengen von Äpfeln nach Niederösterreich, Salzburg, Ungarn und Triest ausgeführt. Außerdem wurde sehr viel Most (Obstwein) als Getränk für die ländliche Bevölkerung hergestellt was zusätzlich zu vermehrtem Obstanbau führte. An der Spitze der Apfelsorten wird die heimische Sorte Maschanzker genannt. Ein Beweis für seine Wertschätzung ist auch der für ihn bezahlte Preis von 2 – 3 Kreuzern pro Pfund. Zu dieser Zeit kostete ein Pfund Rindfleisch 4 Kreuzer, ein

Pfund Schweinefleisch 5 Kreuzer und ein Huhn 9 Kreuzer (VEREINSLEITUNG DES STEIERMÄRKISCHEN OBSTBAUVEREINES 1915).

Den wohl unmittelbar größten Einfluss auf den Obstbau in der Steiermark nahm Erzherzog Johann (1782 – 1859). Er gründete 1819 die k. k. Steiermärkische Landwirtschaftsgesellschaft.

Um den Gesellschaftsmitgliedern einen besonderen Anreiz für ein fortschrittliches Wirken zu geben, widmete Erzherzog Johann durch eine Reihe von Jahren 6 Stipendien à 40 Gulden für solche Landwirte, die nach Vorschlag einer Filialleitung sich größere Verdienste um die Hebung des Obstbaues erwarben. Von dem Bestreben geleitet, eine verstärkte Anpflanzung von Obstbäumen, so unter anderem auch entlang von Straßen, wie auch von erprobten Rebsorten herbeizuführen, wurde über Veranlassung Erzherzog Johanns und mit Zustimmung des Zentralausschusses der k. k. Landwirtschaftsgesellschaft im Jahre 1820 die Errichtung einer Zentralobstbaumschule (landwirtschaftlicher Versuchs- und Musterhof 1820 - 1870) beschlossen, wofür im Jahre 1822 in Graz-West ein passendes Grundstück erworben wurde. Der Musterhof befanden sich innerhalb des Raumes der oberen Annenstraße, Finkengasse, Niesenberggasse (früher Nagerlgasse) und Idlhofgasse (früher Laburnergasse) und wurde 1830 um weitere Grundstücke im Bereich der heutigen Niesenberggasse sowie in Baierdorf bei Graz erweitert (KARL et al. 1949).

Diese Grundstücke waren für die Anzucht von fertigen Obstbäumen, Obstwildlingen und Rebenstecklingen, ferner für die Unterbringung von Obstmutterbäumen verschiedenster Art, letztere zum Teil auch als Topfpflanzen, sowie schließlich für den Vergleichswisen Anbau von Getreide-, Mais-, Kartoffel-, Gemüse- und Futterpflanzensorten bestimmt.

Die Abbildung 4 zeigt den „Plan des Steyermark Ständischen Musterhofs zu Grätz in der Murvorstadt, Eggenberger-Straße Nr. 595 über den Zustand des Gartens im Frühjahr 1844“. Die einzelnen Feldeinheiten wurden mit römischen Ziffern bzw. Zahlen und Buchstaben versehen. Diese finden in einer dem Originalplan beiliegenden Erklärung ihre weiteren Erläuterungen.

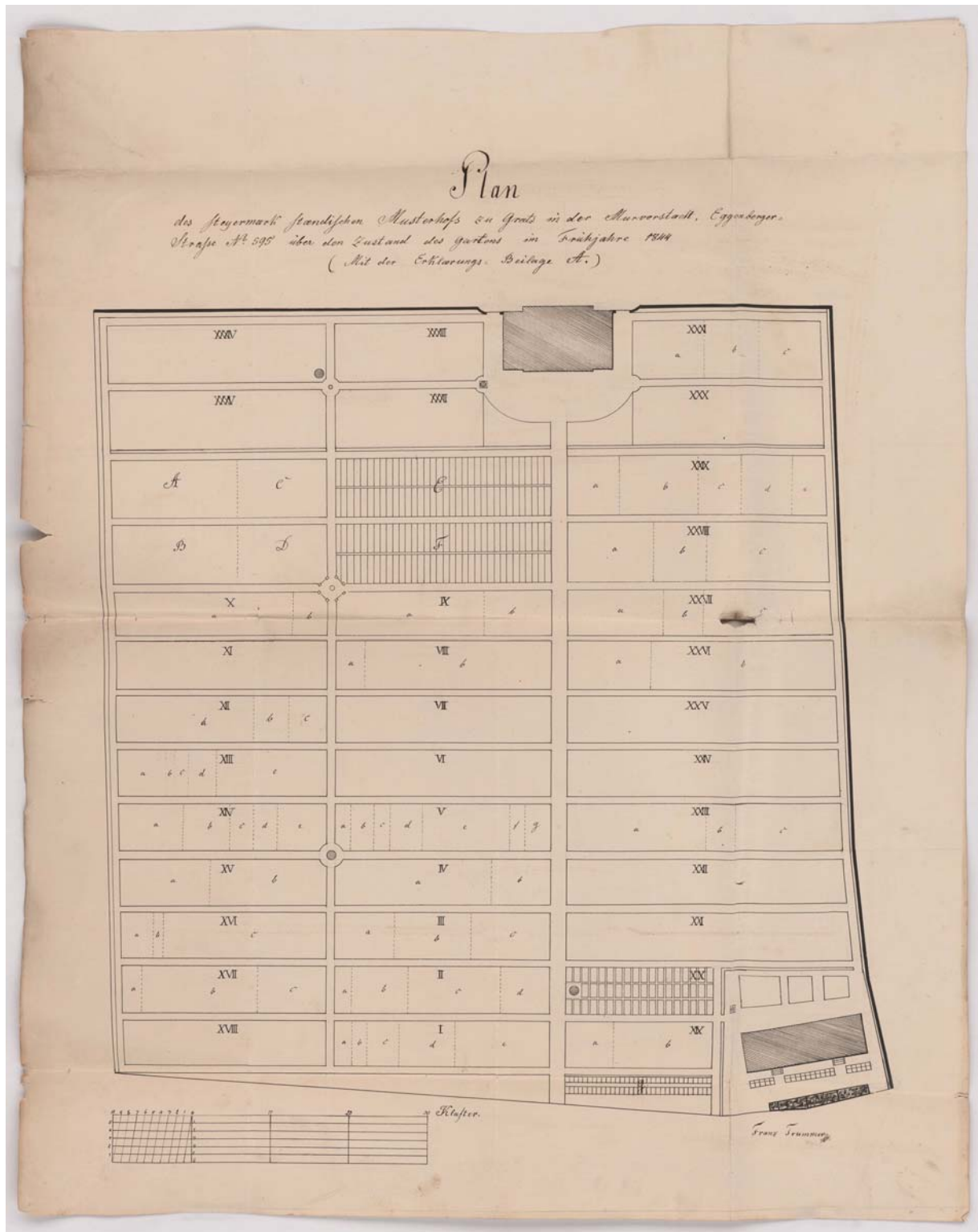


Abb. 4: Plan des Steyermark Ständischen Musterhofs zu Grätz in der Murvorstadt, Eggenberger-Straße Nr. 595 über den Zustand des Gartens im Frühjahr 1844 (Quelle: STEIERMÄRKISCHES LANDESARCHIV<sup>©</sup>)

Neben diesem Musterhof zu Graz legte Erzherzog Johann auch auf seinen Gütern in Stainz und Pickern (Pekre, Slowenien) Obstbauschulen an.

1833 wurde von Dr. Franz Hlubek eine „Beschreibung der Obstsorten in der Zentral-Obstbauschule am ständischen Musterhofe zu Grätz“ herausgegeben. In diesem Verzeichnis sind bereits 340 Apfelsorten angeführt, so z. B. die auch heute bekannten Sorten Charlamowsky, Rother Stettiner, sowie ein Gräfensteiner welcher wohl der Gravensteiner sein dürfte oder Api der heute als Sternapi bezeichnet wird sowie eine Reihe unterschiedlichster Reinetten (HLUBEK 1833).

Durch die Jahre 1830 – 1870, also bis zur Auflassung des Musterhofes (Bauplatzvergabe), wurden 1.154.200 fertige Obstbäume und 2.400.000 Rebenstecklinge zur Abgabe gebracht. Viel zur Förderung des Obstbaues trug der Unterricht im Obstbau bei, den die Schullehrerkandidaten, Ackerbauzöglinge aber auch die Theologen, welche im 3. und 4. Jahrgange den landwirtschaftlichen Versuchshof besuchen mussten, erhielten (VEREINSLEITUNG DES STEIERMÄRKISCHEN OBSTBAUVEREINES 1915, KARL et al. 1949).

Ziel dieses Musterhofes war es, durch billige Abgabe von gut gezogenen, veredelten Bäumen an die Landwirte für möglichste Erhöhung des Baumbestandes zu sorgen. Man wollte „Alles versuchen und das Beste erhalten“. Bei allen Anpflanzungen der damaligen Zeit wurde aber leider nur wenig Wert auf Einheitlichkeit bei der Sortenauswahl gelegt. Die unterschiedlichen klimatischen und edaphischen Gegebenheiten in der Steiermark fanden keine entsprechende Berücksichtigung, wodurch an vielen Orten oft recht minderwertige Sorten zur Anpflanzung und Verbreitung kamen bzw. die Sorten aufgrund der klimatischen Einflüsse nicht die erwarteten und erwünschten Frucht- und Baumeigenschaften ausbilden konnten.

Der Bedarf an einem regional diversifizierten Sortensortiment und qualitativ hochwertigen Früchten wurde jedoch immer größer.

Nach der Eröffnung der Eisenbahn über den Semmering im Jahre 1854 erhielt Steiermark die wertvolle Verbindung mit der Reichshauptstadt Wien und von da ab begann der Handel mit Tafelobst nach Norden zusehends zu steigen.

Zudem breitete sich in den Achzigerjahren des 19. Jahrhunderts die Reblaus in den steirischen Weingebieten aus. So pflanzten viele Grundbesitzer zahlreiche Obstgärten (vorher wurde der Obstbau aus diesen Gebieten verbannt!) die ab diesem Zeitpunkt eine kräftige Stütze für die Landwirtschaft in diesen Gebieten darstellten (LANDESFACHORGANE UND OBSTBAUVEREIN FÜR MITTELSTEIERMARK IN GRAZ 1904).

Jetzt trat auch der Nachteil, vor allem die Vernachlässigung der ökologischen Ansprüche der Sorten, der zu großen Sortimenten deutlich zu Tage und in den Sechziger-, anfangs der Siebzigerjahre des 19. Jahrhunderts wurden deshalb die ersten ernsthaften Versuche gemacht, einheitliche Sortimente mit möglicher Einschränkung der Sortenzahlen aufzustellen. Mit dieser nicht leichten Aufgabe befassten sich u. a. der k. k. Steiermärkische Gartenbauverein in Graz, die im Jahre 1872 errichtete Landesobst- und Weinbauschule in Marburg, die Landes-Ackerbauschule in Grottenhof bei Graz, der im Jahre 1880 gegründete k. k. Österreichische Pomologenverein (Obmann: Heinrich Graf Attems-Petzenstein 1834 – 1909) und der Obstbauverein für Mittelsteiermark in Graz (LANDESFACHORGANE UND OBSTBAUVEREIN FÜR MITTELSTEIERMARK IN GRAZ 1904).

Um der steigenden Bedeutung des Obstbaues in der Steiermark Rechnung zu tragen und den gezielten Obstbau zu forcieren, wurde vom Steiermärkischen Landesausschuss am 1. Mai 1888 der erste Wanderlehrer für Obstbau (Obstgärtner Koloman Größbauer) bestellt.

1889 kam es zur Gründung des Landes-Obst- und Weinbauvereins für Steiermark (Obmann: Edgar Freiherr von Ecker-Eckhofen, Bezirksobstbauverein für Graz und Umgebung, später Obstbauverein für Mittelsteiermark, heute Landes-Obst, Wein- und Gartenbauverein für Steiermark, Verband der Landwirtschaftskammer Steiermark). Ziele dieses Vereins waren gezielte Absatzwerbung, Erprobung der einzelnen Sorten hinsichtlich ihrer Markteigenschaften bzw. ihrer industriellen Verwertung, Hebung der Ernte und die Einführung von Qualitätsbegriff- und Versandbestimmungen. Im Jahre 1899 folgte die Gründung der Landes-Obst- und Weinbaudirektion.

Diese planvolle Förderung des Obstbaues führte nicht nur zu einer enormen Zunahme des Obstbaumbestandes in der Steiermark: 1860 gab es ca. 1 Million Obstbäume, 1912 waren es bereits 6,5 Millionen (im Streuobstbau), auch die Qualität der Früchte war ausgezeichnet. So erhielt der Landes-Obst- und Weinbauverein für Steiermark im Rahmen der Pariser Weltausstellung im Jahre 1900 die goldene Medaille für das ausgestellte Apfel- und Birnensortiment. (KARL et al. 1949).

Im Jahr 1904 wurde vom Steiermärkischen Landesausschuss das „Landes-Normal-Sortiment von Äpfel und Birnen für Steiermark“ herausgegeben. Unter dem Motto: „Soll der Obstbau einträglich sein, pflanzt nur wenige aber passende Sorten ein“ wurde die Steiermark in 3 große Obstbaugebiete (vorallem nach klimatischen Gesichtspunkten: Oberland, Mittelland, Unterland) untergliedert, jedem Anbaugbiet wurden die zur Kultivierung empfohlenen

Apfelsorten zugewiesen (Tab. 1). Durch die Festlegung des Landesnormalsortiments und durch die Errichtung der Landesobstbauschulen (z. B. Marburg 1872, Gleisdorf 1900, Bruck an der Mur 1903) sollte es zu einer weiteren Förderung der Obstkultur in der Steiermark kommen. In diesen Baumschulen wurden die für die jeweiligen Böden und Lagen passenden Sorten herangezogen und nur an bäuerliche Besitzer zum Selbstkostenpreis abgegeben (STEIERMÄRKISCHER LANDES-AUSSCHUSS 1904).

Die extreme Einschränkung der Sortenzahl spiegelte sich in dem vom Steiermärkischen Landes-Ausschuss empfohlenen Sortiment wider: 25 Apfelsorten und 17 Birnensorten für die gesamte Steiermark inklusive Untersteiermark [heutige Region Štajerska in Slowenien].

Trotz der für alle Obstbaufachleute plausiblen Notwendigkeit der Einschränkung und Differenzierung des Sortenspektrums je nach Anbauregion ging die Reduktion der im „Landes-Normal-Sortiment“ aufgelisteten Apfel- und Birnenkultivare dann doch zu weit.

So wurde zur selben Zeit das „Obstgrundbuch für Steiermark“ vom Obstbauverein für Mittelsteiermark herausgegeben. In dieser „Beschreibung der für Steiermark wichtigsten Apfel- und Birnensorten“ werden 58 Apfel- und 45 Birnensorten angeführt. Die im Vergleich zur Sortenempfehlung des Steiermärkischen Landes-Ausschusses große Sortenzahl begründet der Obstbauverein wie folgt:

- Die Einschränkung auf nur einige Sorten ist aufgrund der derart unterschiedlichen klimatischen, wie auch Lage- und Boden-Verhältnisse der Steiermark unvorteilhaft. Weiters sollten nicht nur jene Sorten empfohlen werden, deren Vermehrung und Verbreitung in der Gegenwart wünschenswert ist. Im Obstgrundbuch werden nicht nur die Interessen der Obstzüchter, sondern auch die Wünsche der Konsumenten berücksichtigt. Jede Sorte hat ihre Eigentümlichkeiten hinsichtlich der Qualität; es wird von den Konsumenten verschiedenes verlangt – „der Geschmack lässt sich nicht kommandieren“ -.

Einige der vom Obstbauverein zusätzlich zum Normalsortiment empfohlene Apfelsorten (heute noch beliebt) waren z. B. der *Boikenapfel*, der *Schöne von Boskoop*, die *Coxs Orangen-Reinette*, der *Rote Herbstkalvill* und der *Steirische Passamaner* (OBSTBAUVEREIN FÜR MITTELSTEIERMARK 1904).



Die möglichste Einschränkung des Sortenspektrums auf wenige gut vermarktbare Sorten, vertreten vom Steiermärkischen Landesausschuss, und die auf die Bedürfnisse des Konsumenten und die natürlichen Gegebenheiten der Steiermark stärker Bedacht nehmende Stellung des Obstbauvereins für Mittelsteiermark lassen bereits im Jahre 1904 den grundsätzlich unterschiedlichen Zugang zum Obstbau erkennen:

Die Einschränkung der Sortenzahl auf der einen Seite und die rationelle Obstkultur durch gründliche Obstsortenkenntnis auf der anderen Seite.

### I. Für das Oberland

mit dem oberen Mur-, Enns- Palten- und Mürztale

a) zur allgemeinen Anpflanzung

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| 1. Charlamovsky                | 4. Goldgelbe Renette                   |
| <b>2. Geflammtter Kardinal</b> | <b>5. Großer Rheinischer Bohnapfel</b> |
| 3. Prinzenapfel                |  |

Mostäpfel

6. Rot gestreifter Holzapfel

b) für besondere Standorte

- |                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| 7. Danziger Kantapfel     | 10. Winter Goldparmäne      |
| 8. Gravensteiner          | <b>11. Gelber Edelapfel</b> |
| <b>9. Ribston Pepping</b> | 12. Landsberger Reinette    |

### II. Für das Mittelland

mit dem mittleren Mur-, dem Raab-, Feistritz-, Sulm- und Kainachtale

a) zur allgemeinen Anpflanzung

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1. Charlamovsky                | 5. Damason Reinette                     |
| <b>2. Geflammtter Kardinal</b> | 6. Kronrinz Rudolf                      |
| <b>3. Kanada Reinette</b>      | <b>7. Steirischer Wintermaschanzker</b> |
| <b>4. Baumanns Reinette</b>    | <b>8. Großer Rheinischer Bohnapfel</b>  |

Mostäpfel

9. Rot gestreifter Holzapfel

10. Huber'scher Mostapfel

b) für besondere Standorte

- |                              |                         |
|------------------------------|-------------------------|
| 11. Weißer Astrachan         | 14. London Pepping      |
| <b>12. Gelber Bellefleur</b> | 15. Wälschbrunner       |
| <b>13. Ananas Reinette</b>   | 16. Champagner-Reinette |

### III. Für das Unterland

mit dem unteren Mur-, dem Pösnitz-, Drau (Drava)-, Sann (Savinja)- Save (Sava)- und Sotlatale

a) zur allgemeinen Anpflanzung

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1. Charlamovsky                | 5. Damason Reinette                     |
| <b>2. Geflammtter Kardinal</b> | 6. Ribston Pepping                      |
| <b>3. Kanada Reinette</b>      | <b>7. Steirischer Wintermaschanzker</b> |
| <b>4. Baumanns Reinette</b>    | <b>8. Großer Rheinischer Bohnapfel</b>  |

Mostäpfel

9. Huber'scher Mostapfel

b) für besondere Standorte

- |                              |                         |
|------------------------------|-------------------------|
| <b>10. Gelber Bellefleur</b> | 13. London Pepping      |
| <b>11. Ananas Reinette</b>   | 14. Champagner Reinette |
| 12. Lichtenwalder Wachsapfel |                         |

Tab. 1: Zusammenstellung des Landes-Normal-Apfel-Sortiments nach der Reifezeit geordnet  
(STEIERMÄRKISCHER LANDES-AUSSCHUSS 1904)  
(die fettgedruckten Sorten sind besonders empfehlenswert)

Nach dem ersten Weltkrieg (1914 – 1918) und dem Zusammenbruch der Österreich-Ungarischen Monarchie verlor die Steiermark auch sein Unterland (ehemalige Untersteiermark, heutige Region Štajerska in Slowenien) und damit ein wichtiges Obstbaugebiet.

Zu Beginn des 20. Jhd. gab es in den meisten mitteleuropäischen Staaten noch den bäuerlichen Erwerbsobstbau auf Basis von Hochstammobstbäumen. Teils vor dem zweiten Weltkrieg, meist jedoch bald danach stellte man auf Niederstammanlagen und Obsthecken um. Gleichzeitig vollzog sich ein Sortenwandel u. a. hin zu Golden Delicious (Zufallssämling USA 1890), Jonathan (Sämling USA 1826), Glockenapfel (Zufallssämling Schweiz), Cox Orange (Sämling aus England 1825), Freiherr von Berlepsch (Züchtung 1880 in Deutschland aus AnanasreINETTE x Ribston Pepping). Die immer stärker werdende Intensivierung der Landwirtschaft hinsichtlich der wachsenden Ansprüche bezüglich kommerziell ertragreicher Fruchtqualitäten („perfekte Früchte“) aufgrund einheitlicher Vermarktungs- und Bewirtschaftungsstrategien führte zu einer noch stärkeren Einschränkung des Sortenspektrums bis hin zu den heute am Markt befindlichen Sorten (KEPPEL et al. 1998, BERNKOPF 2005/b, WIKIPEDIA 2007/b). Diese Entwicklung führte zu einem Verlust der vormals für jedes Land und jede Region charakteristischen Sortenverteilung (JANICK et al. 1996) und zu einer starken Reduktion der traditionellen und ökologisch relevanten Kulturlandschaft Streuobstwiese.

Allerdings spielt auch heute die Kultivierung von Kernobstsorten in Form von extensiv genutzten Streuobstwiesen und Hausgärten in Österreich noch eine große Rolle, wie das Folgende veranschaulicht.

Die Abbildung 5 zeigt, nach Angaben der STATISTIK AUSTRIA 2008, die Zusammensetzung der gesamten Kernobsternte für das Jahr 2006 in Österreich (Rundungsdifferenzen technisch bedingt [STATISTIK AUSTRIA 2008]).

So machen von der gesamten Kernobsternte 37 % Äpfel und 7 % Birnen aus extensiver Bewirtschaftung aus, was die jeweiligen prozentuellen Anteile der im Intensivobstbau kultivierten Kernobstsorten klar übersteigt (Apfel: 29 %, Birne: 1 %). Dies spiegelt auch die gegenwärtige wirtschaftliche Bedeutung des Streuobstwiesen- und Hausgartenobstbaus wider.

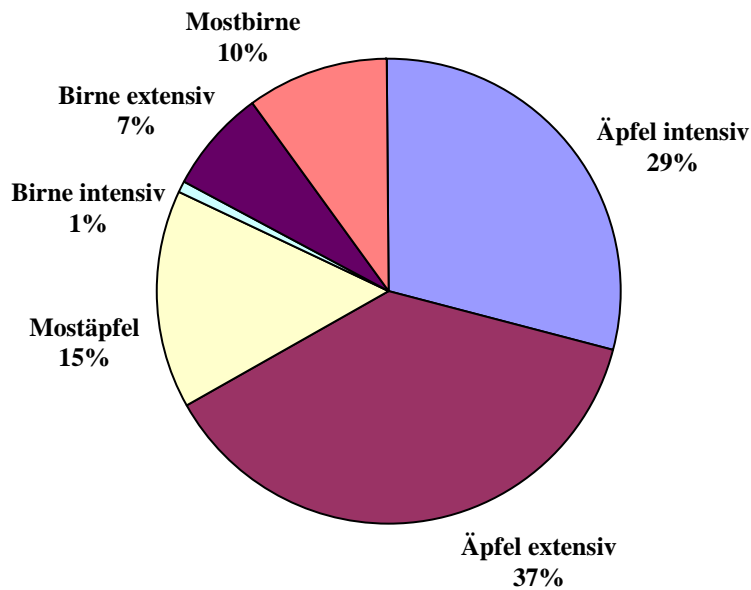


Abb. 5: Prozentuelle Zusammensetzung der Kernobsternte 2006 in Österreich  
(STATISTIK AUSTRIA 2008)

Die Aufklärung der Identität mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse und damit die Möglichkeit der Ergreifung gezielter Schutzmaßnahmen der, diese extensiv bewirtschafteten Flächen zusammensetzenden Kernobstvarietäten, stellt das primäre Ziel dieser Arbeit dar.

Die Geschichte des Obstbaues umspannt einen Zeitraum von der Entwicklung des europäischen Kulturapfels (*Malus x domestica* BORKH.) und der Kulturbirne (*Pyrus communis* L.), über die Entstehung und Kultivierung einer reichen, geographisch heterogenen Sortenvielfalt in der Zeit des späten 18. Jhd. bis in das frühe 20. Jhd. hin zu einem sehr vereinheitlichten und internationalisierten Sortiment der Gegenwart.

Die Feststellung der rezenten Diversität alter Apfel- und Birnensorten wird nicht nur mit der legitimen Absicht der dokumentierten Erhaltung genetischer Vielfalt und der Pflege des Lebensraum Streuobstwiese, sondern auch mit wirtschaftlichen Interessen begründet.

### 1.3 Beurteilung der gegenwärtigen Sortenvielfalt

Streuobstwiesen setzen sich in der Steiermark und der ehemaligen Untersteiermark (Štajerska) hauptsächlich aus *Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L. Varietäten zusammen, wobei der Apfel die wesentlich größere Bedeutung einnimmt.

Die gegenwärtige Diversität an diesen alten Apfel- und Birnenkultivaren wird durch zwei wesentliche Faktoren bedingt.

Einerseits ist die kultur- und naturhistorische Entwicklung des Streuobstbaues am südöstlichen Alpenrand für den prinzipiellen Aufbau und die Erweiterung aber natürlich auch für die momentane Einschränkung des Sortenspektrums verantwortlich.

Andererseits ermöglichte die klimatische und edaphische Heterogenität des Untersuchungsgebietes die Entwicklung einer kleinräumigen und an verschiedenste ökologische Gegebenheiten optimal angepassten Kultivarvielfalt, die heute sowohl von ökologischem wie wirtschaftlichem Interesse ist.

Diese beiden großen Einflussfaktoren lassen eine nach wie vor außergewöhnlich hohe Diversität an alten Kernobstsorten erwarten.

Die Bestimmung alter heimischer Apfel- und Birnenvarietäten und damit die Bewertung der genetischen Diversität ist in vielerlei Hinsicht eine große Herausforderung. Es verlangt sowohl die Auseinandersetzung mit der Geschichte, die Einbeziehung der ökologischen Besonderheiten und kleinklimatischen Gegensätze der betreffenden Region, wie auch pomologische Kenntnisse. Die Notwendigkeit der Anwendung zeitgemäßer, genetischer und daher von äußeren abiotischen und biotischen Einflüssen unabhängiger Sortencharakterisierungsmethoden ergibt sich aus der bereits beschriebenen Normwidrigkeit der Kultivare hinsichtlich ihrer obstkundlichen Bestimmungsmerkmale.

Die unterschiedlichen Anbauregionen bedingen eine breite Variabilität der Früchte ein und derselben Varietät hinsichtlich ihrer Veränderlichkeit innerhalb der pomologischen Sortencharaktere und damit, neben der ohnehin großen Vielfalt an lokal verbreiteten Varietäten, eine kontroverielle Auseinandersetzung hinsichtlich pomologisch korrekter Sortenbezeichnungen (als ursprünglich anzusehende Züchtungsnamen) der in der Steiermark und Teilen Sloweniens aufgefundenen Kultivare.

Wie bereits eingangs dargelegt, sind viele, früher korrekt verwendete Sortenbezeichnungen in Vergessenheit geraten und durch Namen, die auf Verwendungszweck, Fruchteigenschaften oder Reifezeitpunkt schließen lassen, ersetzt worden.

Um den jeweiligen Früchten die ihnen entsprechenden und als ursprünglich anzusehenden Sortennamen zuzuordnen, ist es nun notwendig, sich mit pomologischer Bestimmungsliteratur aus unterschiedlichen Epochen zu beschäftigen.

In jüngster Zeit sind einige Bücher aufgelegt worden, die sich mit alten Kernobstsorten beschäftigen und teilweise recht instruktive Abbildungen und Beschreibungen aufweisen. Diese Bücher zeigen jedoch einen sehr stark regionalen Bezug (regional charakteristische Verteilung alter Sorten [JANICK et al. 1996]) und sind aus diesem Grund nur eingeschränkt landeseinheitlich anwendbar. Als sehr brauchbar für die pomologische Sortenbestimmung in der Steiermark und Teilen Sloweniens haben sich die Werke BERNKOPF et al. 1996, SORTENMAPPE 2000, HARTMANN 2003 und GRILL & KEPPEL 2005 erwiesen.

Bei der Beschäftigung mit alten Sorten ist es aber aufgrund der natur- und kulturhistorischen Entwicklung der Diversität auch notwendig, sich mit zum Teil sehr alter pomologischer Literatur auseinanderzusetzen, wobei hier einige Werke beispielhaft angeführt werden; z. B. DIEL 1799 – 1832, JAHN et al. 1865, OBERDIECK 1881, LAUCHE 1882, ANBAUWÜRDIGE OBSTSORTEN 1907, LÖSCHNIG et al. 1912, UNSERE BESTEN DEUTSCHEN OBSTSORTEN 1920, BÖTTNER 1923, NACH DER ARBEIT 1938 - 1950, DUHAN 1957, KRÜMMEL et al. 1964, VOTTELER 1986.

Diese historischen Pomologien enthalten Sorteninformationen, die entscheidende Hinweise auf charakteristische Fruchtmerkmale geben und so die Bestimmung und eindeutige Benennung alter Sorten erst ermöglichen. Allerdings sind nicht alle Informationen, trotz ihrer teils aufwändigen und liebevoll detaillierten Darstellungen in diesen Werken, zur Charakterisierung unbekannter Aufsammlungen alter Kernobstsorten von Nutzen. So schreibt OBERDIECK 1881 in „Deutschlands beste Obstsorten“ über das Fruchtfleisch des *Gelben Edelapfels*: „Fleisch gelblich weiß, fein, saftreich, von delicatem, gezuckertem Weingeschmacke, dem des Weißen Winter-Calvills ähnlich, aber süßer und lieblicher, *wie ein in meiner Gegend gewachsener Wintercalvill*“ (MONSCHEIN et al. 2005). Außerdem hat sich das Erscheinungsbild der Früchte im Laufe der Zeit aufgrund sich ändernder Klimate und Bewirtschaftungsformen verändert, was wiederum den zielführenden Vergleich gegenwärtig

aufgefundener Früchte mit historischen Abbildungen erschwert (KEPPEL 1989, BERNKOPF et al. 1996).

Die traditionellen pomologischen Methoden zur Sortenbestimmung, wie die Beschreibung morphologischer Ausprägungen von Früchten und Bäumen, die Messung physiologischer Parameter bzw. die Untersuchung biochemischer Charakteristika sind meist sehr zeitaufwendig und nicht immer zielführend (KENIS et al. 2001).

Unterschiede in den angeführten Charakteren reflektieren zwar grundsätzlich Verschiedenheiten im Genom der untersuchten Sorten, nicht zu vergessen ist aber die molekulare bzw. physiologische Variationsmöglichkeit der Kultivare hinsichtlich ihrer Eigenschaften, aufgrund unterschiedlichster natürlicher und anthropogen bedingter Umwelteinflüsse, innerhalb einer gewissen genetischen Bandbreite. Bezüglich der Veränderlichkeit hinsichtlich ihrer phänotypischen Merkmale lassen sich Sorten mit breiter Variabilität (z. B. *Baumanns Renette*) von solchen mit relativ konstanten Merkmalen unterscheiden (z. B. *Gelber Bellefleur*) (phänotypische Varianz, GABER 1994).

Zusätzlich zu dieser bereits im Kapitel 1.1 dargestellten phänotypischen Varianz der Fruchtausformung aufgrund umweltbedingter (natürlicher und anthropogener) Einflussfaktoren stellt die genotypische Varianz eine gewisse Herausforderung an den Pomologen. So ist nach GABER 1994 zwischen Zufallssämlingen, so genannten Populationssorten und spontan auftretenden Sprossmutationen (sog. Sports) zu unterscheiden.

Zufallssämlinge, zufällige Kreuzungsprodukte zweier unterschiedlicher Sorten (Selbstunfruchtbarkeit von Apfelsorten, BROOThAERTS 2003, PIEBER 2007), können sich mehr oder minder von den genetischen Vorfahren unterscheiden und werden aufgrund der für den jeweiligen Nutzer (Landwirt, Gartenbesitzer) günstigen Fruchteigenschaften weiterkultiviert (GABER 1994). Viele der heute bekannten Apfelsorten stellen solche Zufallssämlinge dar. Nach KEPPEL et al. 1998 und HARTMANN 2003 wären das z. B.: *Großer Rheinischer Bohnapfel*, *Goldrenette von Blenheim*, *Schöner von Boskoop*, *Geflammtter Kardinal* oder *Kronprinz Rudolf* (um 1860 aus der Steiermark), aber auch die heute wohl wirtschaftlich bedeutendste Apfelsorte *Golden Delicious* (USA).

Populationssorten sind Varietäten unterschiedlicher genetischer Konstitution und Herkunft, weisen aber sehr ähnliche Fruchteigenschaften auf (GABER 1994), wie z. B. die Gruppe der Brünnerlinge, die sich nach LÖSCHNIG et al. 1912 aus folgenden Sorten zusammensetzt:

*Kleiner Brünlerling, Oberösterreichischer Brünlerling, Böhmischer Brünlerling, Oberösterreichischer Passamaner und Welsch-Brunner*. Die weitgehende Übereinstimmung dieser Sorten in ihren morphologischen Charakteren gibt immer wieder Anlass für pomologische Kontroversen.

In Obstanlagen bzw. auf verschiedenen Obstbäumen werden vereinzelt Früchte entdeckt, die sich in Form, Farbe oder Geschmack von den am selben Baum befindlichen Früchten unterscheiden. Diese Erscheinung nennt man „Spontan auftretende Sprossmutation“ oder Sports und ist auf somatische (nicht die Keimzellen betreffende) Mutationen im Knospenbereich zurückzuführen. Werden diese Zweige bzw. Knospen, die die jeweilige Mutation aufweisen, vegetativ vermehrt (veredelt), so führt dies meist zu einer neuen Varietät. Ein Vorteil der Vermehrung solcher Sports liegt vor allem darin, dass sie sich häufig nur in einem phänotypischen Charakter von den Vorfahren unterscheiden, all die anderen wünschenswerten Sorteneigenschaften der „Eltern“ bleiben erhalten. So gibt es z. B. den *Roten Boskoop* als rote Farbmutante des *Schönen von Boskoop*, die Kultivare *Royal Gala* und *Galaxy* als Knospenmutanten mit stärker ausgeprägter Deckfarbe als deren Wildtyp *Gala* (*Kidds Orange x Golden Delicious*) (GABER 1994, KEPPEL et al. 1998).

Zudem tritt in traditionell bewirtschafteten Streuobstwiesen immer wieder das Phänomen von durchgewachsenen Unterlagen auf. Werden Obstbäume durch umweltbedingte Einflüsse (z. B. Blitzschlag oder Sturm) so stark geschädigt, dass die veredelte Kultursorte abstirbt, kann es zu einem Durchwachsen der Unterlage kommen, die daraufhin die gesamte neue Baumkrone samt Früchten bildet. Da aber gerade in Streuobstwiesen meist starkwüchsige Sämlingsunterlagen (Kreuzungsprodukte zufälliger Befruchtungspartner unterschiedlicher Sorten, Zufallssämlinge) Verwendung finden, können die Früchte dieser neu gebildeten Bäume keinen bereits beschriebenen Sorten zugewiesen werden, da es sich ja eigentlich um neue Varietäten handelt, die aufgrund ihrer Fruchteigenschaften weiterkultiviert werden.

Sortencharakterisierung mit Hilfe klassischer Methoden führt aufgrund der regional spezifischen Sortenverteilung dank kleinklimatischer Besonderheiten der Anbaugebiete, der Variabilität der Früchte ein und derselben Sorte hinsichtlich ihrer pomologischen Charaktere infolge biotischer und abiotischer Umwelteinflüsse, sowie des Vorkommens genotypischer Varianten und so genannter durchgewachsenen Unterlagen oft nicht zum gewünschten Erfolg.



Um das Methodenspektrum zur Sortenbestimmung zu ergänzen, wurden Iso- bzw. Alloenzymmuster in die Beurteilung der Diversität bezüglich *Malus x domestica* BORKH. Varietäten mit aufgenommen (ITOIZ & ROYO 2003, ROYO & ITOIZ 2004). Das Vorhandensein von Isoenzymen unterliegt naturgemäß der Genexpression, welche zwischen unterschiedlichen Geweben, in verschiedenen Entwicklungsstadien und durch diverse Umwelteinflüssen in ihrer Ausprägung variieren kann (GOULÃO et al. 2001). Deshalb ermöglicht auch diese Methode keine von äußeren Einflüssen unabhängige Sortencharakterisierung.

Die effiziente Untersuchung und Konservierung ökologisch angepasster Kernobstvarietäten erfordert jedoch in erster Linie die exakte Feststellung des Ausmaßes der gegenwärtigen Diversität. Diese Informationen ermöglichen ein optimales Ressourcenmanagement (HODGKIN et al. 2001) unter dem Aspekt der „Integrierten Genbank“.

Darunter versteht man die gezielte Sortenaufsammlung sowie die Analyse qualitativer wie quantitativer Frucht- und Baumeigenschaften unter Berücksichtigung und Kombination der Methoden der Molekularbiologie und Biodiversitätsforschung mit den klassischen Techniken der *ex situ* Kultivierung sowie die standortgerechte Wiederauspflanzung sortenreiner Kernobstbäume (HAMMER 2003).

Um die Vielfalt alter Apfel- und Birnensorten feststellen zu können benötigt man also ein Verfahren, welches eine Charakterisierung der Varietäten unabhängig der Variabilität ihrer Fruchtausformungen gewährleistet. Heute bedient man sich daher häufig genetischer Charakterisierungsmethoden.

Grundvoraussetzung für genetische Untersuchungen war wohl die Entdeckung der folgenden Methode.

Im Jahr 1985 wurde von Karl B. Mullis eine Labortechnik entwickelt, mit deren Hilfe eine *In-vitro*-Vervielfältigung von DNA (Desoxyribonukleinsäure) möglich wurde. Diese Technik ist heute als Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) bekannt. Für diese Entdeckung erhielt er 1993 den Nobelpreis für Chemie.

Die PCR ist eine Methode, die es ermöglicht, definierte Abschnitte der DNA mit hoher Spezifität *in vitro* enzymatisch zu vervielfältigen. Dies wird über sich wiederholende, automatisierbare thermische Zyklen erreicht, bei denen sich die Anzahl der DNA-Kopien mit

jeder Runde verdoppelt (z. B. ergeben 30 Zyklen theoretisch ca. 1 Milliarde Kopien des erwünschten DNA-Abschnittes) (MERTES et al. 1997).

Die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) und die damit verbundene Etablierung genetischer Untersuchungsmethoden auf unterschiedlichsten Gebieten führten auch zu einer Progression bezüglich der direkt das Erbgut betreffenden Analysemethoden zur Sortendifferenzierung.

Untersuchungen mit Hilfe der RAPD- (randomly amplified polymorphic DNA, KOLLER et al. 1993), der AFLP- (amplified fragment length polymorphism, GOULÃO et al. 2001) oder der SSR- (simple sequence repeat, GUILFORD et al. 1997, GIANFRANCESCHI et al. 1998, HOKANSON et al. 1998, VORNAM & GEBHARDT 2000, GOULÃO & OLIVEIRA 2001, HOKANSON et al. 2001, KENIS et al. 2001, LIEBHARD et al. 2002) Analyse ermöglichen die objektive Zuordnung und Beschreibung der Sorten auf Basis der DNA (HOKANSON et al. 1998) als Charakteristikum unabhängig von Umwelteinflüssen (HODGKIN et al. 2001, FORTE et al. 2002).

Die *in situ* Erhaltung und eine *ex situ* Konservierung von vom Aussterben bedrohten, genetisch bestimmten, lokalen Kernobstvarietäten ermöglicht die optimale Sicherung dieses umfassenden genetischen Potentials. Diese beiden Erhaltungsstrategien sind nicht als konkurrierende sondern sich ergänzende Maßnahmen anzusehen. So unterliegen die Obstgehölze in Genbanken ständiger fachmännischer Kontrolle sowie kundiger Pflege. Ziel dieser kontrollierten Aufsammlungen muss es jedoch sein, sortenreine Kultivare an interessierte Laien und Obstbauern abzugeben und damit für die Wiederverbreitung dieser Varietäten zu sorgen (BERNKOPF 2000).

Eine genetisch charakterisierte Sortenaufsammlung bedeutet aber auch die Bereitstellung verlässlich bestimmten Materials für künftige Untersuchungen bislang noch nicht ausreichend erforschter und erkannter Frucht- und Baumeigenschaften (MONSCHEIN et al. 2004, MONSCHEIN et al. 2006).

Die Beurteilung der gegenwärtigen Sortenvielfalt mit Hilfe genetischer Methoden sowie die Einbeziehung der äußeren und inneren Fruchtmerkmale, der organoleptischen Eindrücke sowie der ökologischen Amplitude der jeweiligen Varietät stellt die Basis für ein nachhaltiges Management der Kulturlandschaft Streuobstwiese mit seinen alten Kernobstsorten dar.

Um die methodische Voraussetzung einer von äußeren Einflussfaktoren unabhängigen Kernobstsortencharakterisierung in der Steiermark und Štajerska zu erfüllen, wurde von uns das genetische Verfahren der Mikrosatellitenanalyse angewandt.

Mikrosatelliten (simple sequence repeats, SSR) sind kurze Bereiche der DNA (Desoxyribonukleinsäure), die aus sich hintereinander wiederholenden Nukleotideinheiten (1 – 6 Nukleotide lang, repeat units) bestehen. Der polymorphe Charakter der Mikrosatelliten kommt aufgrund der unterschiedlich häufigen Wiederholung dieser Nukleotideinheiten zustande, was zu den, die jeweils untersuchten Kultivare charakterisierenden Mikrosatellitenlängen führt (GIANFRANCESCHI et al. 1998).

Um die spezifischen Längenunterschiede der jeweiligen Mikrosatelliten auch detektieren zu können, bedient man sich einer von WEBER & MAY 1989 entwickelten allgemeinen Methode zum SSR-Nachweis mit Hilfe eines spezifischen, Mikrosatelliten flankierenden Primerpaares und der Polymerasekettenreaktion. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich ausgewählte Mikrosatellitenloci in großer Zahl vervielfältigen und entsprechend ihrer Längen analysieren (GIANFRANCESCHI et al. 1998).

Mikrosatelliten zeigen gegenüber anderen DNA-Markern verschiedenste Vorteile. Sie sind meist in großer Zahl gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt, hypervariabel, codominant, reproduzierbar, SSR-Analysen sind PCR basierend, daher benötigt man nur geringe DNA-Ausgangskonzentrationen. Außerdem ermöglicht die spezifische Amplifikation eines jeden Locus aufgrund des ihn charakterisierenden Primerpaares den relativ einfachen Austausch von Informationen, den sortencharakteristischen Mikrosatellitenlängen, zwischen unterschiedlichen Labors (GUILFORD et al. 1997, GIANFRANCESCHI et al. 1998).

Die große Anzahl unterschiedlichster Längen ein und desselben SSR-Locus ergibt sich durch das Auftreten der sog. „replication slippage“ bzw. „*Taq*-polymerase slippage“. Darunter versteht man die Trennung des gerade in Replikation befindlichen DNA-Stranges von der DNA-Matrize mit nachfolgender falsch ausgerichteter Wiedervereinigung der beiden DNA-Stränge. Die erneut einsetzende Replikation führt schließlich zu einer Insertion oder Deletion von den sich wiederholenden Nukleotideinheiten und demgemäß, im Vergleich zur DNA-Matrize, zu einer Verlängerung oder Verkürzung des jeweiligen Mikrosatellitenlocus (ELLEGREN 2004).

Die Mutationsrate von Mikrosatelliten wird nach SCHLÖTTERER 2000 durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Dies wären z. B. die Anzahl der repeat-Einheiten (Mikrosatellitenlänge), die Sequenz und die Länge der repeat-Einheiten, die die Mikrosatelliten flankierenden Sequenzen, Unterbrechungen in den Mikrosatellitensequenzen sowie Rekombinations- und Transkriptionsraten.

Mikrosatelliten eignen sich also aufgrund ihrer oben beschriebenen polymorphen Charakteristika hervorragend für Diversitätsstudien auf genetischem Niveau.

Worin liegt die funktionelle Bedeutung der Mikrosatelliten für den jeweiligen Organismus?

Man findet sie in der Beeinflussung der Genexpression der Zellen, also der Manifestierung der genetischen Information, des Genotyps, in Form des Phänotyps.

So zeigen Mikrosatelliten vor allem auf den Vorgang der Transkription, also der Überschreibung der genetischen Information von DNA auf RNA Auswirkungen.

SSRs werden in einer Reihe von Promoter-Regionen gefunden. Diese Promoterregionen sind den RNA-codierenden Bereichen der DNA vorgelagert und dienen der Bindung transkriptionsregulatorischer Proteine, sog. Transkriptionsfaktoren.

Mikrosatelliten als Bestandteile dieser Regionen können nun solche Transkriptionsfaktoren binden, die Genexpression fördern und damit die Ausbildung des Phänotyps beeinflussen.

Interessant ist aber auch, dass neben dieser grundsätzlichen Fähigkeit der Bindung von Transkriptionsfaktoren durch Mikrosatelliten und damit der Beeinflussung der Genexpression auch die Mikrosatellitenlänge, also die Anzahl der repeat-units die Bindung von Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen scheint (KASHI & SOLLER 1999).

So stellt die Anzahl der sich wiederholenden Nukleotideinheiten nicht nur ein Sortencharakteristikum dar, sondern kann direkt die Ausbildung des Phänotyps beeinflussen.

Zusätzlich haben Studien an *Arabidopsis* und *Reis* gezeigt, dass SSRs in großer Dichte in 5'-UTRs (untranslated regions) vorkommen (FUJIMORI et al. 2003), was wiederum auf deren regulatorische Wirkung der Realisierung genetischer Information hindeutet.

Die Kombination aus Hypervariabilität der Mikrosatelliten hinsichtlich ihrer Fragmentlängen und ihre Funktion als Regulatorelement bei der Genexpression unterstützen die Hypothese der Bedeutung und des Einflusses dieser DNA-Bereiche auf die Ausbildung des Phänotyps, auf

die quantitativ genetische Variationsmöglichkeit hinsichtlich Entwicklung und Physiologie und dadurch nicht zuletzt auch auf die Fähigkeit der Besiedelung unterschiedlichster ökologischer Lebensräume (KASHI et al. 1997, KASHI & SOLLER 1999), gerade wie es bei alten Apfel- und Birnensorten in der Steiermark beobachtet werden kann.

So stellt die Mikrosatellitenanalyse auf dem Gebiet der Feststellung und letztendlich auch des Schutzes der biologischen Vielfalt die Methode der Wahl dar (SHINDE et al. 2003).

## 1.4 Frage- und Aufgabenstellung

Die natur- und kulturhistorisch gewachsene und aufgrund der ökologischen Heterogenität des Untersuchungsgebietes bedingte Vielfalt alter *Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L. Kultivare in der Steiermark und Štajerska sind aufgrund unterschiedlichster Rationalisierungsmaßnahmen in der Landwirtschaft, Überalterung der Streuobstbestände und durch die Einschleppung und Verbreitung verschiedenster Krankheiten (z. B. Feuerbrand *Erwinia amylovora* (BURILL) WINSLOW et al.) vom Aussterben bedroht (ÖSTAT 2001).

Grundvoraussetzung für gezielte Schutzmaßnahmen dieses weder ausreichend erkannten noch gezielt untersuchten genetischen Potentials muss die Feststellung des gegenwärtigen Ausmaßes der Kernobstdiversität darstellen (MONSCHEIN et al. 2004, MONSCHEIN et al. 2006).

Aber gerade die Untersuchung und Bestimmung alter Kernobstsorten hinsichtlich ihrer Identität stellt, wie bereits ausgeführt, eine große Herausforderung dar.

Bisher verwendete pomologische Charakterisierungsmethoden und die Messung physiologischer Parameter sowie die Untersuchung biochemischer Charakteristika führen oft hinsichtlich der Zuordnung unbekannter bzw. missverständlich bezeichneter Varietäten zu korrekten pomologischen Sortenbezeichnungen zu keinem befriedigenden Ergebnis (KENIS et al. 2001).

Für die Bearbeitung des Themas der „Genetischen Diversität alter Kernobstsorten in der Steiermark und Teilen Sloweniens“ wurde, aufgrund der in Kapitel 1.3 dargestellten Grundlagen, die Mikrosatellitenanalyse als genetische Charakterisierungsmethode angewandt.

Vor dem Hintergrund der Bewertung der „Genetischen Diversität alter Apfel- und Birnensorten in der Steiermark und Teilen Sloweniens“ ergaben sich folgende Frage- bzw. Aufgabenstellungen:

- Sind alte, kleinräumig verteilte und ökologisch optimal angepasste Apfel- und Birnensorten mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode genetisch voneinander zu unterscheiden?

- Wieviele Mikrosatellitenloci sind zur generellen Diversitätsabschätzung alter Kernobstsorten im Untersuchungsgebiet notwendig?
- Ist es möglich, unbekannte bzw. mit lokalen Namensgebungen versehene Kernobstsorten über deren Mikrosatellitenlängen zu bestimmen?
- Wo liegen die Grenzen dieser genetischen Sortencharakterisierungsmethode?
- Wie groß ist das noch vorhandene Sortenspektrum im Untersuchungsgebiet?
- Sind die in unterschiedlichen Forschungslabors generierten Mikrosatellitendaten miteinander vergleichbar?
- Welche praktisch relevanten Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit?

## 2. Material und Methoden

Die Beurteilung der derzeit bestehenden genetischen Diversität alter Apfel - und Birnensorten (*Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L.) in der Steiermark und Teilen Sloweniens stellt die Grundvoraussetzung für effiziente Schutz- und Konservierungsmaßnahmen dieser ökologisch, kulturhistorisch und ökonomisch bedeutenden Kernobstvarietäten dar.

Im Folgenden wird der methodische Zugang dieser Diversitätsstudie von der primären Erhebung alter Kernobstsorten bis hin zur genetischen Analyse der Varietäten mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse dargestellt.



## 2.1 Erhebungen der Streuobstbestände in der Steiermark

Um einen grundsätzlichen Überblick über die die Streuobstwiesen zusammensetzenden Kernobstsorten zu erlangen, war es notwendig, standardisierte Fragebögen (Abb. 6) an steirischen Volks- und Hauptschulen wie an landwirtschaftlichen Fachschulen mehrmals zu verteilen. Über die Schüler wurde die in der Landwirtschaft tätige bzw. über Hausgärten verfügende Bevölkerung erreicht und somit jene, die potentiell Streuobstbau betreiben bzw. alte Kernobstsorten kultivieren können. Weiters wurden ständig, während der laufenden Erhebungen, Frage- bzw. Erhebungsbögen an interessierte Personen weitergegeben.

Dadurch erreichte die primären Erhebung alter Obstsorten sowohl eine breite geographische Streuung (MONSCHEIN et al. 2004) wie auch die Berücksichtigung unterschiedlichster Kultivierungsphilosophien, vom Erwerbsobstbauern bis hin zum privaten Obstliebhaber mit ihrem von ihnen bevorzugten Sortensortiment.

Erhoben wurden folgende Parameter: Name und Anschrift des Besitzers, Seehöhe, Hangneigung, Ausrichtung (Exposition) am Hang, vorhandene Obstart und Sortenname, Baumzahl, Alter der Bäume, Ertrag, Erntereife, Lagerfähigkeit, besondere Merkmale (z. B. Anfälligkeiten oder Resistenzen gegenüber Schädlingen und Erkrankungen) und die Verwendung des Obstes am jeweiligen Standort.

Dieser Fragebogen wurde in seinen Grundzügen von Herrn Ing. HERIGAR STROHHÄUSL (Landwirtschaftliche Fachschule in Kobenz, A-8720 Knittelfeld) zusammengestellt, für die kleinräumige Erhebung von Streuobstbeständen im Bezirk Murau (KEPPEL et al. 2002) erstmals erprobt und von der Arbeitsgruppe Kernobst am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz schließlich modifiziert und erweitert.

Obstbaumumfrage - Projekt zum Erhalt alter Kernobstsorten								
©Institut für Pflanzenwissenschaften; Schubertstrasse 51, 8010 Graz;								
Name:		Anschrift:			Tel:	Seehöhe:	Hangneigung	Ausrichtung am Hang:
Vulgo:		PLZ/ Ort:						
Obstart:	Sortenname (auch Lokalname, Hausbezeichnung)	Baum: Anzahl	Alter: Schätzung	Ertrag: gut/mittel/wen	Erntereife: z.B.: Anfang	Lagerfähigkeit: z.B.: bis Ende	Besondere Merkmale/Eigenschaften:	Verwendung: Tafelobst,
Apfel,								

Abb. 6: Erhebungsbogen

Mit Hilfe des über die Fragebögen erhobenen Sortenspektrums erfolgte die Einteilung der Steiermark in 10 Kerngebiete.

Diese stellen eine geographische Zusammenfassung der in den Erhebungen genannten Hauptapfel- und Birnensorten einer Region dar, bzw. wurde dadurch die gegenseitige Abgrenzung der jeweiligen Kerngebiete aufgrund deren „Spezial-Varietäten“ erreicht.

Diese Einteilung erfolgte, wie bereits dargelegt, aufgrund der in den Erhebungsbögen gemachten Angaben bezüglich „Sortenbezeichnung“, wobei es sich bei diesen Übermittlungen natürlich häufig um synonyme bzw. lokale Sortennamen handelte (siehe Kapitel 1.1). Die Definition von Kerngebieten war aber für die Codierung des Probenmaterials (Kapitel 2.3) und für die Übersichtlichkeit bezüglich geographischer Herkunft der Aufsammlungen von Nöten.

Je nach Größe des Kerngebietes wurde die Anzahl der Beprobungspunkte (Landwirtschaftliche Betriebe, Hausgärten) festgelegt (Tab. 2).

Die Definition der Kerngebiete wie auch der Anzahl der Beprobungspunkte pro Kerngebiet erfolgte unter Absprache mit Frau Mag. Melanie Hofer und innerhalb der Arbeitsgruppe Kernobst am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz.

<b>Kerngebiete</b>	<b>Anzahl der Beprobungspunkte</b>
1. St. Stefan ob Stainz	4
2. Eibiswald	5
3. Straden	7
4. Feldbach	7
5. Pöllau	9
6. Rein	7
7. Gröbming	6
8. Knittelfeld	7
9. Murau	8
10. St. Marein im Mürztal	8

Tab. 2: Kerngebiete der Steiermark

## 2.2 Erhebungen der Streuobstbestände in Slowenien

Aufgrund der kultur- und naturhistorischen Gemeinsamkeiten der Steiermark mit der Region Štajerska in Slowenien (ehemaligen Untersteiermark), wurde auch dieses obstbaugeschichtlich überaus interessante Gebiet (siehe Kapitel 1.2) in die Diversitätsstudie mit einbezogen.

Die Auswahl der Beprobungspunkte in Slowenien wurde durch das Kriterium „Hohe zu erwartende Sortenvielfalt“ bestimmt. Sie erfolgte aufgrund der regionalen Erfahrung und fachlichen Kenntnisse von Mag. DI Peter Zadrazec (KGZS-KGZM Sadjarski Center, Maribor-Gačnik, Slowenien) in Zusammenarbeit mit dem örtlichen landwirtschaftlichen Beratungsdienst.

In Slowenien gibt es, neben den kulturlandschaftsbildenden Streuobstwiesen, ca. 10 vom „Agricultural Institute of Slovenia“ (Hacquetova 17 SI-1000 Ljubljana Slovenia) koordinierte Sortengärten mit alten Apfel- und Birnensorten.

Die Kultivierung dieser Sorten erfolgt meist in Form eines typischen Obstgartens, also als Streuobstwiese mit extensivem Nutzungscharakter. In manchen Fällen werden die alten Sorten jedoch auf schwachwüchsigen Unterlagen veredelt, um so möglichst platzsparend eine große Diversität bewahren zu können. Zur Zeit werden ungefähr 300 – 320 verschiedene Varietäten in diesen dokumentierten Sortengärten vermutet, aber auch hier stellt die genaue Bestimmung der Aufsammlungen aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Problematik der pomologischen Charakterisierung alter Kernobstvarietäten eine große Herausforderung dar und so ist anzunehmen, dass viele der kultivierten und dokumentierten Varietäten nur unterschiedliche synonyme Bezeichnungen ein und derselben Sorte darstellen. Außerdem stammen der Großteil dieser Aufsammlung aus dem Ausland und sind deshalb nicht als typisch slowenische Kultivarzusammenstellungen anzusehen (IVANCIC et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Slowenien 8 solcher Sortengärten besucht und beprobt, die auch gleichzeitig als Kerngebiete definiert wurden. Der Schwerpunkt lag natürlich in der Beprobung der ehemaligen Untersteiermark (Štajerska), allerdings wurden daneben auch benachbarte Sortengärten in Oberkrain (Gorenjska) und einer in Unterkärnten (Koroška) in die Diversitätsstudie miteinbezogen (Tab. 3).

Kerngebiete		Anzahl der Beprobungspunkte
1. Velenje	} Štajerska (Untersteiermark)	1
2. Šmartno		1
3. Jareninski		1
4. Podsreda		1
5. Pleterje		
6. Tržič	} Gorenjska (Oberkrain)	1
7. Kamnik		2
8. Muta	} Koroška (Unterkärnten)	1

Tab. 3: Kerngebiete Sloweniens

## 2.3 Auswahl und Codierung des Probenmaterials

Bei den mit Hilfe standardisierter Obstbaumumfragebögen gewonnenen Informationen über den Kernobstbau in der Steiermark handelte es sich um Rohdaten, da die von den jeweiligen Streuobstwiesenbesitzern gemachten Angaben hinsichtlich ihrer Kernobstsorten bis zu diesem Zeitpunkt weder pomologisch noch genetisch verifiziert wurden.

Trotzdem können, über die in den Erhebungsbögen enthaltenen Angaben, wichtige Rückschlüsse auf die Probenauswahl für weiterführende Diversitätsstudien gezogen werden.

Erzielt eine geographische Region besonders viele Nennungen hinsichtlich in Streuobstwiesen kultivierter Sorten, so kann, unabhängig von der tatsächlichen, pomologisch richtigen Namensgebung davon ausgegangen werden, dass diese Gebiete eine große Vielfalt an alten Sorten aufweisen (z. B. günstige klimatische und edaphische Bedingungen für den Obstbau, landwirtschaftlich extensiv genutzte Gebiete).

Neben diesen allgemein quantitativen Angaben bezüglich der Anzahl der Sortennennungen einer bestimmten Region können auch qualitative Erkenntnisse bezüglich der Kultivare selbst aus den Obstbaumumfragen erzielt werden.

So sind vor allem die Seehöhenverteilung (KEPPEL et al. 2002) und die Nutzung der Sorten von Interesse. Während die Angabe der Seehöhe Rückschlüsse auf die Widerstandskraft und Anpassungsfähigkeit der Obstbäume zulässt, ermöglichen Einzelheiten über die Verwendung der Früchte eine Einschätzung hinsichtlich ihrer qualitativen Fruchtparameter (z. B. Fruchtfleischfestigkeit, Phenol-, Zucker- und Säuregehalt; HERBINGER et al. 2004/a und HERBINGER et al. 2004/b).

Aufgrund dieser ersten Analyse der erhaltenen Informationen aus den an uns retournierten Erhebungsbögen bezüglich alter Apfel- und Birnenvarietäten wurden, anhand folgender Kriterien, Kultivare für die genetische Analyse der Diversität mittels Mikrosatelliten ausgewählt:

- das Vorkommen einer Sorte bis in große Seehöhen
- ein Baumalter von 80 – 100 Jahren (und mehr)
- spezielle Verwendung bzw. Nutzung der Früchte
- pomologisch unklare bzw. umgangssprachlich verwendete Sortennamen, und
- Varietäten, die noch nicht in der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) veredelt wurden.

Um die Anonymität der Streuobstwiesenbesitzer zu gewährleisten und damit dem Datenschutz gerecht zu werden, wurden alle, nach den oben genannten Kriterien ausgewählten Varietäten mit einem Code versehen. Diese Codierung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Mag. Melanie Hofer und der Arbeitsgruppe Kernobst am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz entwickelt.

So bedeutet z. B. der Code St/2/3/5 A, dass die Apfelsorte mit der Baumnummer 5 von einem bestimmten Landwirt aus dem Kerngebiet 2 (Eibiswald) in der Steiermark stammt (Abb. 7).

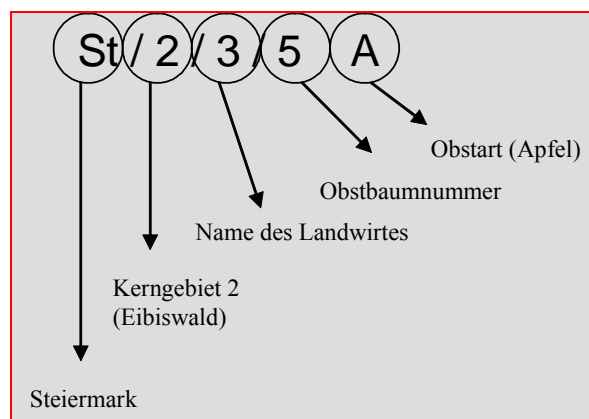


Abb. 7: Codierung der Varietäten

Für alle weiteren genetischen und pomologischen Untersuchungen wurde das Probenmaterial mit dieser Codierung versehen. Somit war die jederzeitige Nachvollziehbarkeit eines jeglichen Analyseergebnisses auf einen speziellen Streuobstbaum möglich.

Die Auswahl der Sorten aus Slowenien erfolgte vor Ort an den jeweiligen Beprobungspunkten unter zu Hilfenahme der Fachkenntnisse von Herrn Mag. DI Peter Zadrazev.

Auch hier wurden die Obstbäume bzw. Kultivare mit einem Code anonymisiert, wobei anstelle des St für Steiermark ein S für Slowenien verwendet wurde.

## 2.4 Probenmaterial aus Obstgenbanken

Neben der primären Erhebung der Streuobstbestände in der Steiermark und Teilen Sloweniens und der Auswahl von Probenmaterial aus diesen Gebieten wurden auch Apfel- und Birnenbäume aus der Obstgenbank der Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg), der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten) und aus dem Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg (Südtirol) in die genetische Analyse der gegenwärtigen Diversität alter Kernobstsorten miteinbezogen.

Die Inkludierung von Genbanken in diese Diversitätsuntersuchung mit ökologischem Schwerpunkt begründet sich in der Annahme, dass die in diesen fachmännisch betreuten Aufsammlungen stehenden Kernobstvarietäten richtig bestimmt und mit korrekter pomologischer Nomenklatur versehen sind.

Dies ist sowohl für die pomologische wie auch genetische Charakterisierung von Apfel- und Birnenkultivaren von Relevanz, da beide Verfahren letztendlich auf den Vergleich der qualitativen und quantitativen Charakteristika der untersuchten Sorten mit jenen von Referenzsorten (richtig bestimmt und benannt) beruht.

Wie sich jedoch später herausstellen sollte (siehe Kapitel 3) war die Annahme, durch ein Zurückgreifen auf Probenmaterial aus Obstgenbanken sowohl die pomologische wie auch genetische Bestimmung unbekannter Probenaufsammlungen aus den Untersuchungsgebieten zu erleichtern bzw. erst zu ermöglichen, eine zu optimistische und nicht unbedingt von Erfolg gekrönte.

Die Codierung der Proben aus der Obstgenbank Steiermark (266 Apfel- und 17 Birnenbäume) erfolgte nach einer Genbank interner Baumnummerierung.

Die Proben aus Kärnten (82 Apfel- und 49 Birnenbäume) wurden nach der unter Kapitel 2.3 beschriebenen Prozedere codiert, wobei anstelle von St (Steiermark) bzw. S (Slowenien) ein K für Kärnten an die vorderste Stelle des Codes gestellt wurde.

Die aus Laimburg stammenden Varietäten (31 Apfelbäume) wurden mit „Laimburg“ und fortlaufender Nummerierung (1, 2, 3, ....31) versehen.



## 2.5 Ernte und Vorbereitung des Probematerials

Die genetische Analyse der Diversität alter Kernobstvarietäten im Untersuchungsgebiet erfordert die Bereitstellung reiner DNA aus Pflanzengewebe in höchster Qualität.

Aus diesem Grund wurden von den ausgewählten Probestämmen (siehe oben) junge, gesunde Blätter geerntet. Die Blätter wurden sofort nach der Ernte in vorbereitete, mit der jeweiligen Codierung versehene Pergaminsäckchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Da das Probenmaterial verteilt über die gesamte Steiermark und Teile Sloweniens sowie aus diversen Obstgenbanken aufgesammelt wurde, war es notwendig, ein für den Transport flüssigen Stickstoffs geeignetes Behältnis mitzuführen: Flüssig-Stickstoff-Gefrierbehälter-Cryo-Lagerungssystem, 1575 RS mit Niedrigfüllstandalarm; SY-LAB Geräte GmbH, Tullnerbachstr. 61-65, 3011 Neupurkersdorf /Österreich.

Nach Rückkehr an das Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Graz wurden die gefrorenen Blätter für 72 Stunden gefriergetrocknet (Hetoicc Freeze Dryer, Type CD 4; Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark) um danach, luftdicht in Kunststoffgefrierbeutel mit Kieselgel abgepackt, im Gefrierschrank bei -25 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert zu werden.

Um das für die DNA-Extraktion erforderliche Ausgangsmaterial, feinstes Blattpulver, zu erhalten, wurden die gefriergetrockneten Blätter im Micro-Dismembrator II (B. Braun, Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) zu einem feinen Pulver vermahlen, welches in feuchtigkeitsdichten und wiederum mit der Probencodierung versehenen Plastikröhrchen gefüllt im Gefrierschrank bei - 25 °C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt wurde.

In dieser Form konnte das umfangreiche Probematerial platzsparend und fortwährend für die weiteren Schritte der methodischen Bearbeitung gelagert und so, jederzeit auf deren Herkunft rückführbar, konserviert werden.

## 2.6 DNA Isolierung aus Pflanzengeweben

Die genetische Analyse der Diversität alter *Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L. Kultivare erfordert die Isolierung der DNA aus Pflanzengeweben in ausreichendem Maße und in hoher Qualität.

In dieser Arbeit wurden junge Blätter der Probebäume gesammelt und, wie bereits beschrieben, zu einem feinen Pulver vermahlen. Dieses Blattpulver diente als Ausgangsmaterial für die DNA Isolierung.

Die Auswahl junger Pflanzengewebe für die Extraktion des Erbgutes wird vor allem durch zwei Faktoren bedingt.

Junge Gewebe enthalten mehr (intakte) Zellen pro Gewichtseinheit. Dies bedingt eine höhere DNA Ausbeute bzw. erfordert den Einsatz geringerer Mengen an Pflanzengeweben für die DNA Extraktion (QIAGEN 2000).

Ein weiterer wesentlicher Einflussfaktor auf die DNA Isolierung aus Pflanzengeweben stellt deren Gehalt an Polyphenolen und Polysacchariden dar.

Grundsätzlich enthalten Mitglieder der *Rosaceae* Familie, zu der auch der Apfel und die Birne gehören, beachtliche Mengen dieser pflanzlichen Komponenten (WILSON & BLUNDEN 1983, MALNOY et al. 2001).

Polyphenole und Polysaccharide binden während der Isolierung an die DNA und überführen sie so in eine für weitere Analysen unbrauchbare Form (JOHN 1992, MALNOY et al. 2001).

Der prozentuelle Anteil an Polyphenolen und Polysacchariden in noch nicht völlig ausdifferenzierten Blattgeweben ist geringer; durch die Verwendung jungen Pflanzenmaterials vermindert man damit den negativen Einfluss der Polyphenole und Polysaccharide auf den Vorgang der DNA-Isolierung (QIAGEN 2000).

Für die Gewinnung der DNA aus Blattmaterial stehen unterschiedliche Verfahren, basierend auf der CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode zur Verfügung. Als Beispiele sind hier die von DELLAPORTA et al. 1983, KOLLER et al. 1993 und GIANFRANCESCHI et al. 1998 beschriebenen Protokolle angeführt.

Da diese Prozeduren sehr zeitaufwändig sind, wurde von uns die Isolierung der DNA aus Blattgeweben alter Apfel- und Birnensorten mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN 2000) durchgeführt.

Die Vorteile dieser Methode liegen in den im Lieferumfang enthaltenen Extraktions- bzw. Pufferlösungen, sowie in der Bereitstellung spezieller Reaktionsgefäße für die Extraktion und Aufreinigung der DNA aus Pflanzengeweben.

Das DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit Verfahren ist für ein Frischgewicht von max. 100 mg Pflanzengewebe ausgerichtet. Wenn man, so wie in unserem Fall, gefriergetrocknetes Material verwendet, muss man dieses Gewicht um den Faktor 5 reduzieren, wir verwendeten ca. 17 mg Blattpulver zur DNA-Extraktion. Wird der angegebene Maximalwert der Einwaage überschritten, so führt dies zu ineffizienter Lyse der Zellen, zu verminderter Reinheit und zu geringer DNA-Ausbeute (QIAGEN 2000).

Im Wesentlichen besteht die DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN) Methode aus:

1. einer Aufspaltung der Gewebe bzw. Zellen (Zelllyse),
  2. der Ausfällung von Detergentien, Proteinen und Polysacchariden,
  3. einem wiederholten Filtrieren, Zentrifugieren und Auswaschen und schließlich
  4. der Lösung der reinen DNA in einem entsprechenden Puffer
- (QIAGEN 2000).

Als Ergebnis der DNA Isolierung mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN 2000) erhält man ca. 200 µl reine, in einem Puffer gelöste DNA.

Die gelöste und reine DNA wurde in beschriftete, 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und so bei – 25 °C bis zur weiteren Analyse mittels Mikrosatelliten aufbewahrt.

Wie bereits beschrieben, stellen sowohl Polyphenole wie auch Polysaccharide die wesentlichsten Antagonisten einer erfolgreichen DNA Isolierung aus Pflanzengeweben dar. So war die oben dargestellte Vorgehensweise der Gewinnung reinen Erbgutes aus Blättern zwar bei den verschiedenen Apfelvarietäten von Erfolg gekrönt, nicht jedoch bei der Birne.

Nach der Zugabe des aus Birnenblättern gewonnenen gefriergetrockneten und gemahlten Materials zum Zelllyse-Puffer war ein weißer klumpiger Niederschlag zu beobachten, der sich als nur mehr sehr schwer löslich darstellte.

Im Arbeitsprotokoll des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN 2000) wird auf das Problem verklumpender Gewebe in diesem Arbeitsschritt hingewiesen. Dies kann zu geringerer DNA Ausbeute beim Extraktionsvorgang führen.

Möglicherweise enthalten Birnenblätter höhere Konzentrationen an Polyphenolen und Polysacchariden als Apfelblätter, was schließlich zu diesen schwerlöslichen und die DNA Extraktion behindernden Aggregaten (Polyphenole, Polysaccharide und DNA) führte.

Indikator für die quantitativ wie qualitativ geringere Ausbeute isolierter DNA aus Birnenblättern war schließlich der ausbleibende Erfolg (keine nachweisbaren bzw. auswertbaren SSRs) bei der Amplifikation spezifischer Birnen-Mikrosatelliten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

Aus diesem Grund wurde anstatt der für Apfelgewebe verwendeten 17 mg Blattpulver nur 15 mg Pulver aus Birnenblättern in das Extraktionsprozedere eingesetzt (ineffizienter Lyse der Zellen bei größeren Mengen, was zu verminderter Reinheit und zu geringer DNA-Ausbeute führt (QIAGEN 2000)). Zusätzlich wurde die im DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit Verfahren empfohlene und bei Apfelblattgeweben angewandte Inkubationszeit für die Zelllyse bei 65 °C von 10 min auf 75 min ausgedehnt.

Dadurch war es möglich, ausreichend DNA in entsprechender Qualität für nachfolgende Analysen zu gewinnen.

Die aus Birnenblättern extrahierte DNA wurde ebenfalls in beschriftete 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei – 25 °C konserviert.

## 2.7 Untersuchungen der Diversität mittels Mikrosatelliten

Die primäre Erhebung der Streuobstbestände im Untersuchungsgebiet sowie die Einbeziehung von Kernobstvarietäten aus Obstgenbanken und die Extraktion der DNA aus Blattproben stellen den Ausgangspunkt dieser genetischen Diversitätsstudie dar.

Um das Kernobstkultivarspektrum der Gegenwart festzustellen wurde von uns, aufgrund der im Kapitel 1.3 angeführten Gründe, die Mikrosatellitenanalyse als genetische Differenzierungsmethode angewandt.

Sortendifferenzierung im Bereich Apfel und Birne mit Hilfe dieses Verfahrens wurde bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen durchgeführt: GUILFORD et al. 1997, GIANFRANCESCHI et al. 1998, HOKANSON et al. 1998, VORNAM & GEBHARDT 2000, GOULÃO & OLIVEIRA 2001, HOKANSON et al. 2001, KENIS et al. 2001, LIEBHARD et al. 2002 bzw. YAMAMOTO et al 2002/a, YAMAMOTO et al 2002/b.

In diesen Abhandlungen wurde jedoch immer nur eine relativ geringe Anzahl an Apfel- und Birnenvarietäten, die meist aus fachkundig betreuten Aufsammlungen stammten und deren pomologische Identität schon vorher bekannt war, untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es jedoch, die quer über das Untersuchungsgebiet ermittelten und an die jeweiligen Anbauregionen ökologisch optimal angepassten Varietäten (Kapitel 1.1) mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode zu charakterisieren, genetisch voneinander zu unterscheiden und diesen teils unbekanntem bzw. unzutreffend benannten Aufsammlungen korrekte pomologische Sortenbezeichnungen zuzuweisen.

Überdies wurden in den vorher genannten Arbeiten (GUILFORD et al. 1997, GIANFRANCESCHI et al. 1998, HOKANSON et al. 1998, VORNAM & GEBHARDT 2000, GOULÃO & OLIVEIRA 2001, HOKANSON et al. 2001, KENIS et al. 2001, LIEBHARD et al. 2002 bzw. YAMAMOTO et al 2002/a, YAMAMOTO et al 2002/b) eine relativ große Anzahl (bis zu 140) unterschiedlicher Mikrosatellitenloci (Bereiche der DNA mit sich hintereinander wiederholenden Nukleotideinheiten) zur Sortendifferenzierung herangezogen, teils um sie auf ihre Eignung zur genetischen Charakterisierung zu testen, teils um eine möglichst breite Abdeckung des Apfelgenoms mit Hilfe der Mikrosatellitentechnik zu erreichen und so ein QTL- (quantitativ trait loci) mapping zu ermöglichen.

Dementgegen wollten wir, sowohl aus arbeitstechnischen wie auch ökonomischen Gründen, untersuchen, wie viele Mikrosatellitenloci tatsächlich für die genetische Unterscheidung der in Štajerska und der Steiermark aufgefundenen Varietäten notwendig sind.

GIANFRANCESCHI et al. 1998 beschreiben in ihrer Arbeit, dass nur 2 ausgewählte Mikrosatellitenloci zur Unterscheidung all ihrer in dieser Studie involvierten Apfelkultivare (bis auf Starking und Red Delicious) notwendig waren.

Um der Zielsetzung einer möglichst rationellen genetischen Differenzierung ökologisch optimal angepasster Kernobstvarietäten zu entsprechen, beschränkten wir uns primär auf die Verwendung von jeweils 3 spezifischen Apfel- und Birnenmikrosatelliten.

Die Untersuchung der Diversität mittels Mikrosatelliten umfasst eine spezifische Amplifikation der gewünschten repetitiven DNA Bereiche mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) sowie deren Analyse hinsichtlich ihrer Längenunterschiede (Fragmentanalyse).

### 2.7.1 Mikrosatellitenamplifikation mittels PCR

Mit Hilfe der PCR (Polymerasekettenreaktion) ist es möglich, aus der gesamten aus Blättern isolierten DNA jene Bereiche, die von Interesse sind (in unserem Fall die Mikrosatelliten), in großer Zahl zu vervielfältigen. Notwendig dafür ist ein spezifisches Primerpaar (forward und reversed Primer) welches den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt für die DNA-Polymerase (Enzym) definiert.

Die grundsätzlichen Kriterien für die Auswahl der 3 spezifischen Apfel- und Birnen-Primerkombinationen waren:

1. Polymorphie, d. h. eine große Anzahl an zu erwarteten Allelen,
2. Heterozygotie, d. h. detektierbare Unterschiede im diploiden Chromosomensatz, und
3. deren Lage auf unterschiedlichen linkage groups (Kopplungsgruppen).

Für die genetische Charakterisierung alter Apfelsorten mittels Mikrosatelliten wurden 3 spezifische Primerkombinationen (forward und reversed Primer), die von GIANFRANCESCHI et al. 1998 auf ihre Eignung zur Amplifikation kennzeichnender Apfelmikrosatelliten getestet wurden, ausgewählt: CH01F02, CH02C06 und CH02D12 (Dinukleotid-Repeats, eine repeat unit besteht aus 2 Nukleotiden).

Publikationen im Bereich der Mikrosatellitenanalyse bezüglich unterschiedlicher Birnenvarietäten sind eher rar gesät. Möglicherweise lässt sich dies auf die bereits beschriebene Problematik der Isolierung reiner und für genetische Untersuchungen geeigneter DNA aus Birnenblattgeweben zurückführen (Kapitel 2.6).

Aus diesem Grund war es notwendig, mehrere Primerkombinationen auf ihre Eignung bezüglich Mikrosatellitenamplifikation in *Pyrus communis* L. Varietäten hin zu testen.

Nach den oben angeführten Kriterien wurden von uns aus den Publikationen von YAMAMOTO et al 2002/a bzw. YAMAMOTO et al 2002/b die Primerkombinationen NH001c, NH002b, NH013a, NH014a und NH015a bzw. KU10 und BGT23b ausgewählt.

Diese Primerkombinationen wurden auf ihre Brauchbarkeit zur Amplifikation spezifischer SSR-Loci in *Pyrus communis* L Kultivaren hin überprüft, und zwar hinsichtlich der Bereitstellung auswertbarer (sowohl qualitativ wie auch quantitativ) PCR Produkte, d. h. Mikrosatelliten unterschiedlicher Länge.

Die Erprobung der einzelnen Primerkombinationen erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion anhand der Sorte *Ahatzibirne* aus der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten).

Nach Kontrolle der PCR-Produkte (spezifische Mikrosatelliten) mittels Fragmentanalyse (Kapitel 2.7.2) stellten sich folgende Birnenprimer (forward und reversed) als geeignet heraus: NH013a, NH001c und KU10.

Auch bei diesen durch die drei Birnenprimer gekennzeichneten Mikrosatelliten handelt es sich um SSR's mit Dinukleotid-Repeats, d. h. eine repeat unit besteht aus 2 Nukleotiden (siehe Kapitel 3.1).

Um die jeweiligen Mikrosatelliten mit Hilfe der DNA-Polymerase entsprechend vervielfältigen zu können, benötigt man, wie bereits dargestellt, zwei verschiedene Primer: einen forward Primer und einen reversed Primer.

Die Detektion der spezifischen Amplifikationsprodukte erfordert eine, je nach Arbeitsprotokoll bzw. technischer Ausrüstung der jeweiligen Labors, Markierung der Mikrosatelliten.

Die PCR-Produkte können über eine radioaktive Markierung des forward Primers mit Hilfe des [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP und der T4 Polynukleotid-Kinase mit anschließender Visualisierung anhand eines Röntgenfilms (Kodak, X Omat AR) identifiziert werden (GIANFRANCESCHI et al. 1998).

Aufgrund des Vorhandenseins eines ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz (Kapitel 2.7.2) wurden in unserem Fall die Mikrosatelliten mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert.

Die Markierung erfolgt über den forward Primer (Dye Primer), wobei dieser am 5'-Ende selbst mit dem Farbstoff versehen wird. Bei dieser direkten 5'-Endmarkierung wird der farbstoffmarkierte Primer während der Amplifikationsreaktion in das PCR-Produkt eingebaut und somit der Mikrosatellitenlocus gekennzeichnet.

Die forward Primer inklusive Markierung wurden von genXpress Service & Vertrieb GmbH, Maria Wörth/Austria; Applera Austria Handels GmbH, Wien/Austria bzw. Applera Austria Handels GmbH, Wien geliefert.



Um eine Unterscheidbarkeit der ausgewählten Primer bzw. Mikrosatellitenloci zu gewährleisten, wurden diese mit verschiedenen Farbstoffen markiert.

Die Farbstoffmarkierung erfolgte beim Apfel wie folgt:

- CH01F02: forward Primer wurde mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff 6-FAM versehen (Abb. 8)
- CH02C06: forward Primer wurde mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff HEX markiert
- CH02D12: forward Primer wurde mit dem gelb fluoreszierenden und schwarz detektierbaren Farbstoff NED gekennzeichnet.

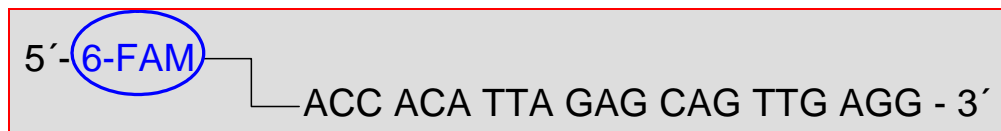


Abb. 8: Dye Primer CH01F02; Markierung mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM

Bei den Birnenprimern zeigte sich folgendes Bild:

- NH013a: forward Primer wurde mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff 6-FAM versehen
- NH001c: forward Primer wurde mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff HEX markiert
- KU10: forward Primer wurde mit dem gelb fluoreszierenden und schwarz detektierbaren Farbstoff NED gekennzeichnet

Für die *in vitro*-Vervielfältigung von, über spezifische Primer definierte DNA-Bereiche mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion sind verschiedene Reaktionspartner notwendig:

- *DNA-Matrize*: DNA template, als Vorlage für die Reaktion dient die aus den pflanzlichen Geweben isolierte DNA bzw. die neusynthetisierten DNA-Fragmente der PCR
- *PCR-Primer*: diese markieren die entsprechenden Mikrosatelliten zur spezifischen Amplifikation (genXpress Service & Vertrieb GmbH, Maria Wörth/Austria; Applera

Austria Handels GmbH, Wien/Austria) und, über den Fluoreszenzfarbstoff, zur Detektion

- *Taq-DNA-Polymerase*: thermostabile Polymerase (Enzym) aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum bei 72 °C; katalysieren die Polymerisation von Mononukleotiden (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTP's, 5' → 3') anhand einer Mononukleotidsequenz als Vorlage (DNA-Matrize) und einer kurzen Mononukleotidsequenzen als Initiator (Primer) (Amersham Biosciences Europe GmbH, Zweigniederlassung Österreich, Wien/Austria)
- *Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's)*: sind die Bausteine der neu synthetisierten DNA-Fragmente (Mikrosatelliten) (genXpress Service & Vertrieb GmbH, Maria Wörth/Austria)
- *dd-Wasser*: Aqua bidest als Lösungsmittel (Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz/Austria)
- *10 x PCR-Puffer*: zur Pufferung der Reaktion und Bereitstellung der notwendigen Ionen für die Taq-Polymerase (Amersham Biosciences Europe GmbH, Zweigniederlassung Österreich, Wien/Austria)
- *Magnesiumchlorid*: Taq-DNA-Polymerase benötigt freies Magnesium als Kofaktor zum Einbau von Nukleotiden an das 3'-Ende der wachsenden Kette (Amersham Biosciences Europe GmbH, Zweigniederlassung Österreich, Wien/Austria)

(MERTES et al. 1997).

Ein 10 µl Reaktionsansatz für die Amplifikation eines entsprechenden Mikrosatellitenlocus mit Hilfe der PCR enthielt die in der Tab. 4 angeführten Komponenten in den entsprechenden Konzentrationen.

Reagenzien	Ausgangs- konzentration	Volumen	End- Konzentration
dd-Wasser		5,44 µl	
10 x PCR-Puffer	10 x	1,35 µl	1,35 x
dNTP's	2,5 mM	0,668 µl	167 µM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,81 µl	2 mM
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,2 µl	1 U
Forward Primer	10 µM	0,27 µl	0,27 µM
Reversed Primer	10 µM	0,27 µl	0,27 µM
DNA Template		1 µl	10 – 55 ng/µl

Tab. 4: Reaktionsmix für die PCR Amplifikation von Mikrosatelliten

Dieser Reaktionsansatz fand sowohl bei der Mikrosatellitenamplifikation der Apfel- wie auch der Birnenproben Anwendung.

Die PCR besteht im Wesentlichen aus sich wiederholenden Heiz- und Kühlvorgängen und lässt sich im Prinzip in 3 Teilschritte untergliedern:

1. *Denaturation*: Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge (Schmelzen der DNA); bei Temperaturen  $> 92$  °C
2. *Annealing*: Anlagerung der zwei sequenzspezifischen Primer an die Zielregion auf den beiden DNA Einzelsträngen und damit Begründung der Spezifität der Reaktion; bei Temperaturen zwischen 37 – 72 °C, je höher die Temperatur, desto spezifischer die Anlagerung
3. *Extension*: ausgehend von den beiden Primersequenzen erfolgt die Kettenverlängerung mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase, bei 72 °C → Temperaturoptimum der Taq-Polymerase

(MERTES et al. 1997).

Des weiteren dient die *Initial Denaturation* der kompletten Auftrennung der aus dem Pflanzengewebe (Blätter) durch Isolierung gewonnenen DNA-Matrize in Einzelstränge, die

*Final Extension* einer Fertigstellung eventuell nicht vollendeter Polymersitationen durch die Taq-DNA-Polymerase.

Diese thermischen Cyclen werden mit Hilfe eines Thermocyclers (Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) automatisiert.

Die PCR-Bedingungen für die Mikrosatellitenamplifikation alter *Malus x domestica* BORKH. Kultivare sind in Tab. 5 dargestellt.

Teilschritt		Dauer	Temperatur
Initial Denaturation		5 min	95 °C
35 Zyklen mit	Denaturation	40 sec	94 °C
	Annealing	40 sec	60 °C
	Extension	30 sec	72 °C
Final Extension		10 min	72 °C

Tab. 5: PCR-Thermocycler Bedingungen (Apfel)

Jedes Primerpaar, also jeder Mikrosatellitenlocus (CH01F02, CH02C06 und CH02D12), wurde in einer separaten Polymerasekettenreaktion zu den gleichen Bedingungen amplifiziert.

Wie bereits dargelegt, stellt die Isolierung reiner DNA aus Birnenblättern eine gewisse Herausforderung dar. Aber nicht nur die Gewinnung des Erbgutes in entsprechender Qualität bedurfte einer Modifikation der methodischen Bearbeitung, auch die Amplifikation der spezifischen Birnenmikrosatelliten mittels PCR erfolgte auf andere Art und Weise als bei den Apfelproben.

Nach versuchter Anwendung der Apfel-PCR-Thermocycler-Bedingungen auf die spezifische Amplifikation der von uns ausgewählten Birnenprimer (NH013a, NH001c und KU10) zeigten sich, nach der Fragmentanalyse mittels des ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), eine Fülle unspezifischer Fragmente unzureichender Quantität (Fragmentanalyse 2.7.2), was deren Auswertung hinsichtlich der Längen der Birnenmikrosatelliten unmöglich machte.

Deshalb wurden für die Vervielfältigung der spezifischen *Pyrus communis* L. Mikrosatelliten die nach YAMAMOTO et al 2002/b publizierten und von uns modifizierten PCR-Thermocycler Bedingungen angewandt (Tab. 6).

Dabei handelt es sich um eine so genannte *TouchDown-PCR*. Diese Methode dient dazu, um unspezifische Bindungen der Primer bei zu niedrigen Annealing-Temperaturen zu verhindern und damit eine Vervielfachung ungewollter DNA Bereiche zu unterbinden (MÜLLER 2001). Die Spezifität der Reaktion wird durch die ersten 10 Zyklen der PCR-Reaktion gewährleistet (hohe Annealing-Temperaturen). Um schließlich ausreichende Mengen der nunmehr spezifisch vervielfältigten Mikrosatellitenloci zu erhalten, folgen 25 Zyklen mit niedriger Annealing-Temperatur (55 °C).

Teilschritt		Dauer	Temperatur
Initial Denaturation		5 min	95 °C
10 Zyklen mit	Denaturation	40 sec	94 °C
	Annealing	1 min	60 °C
	Extension	2 min	72 °C
pro Zyklus verringert sich die Annealing Temperatur um 0,5 °C (TouchDown)			
25 Zyklen mit	Denaturation	40 sec	94 °C
	Annealing	1 min	55 °C
	Extension	2 min	72 °C
Final Extension		15 min	72 °C

Tab. 6: PCR-Thermocycler Bedingungen (Birne)

Auch hier wurde, wie beim Apfel, für jedes Birnenprimerpaar, also jeden Mikrosatellitenlocus (NH013a, NH001c und KU10) eine separate Polymerasekettenreaktion zu gleichen Bedingungen durchgeführt.

Das Ergebnis der spezifischen Anreicherung bzw. Vervielfältigung mittels Polymerasekettenreaktion ist ein Volumen von 10 µl Lösung eines entsprechend Farbstoff markierten Mikrosatellitenlocus (Apfel oder Birne) in milliardenfacher Kopie.

Die PCR Produkte werden entweder bis zur weiteren Verarbeitung im Thermocycler belassen (kühlt nach Beendigung des Programms auf 4°C ab) oder auf Eis gestellt. Dadurch wird die Renaturierung komplementärer Einzelstränge bzw. Oligonukleotide unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindert.

Die Begründung dieser Behandlung der PCR-Produkte liegt im Prinzip der automatisierten Fragmententanalyse mittels ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), welches auf einer Auftrennung einzelsträngiger DNA-Fragmente im elektrophoretischen Spannungsfeld beruht.

### 2.7.2 Fragmentanalyse

Das Prinzip der genetischen Charakterisierung alter Apfel- und Birnensorten mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode liegt in der Analyse ausgewählter Apfel- und Birnen-SSR-Loci ihre Längen betreffend.

Die Ausgangsprodukte für die Feststellung der unterschiedlichen und der die zu untersuchenden Apfel- und Birnensorten charakterisierenden SSR-Längen (Fragmentlängen) waren die mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion spezifisch vervielfältigten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehenen Mikrosatelliten.

Für die Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese wurde der ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) verwendet. Grundsätzlich lässt sich das Genetic Analyzer Fragmentanalyse-System in 3 Teilbereiche untergliedern:

- Hardware

- Autosampler

- Kathode

- Kapillare

- Thermoplatte

- Detektorfenster

- Pumpenblock

- Anode

- Polymerspritze mit Spritzenantrieb (pumpt nach jedem Lauf frisches Polymer durch die Kapillare)

- Detektionssystem (Argonlaser, Spiegel, Linsen, CCD-Kamera [Charged Coupled Devise])

- Software

- ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Collection Software**

- dient der Steuerung des 310er-Systems und der Datenaufnahme, hier werden Sample-Sheets und Injection Lists erstellt

**GeneScan® Analysis Software Version 3.1**

über dieses Programm wird die Matrix erstellt (zur Verrechnung der Fluoreszenzspektrenüberlappungen der verwendeten Farbstoffe), die Analyseparameter festgelegt, der Längenstandard definiert und Mikrosatellitenlängen relativ zum Längenstandard berechnet

- Verbrauchsgüter

Capillary 310 GA: 47 cm lang mit einem Innendurchmesser von 50 µm

NED Matrix Standard Kit

Fluor Amidite Matrix Standard

Polymer: POP4 310 GA

Längenstandard: Genescan 500 ROX

HI-DI Formamide

10 x Genetic Analysis Puffer mit EDTA

Genetic Analyzer Sample Tubes

Alle benötigten Ersatzteile und Verbrauchsgüter wurden über Applied Biosystems (Applera Austria Handels GmbH, Wien) bezogen.

Für die kapillarelektrophoretische Analyse der mittels PCR spezifisch vermehrten bzw. angereicherten und Farbstoff markierten Mikrosatelliten sind folgende Teilschritte notwendig:

1. Vorbereitung der Proben
2. Kapillarelektrophoretische Auftrennung der Fragmente und ihre Detektion aufgrund der Fluoreszenzfarbstoffmarkierung
3. Längenbestimmung mit Hilfe eines definierten Längenstandard



### 2.7.2.1 Vorbereitungen der Proben

Da die einzelnen Mikrosatelliten in getrennten PCR-Reaktionen vervielfältigt wurden, der ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer aber befähigt ist, 4 Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren, vereinigte man die 3 PCR-Produkte mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Längenstandard (rot fluoreszierender Farbstoff ROX) wie folgt:

40 µl Formamid

0,5 µl Längenstandard

---

40,5 µl

Diese 40,5 µl werden in Genetic Analyzer Sample Tubes vorgelegt. In jedes Tube gibt man 1,5 µl des HEX bzw. NED markierten PCR-Produktes und 0,5 µl des 6-FAM markierten PCR-Produktes (spezifisch amplifizierte und Farbstoff markierte Mikrosatelliten).

Der Grund für die unterschiedliche Quantifizierung der PCR-Produkte im Ansatz für die Fragmentanalyse liegt in der unterschiedlichen Farbstoffsensitivität des Detektors. So weist er bezüglich der Farbstoffe HEX und NED eine nur ca. 50 %ige Sensitivität im Vergleich zu 6-FAM auf (ABI PRISM<sup>®</sup>KURS 2002); die mit den Farbstoffen HEX und NED markierten Mikrosatelliten wären deshalb im Elektropherogramm (Kapitel 3.1) quantitativ unterrepräsentiert.

Dieser Fragmentanalyseansatz wird für 2 min bei 95 °C denaturiert, anschließend werden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt (Verhinderung der Renaturierung komplementärer Einzelstränge bzw. Oligonukleotide unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken).

Nach der vollkommenen Abkühlung kommen die Proben in den Autosampler des ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer.

### **2.7.2.2 Kapillarelektrophoretische Auftrennung der Fragmente und ihre Detektion aufgrund der Fluoreszenzfarbstoffmarkierung**

Die Kapillarelektrophorese beruht auf der elektrophoretischen Trennung eines Substanzgemisches in einer dünnen mit Trägermaterial (Polymer) gefüllten Kapillare.

Die DNA bzw. deren Fragmente sind im basischen Milieu negativ geladen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Kapillarelektrophorese zu Nutze.

Die im Fragmentanalyseansatz beinhalteten DNA-Fragmente, Mikrosatelliten und Längenstandard, werden unter Spannung gesetzt. Sie wandern über die mit einem Polymer (POP4 310 GA) gefüllte Kapillare (Capillary 310 GA: 47 cm lang mit einem Innendurchmesser von 50 µm) in Richtung Anode (+-Pol).

Die Geschwindigkeit der jeweiligen Stücke hängt von deren Größe, also von der Länge (Zahl der Nukleotide, nt) ab: je länger die Stücke sind, desto langsamer kommen sie voran und desto später passieren sie ein Fenster in der Kapillare, durch welches die Fragmente mit einem Laserstrahl (Argonlaser) angeregt werden und ihr aufgrund der Farbstoffmarkierung spezifisches Fluoreszenzlicht abstrahlen (Detektorfenster), das wiederum von einer CCD Kamera detektiert wird.

Während der Elektrophorese befinden sich beide Elektroden in einem Elektrodenpuffer (10 x Genetic Analysis Puffer mit EDTA) (Abb. 9).

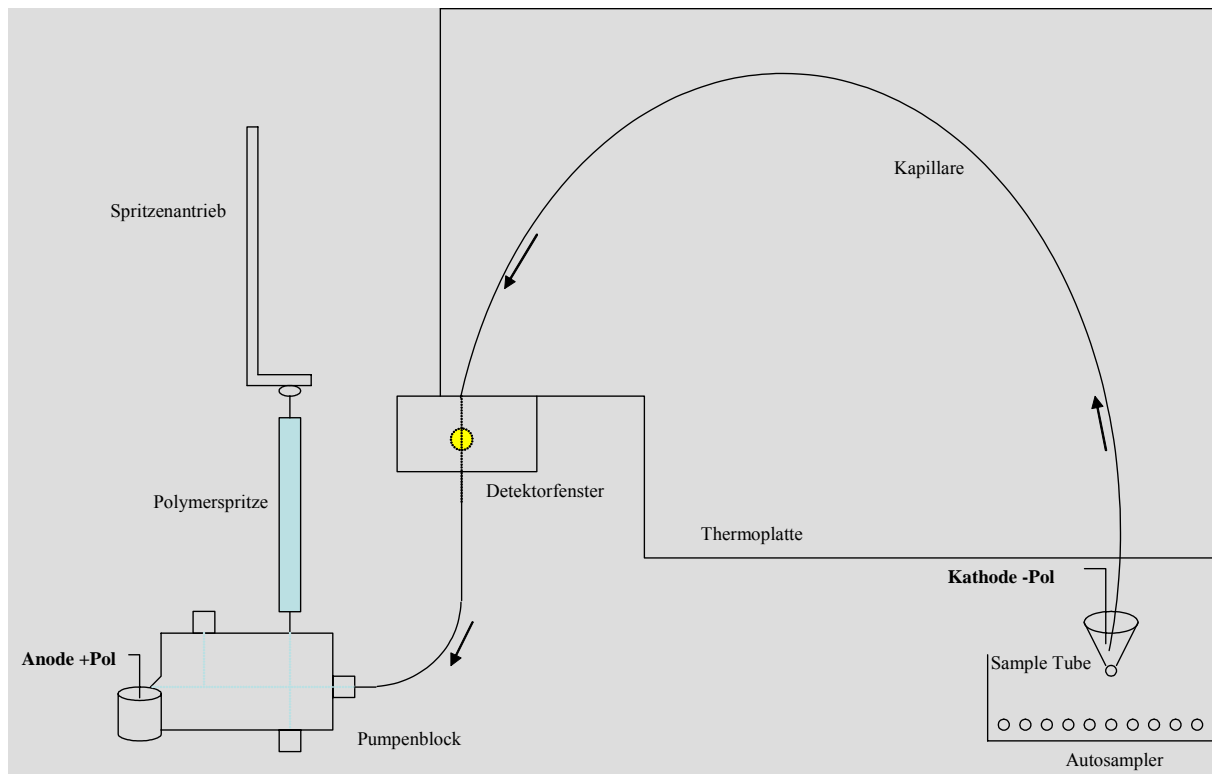


Abb. 9: ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Funktionsschema); kapillarelektrophoretische Fragmentanalyse (Pfeile geben die Flussrichtung der Fragmente an)

Für die Steuerung der automatisierten Probenaufarbeitung und die Analyse der erhaltenen Fluoreszenzspektren dienen zwei Softwarepakete.

Auf der einen Seite müssen Proben- und Injektionslisten verwaltet und grundlegende Funktionen des 310er-Systems während eines Probedurchlaufes festgelegt werden, z. B. die Dauer eines Probedurchlaufes: 25 min, die elektrophoretische Spannung: 15 kV, Temperatur der Thermoplatte: 60 °C. Dafür ist die ABI PRISM® 310 Collection Software zuständig. Andererseits werden die von der CCD Kamera aufgenommenen Signale verrechnet und Mikrosatellitenlängen relativ zum Längenstandard ermitteln. Dieser Analyseschritt wird von der GeneScan® Analysis Software Version 3.1 realisiert.

Ein erstes Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung und Detektion stellt das so genannte Elektropherogramm dar, eine zeit- bzw. längen- und intensitäts- bzw. konzentrationsabhängige Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale von Farbstoff markierten DNA-Fragmenten (Mikrosatelliten und Längenstandard).

### 2.7.2.3 Fragmentlängenbestimmung mit Hilfe eines definierten Längenstandards

Wie bereits im Kapitel 2.7.2.1 ausgeführt, wird gleichzeitig mit den 3 PCR-Produkten, den verschiedenen Mikrosatellitenloci, auch ein Längenstandard der kapillarelektrophoretischen Fragmentanalyse unterzogen. Mit Hilfe dieses Längenstandards werden den verschiedenen langen Mikrosatelliten entsprechende Nukleotidlängen zugeordnet.

Der Längenstandard (Genescan 500 ROX) wird durch die Behandlung eines künstlichen Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen Pst I und BstU I hergestellt. Er beinhaltet Fluoreszenzfarbstoff markierte Fragmente folgender Größe (nt): 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, (250), 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500 (GENESCAN<sup>®</sup> REFERENCE GUIDE 2000).

In unserem Fall wurden die Analyseparameter (GeneScan<sup>®</sup> Analysis Software Version 3.1) so gewählt, dass Fragmentlängen von 75 – 350 Nukleotiden in die Auswertung miteinbezogen wurden.

Ein zu großer Analysebereich führt zu sowohl zeit- wie auch ressourcenaufwändigen Rechenvorgängen, die nicht von Nöten sind. Die Einschränkung auf einen gewissen Analyseabschnitt ist aber natürlich nur dann möglich, wenn aus der Literatur (GIANFRANCESCHI et al. 1998 bzw. YAMAMOTO et al 2002/a und YAMAMOTO et al 2002/b) schon ein gewisser Fragmentlängenbereich der ausgewählten Mikrosatellitenloci bekannt ist. Außerdem sollte er so gewählt werden, dass zumindest ein Fragment des Längenstandards sowohl unterhalb wie auch oberhalb des angegebenen Minimal- und Maximal-Wertes der zu erwartenden Mikrosatellitenlängen liegt.

Die Abb. 10 zeigt den bei der genetischen Analyse von alten Apfel- und Birnensorten verwendeten Längenstandard (Genescan 500 ROX) mit Fragmenten der Größen (nt): 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 340 und 350.

Das Fragment 250 zeigt keine vollständige Denaturierung (Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge) unter den Bedingungen des Fragmentanalyseansatzes (siehe oben) und damit kein nachvollziehbar elektrophoretisches Verhalten. Doppelstränge zeigen im definierten elektrophoretischen System eine längere Laufzeit als Einzelstränge, deshalb kommt es je nach Grad des Denaturierungszustandes (Verhältnis zwischen einzelsträngigen und doppelsträngigen 250 nt Fragmenten) zu einer Drift des 250 nt Fragmentpeaks im

Elektropherogramm. Dieses Fragment wurde daher, auf Empfehlung des GENESCAN<sup>®</sup> REFERENCE GUIDE 2000, nicht für die Längenbestimmung herangezogen und ist deshalb als \* gekennzeichnet (GENESCAN<sup>®</sup> REFERENCE GUIDE 2000).

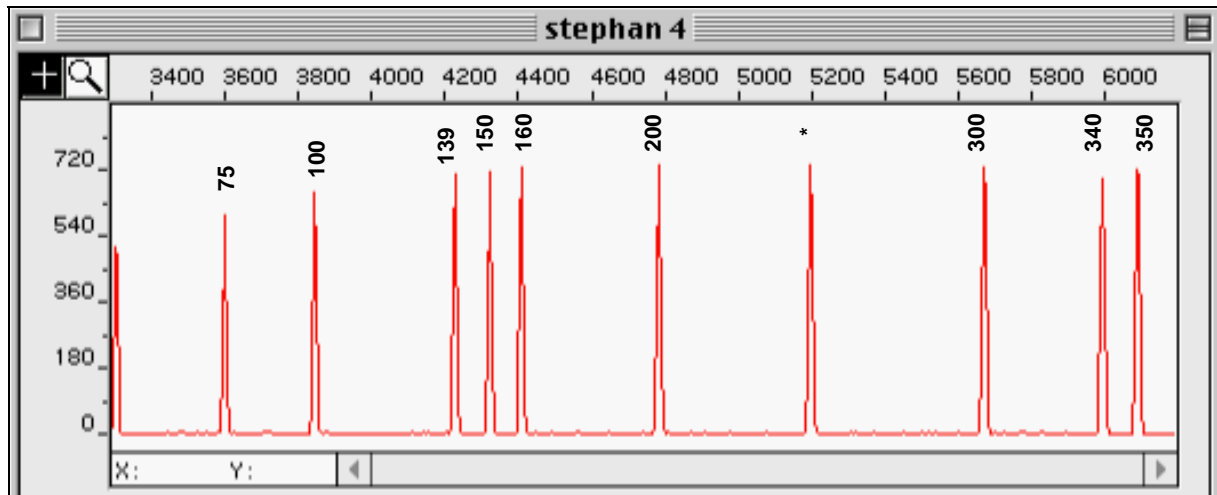


Abb. 10: Genescan 500 ROX; Analysebereich ca. 75 – 350 Nucleotide.

Die Größen- also Längenbestimmung der Mikrosatelliten unbekannter Länge erfolgt über die Längenstandardkurve.

Diese ist das Ergebnis aus der Fragmentlänge (definiert beim Längenstandard) und der Dauer (Zeit) die vom jeweiligen Fragment benötigt wird, um im gegebenen elektrophoretischen System eine gewisse, genau festgelegte Strecke zurückzulegen (vom Sample Tube über die mit Polymer gefüllte Kapillare bis zum Detektorfenster, Abb. 9).

Die von der GeneScan<sup>®</sup> Analysis Software Version 3.1. mit Hilfe dieser Längenstandardkurve errechneten Fragmentlängen der Mikrosatelliten stellen keine ganzen Zahlenwerte (Nucleotidlängen) dar.

Um nun ganzzahlige Fragmentlängen zu erhalten, war es, in Ermangelung einer geeigneten Software, vorerst notwendig, für jedes Allel eines jeden Mikrosatellitenlocus einen Mittelwert zu bilden. Jenes Allel eines Locus, welches am häufigsten vorkam, wurde nach mathematischen Regeln zu einer ganzen Zahl auf- oder abgerundet. Von diesem Allel ausgehend wurden dann die Mittelwerte der jeweils anderen Allele eines Locus entsprechend dem Mikrosatelliten-Repeat-Typ ganzzahlig berichtigt.

Da in unserem Fall sowohl für die Analyse der Apfel- wie auch der Birnenproben SSR-Loci des Dinukleotid-Repeat Typs verwendet wurden (Kapitel 2.7.1), stellten die Unterschiede zwischen Allelen des betreffenden Locus immer 2 Nukleotide oder ein Vielfaches von 2 dar (Kapitel 1.3).

Die statistische Sicherheit der ganzzahligen Festlegung der relativ zum Längenstandard ermittelten Mikrosatellitenlängen erfolgte mittels Regressionsanalyse.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der genetischen Charakterisierung alter Kernobstvarietäten (*Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L.) in der Steiermark und Teilen Sloweniens dargestellt. Gleichzeitig erfolgt auch eine Diskussion der Resultate, um so die Notwendigkeit der auf ein jeweiliges Kapitel nachfolgenden Arbeitsschritte besser zu veranschaulichen. Die Behandlung der Ergebnisse und deren Diskussion in einem zusammenhängenden Kapitel sollen so die Entwicklung und das Verständnis der jeweiligen Fragestellungen verdeutlichen.

Ausgehend von einer primären Erhebung der Streuobstbestände im Untersuchungsgebiet (Kapitel 2.1, 2.2) und der Auswahl und Codierung der zu untersuchenden Kernobstkultivare (Kapitel 2.3) sowie der Einbeziehung von Probenmaterial (Apfel und Birne) aus Obstgenbanken (Kapitel 2.4), wurden 651 Apfel- und 180 Birnenkultivare mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode (Kapitel 2.5 – 2.7) genetisch untersucht.

Wie bereits im Kapitel 2.7 ausgeführt, stellte eine möglichst rationelle genetische Differenzierung ökologisch optimal angepasster Kernobstvarietäten die Zielsetzung dieser Arbeit dar.

Daher kamen primär jeweils 3 spezifisch ausgewählte Mikrosatelliten-Primerkombinationen für die genetische Differenzierung der Apfel- und Birnenproben zur Anwendung.

Ausgehend von einer grundlegenden Erläuterung der durch die Fragmentanalyse erhaltenen Elektropherogramme spezifisch amplifizierter Mikrosatelliten (Kapitel 3.1) wird die Differenzierungskapazität dreier Mikrosatelliten bezüglich der untersuchten Apfel- und Birnenproben gezeigt (Kapitel 3.2).

Die Grundvoraussetzung für die Bestimmung unbekannter bzw. mit lokalen Namensgebungen versehenen Kernobstvarietäten bildet den Inhalt des Kapitels 3.3.

Die Grenzen der genetischen Sortencharakterisierung mittels der Mikrosatellitenmethode werden im Kapitel 3.4 beschrieben.

Wie groß das noch vorhandene Kernobstsortenspektrum im Untersuchungsgebiet ist, wird im Kapitel 3.5 beantwortet.

Ob Mikrosatellitendaten, welche in unterschiedlichen Forschungslabors generiert werden, auch miteinander vergleichbar sind, wird im Kapitel 3.6 behandelt.

Viele der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden bereits in international referierten Journalen und allgemeinen Fachzeitschriften veröffentlicht. Erfolgte die Bearbeitung einzelner Fragestellungen in Kooperation, so wird ausdrücklich, auch hinsichtlich des Ausmaßes seines Beitrages, auf den jeweiligen Kooperationspartner hingewiesen.



### 3.1 Elektropherogramm

Das Elektropherogramm versteht sich als erstes Ergebnis der automatisierten genetischen Analyse unterschiedlicher Mikrosatelliten ihre Längen betreffend mittels ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer. Es stellt eine längen- und konzentrationsabhängige Aufzeichnung der über die PCR spezifisch amplifizierten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente dar.

Ein Charakteristikum für Mikrosatelliten sind die sogenannten „Stotterbanden od. Stotterpeaks“, die eine gewisse Herausforderung an die Analyse der Fragmentlängen darstellen.

Stotterbanden entstehen durch die „*Taq*-polymerase slippage“ (oder „replication slippage“). Darunter versteht man die Trennung des in Replikation befindlichen DNA-Stranges (Primer-Strang) von der DNA-Matrize, die Bildung einer Schlaufe (loop) im Matrix- oder im Primer-Strang und eine falsch ausgerichtete Wiedervereinigung der beiden Stränge mit nachfolgender erneuter Replikation (ELLEGREN 2004)

Kommt es im Matrix-Strang zu einer loop-Bildung, so führt das zu einer Verkürzung des amplifizierten Mikrosatellitenlocus. Eine Schlaufenbildung im Primer-Strang hat eine Verlängerung des neu gebildeten Mikrosatelliten zur Folge (ELLEGREN 2004).

Die Verkürzung bzw. die Verlängerung des Mikrosatelliten erfolgt in repeat-unit-Einheiten (SHINDE et al. 2003, ELLEGREN 2004).

Wie bereits im Kapitel 2.7.1 beschrieben, wurden von uns sowohl für die Analyse alter Apfelsorten wie auch der Birnenkultivare Mikrosatelliten verwendet, welche so genannte Dinukleotid-Repeats darstellen (CH01F02, CH02C06 und CH02D12 bzw. NH013a, NH001c und KU10), d. h. eine repeat unit besteht aus 2 Nukleotiden.

Dem entsprechend beträgt der Längenunterschied zwischen den jeweiligen „Stotterbanden“ jeweils 2 Nukleotide.

Der Vorgang der Entstehung von Stotterbanden, die „replication slippage“, ist mit den Mutationsmechanismen von Mikrosatelliten, Entstehung unterschiedlicher Längen am selben SSR-Locus, zu vergleichen, wobei Kontraktionsmutationen (Verkürzungen) eher zu erwarten sind als Expansionsmutationen (Verlängerungen) (SHINDE et al. 2003, ELLEGREN 2004).

Die Abb. 11 dient der Erläuterung zur Auswertung der durch die Fragmentanalyse spezifisch amplifizierter Mikrosatelliten generierten Elektropherogramme.

Als Beispiele werden hier Elektropherogramme des Mikrosatellitenlocus CH01F02 unterschiedlicher Apfelsorten behandelt.

Die Allelzusammensetzung, verschiedene Ausprägungen (Längen) des Locus CH01F02, der einzelnen Kultivare lässt sich wie folgt erklären:

- die *Ananasrenette* zeigt nur einen Mikrosatellitenpeak (183 nt) am Locus CH01F02. Die Peaks vor dem eigentlichen Mikrosatellitenpeak vertreten die so genannten Stotterbanden mit jeweils 2 nt (eine repeat unit) Kontraktion. In diesem Fall kann es sich um eine homozygote Merkmalsausprägung handeln, oder es ist zusätzlich ein sogenanntes Null-Allel vorhanden. Eine solche Erscheinung kann dann auftreten, wenn in den primer-annealing-Sequenzen der Matrix-DNA Polymorphismen (z. B. Mutationen) auftreten, die eine spezifische Primerbindung verhindern und es so zu keiner Amplifikation des SSR kommt (Null-Allel). In diesem Fall wäre das Individuum heterozygot, wobei das andere Allel nicht detektierbar wäre.
- die *Baumanns Renette*, der *Gelbe Bellefleur* und der *Gravensteiner* repräsentieren diploid heterozygote Individuen (oder triploide mit einem Null-Allel) mit unterschiedlichen repeat-unit Abständen zwischen den Allelen.

Bei der *Baumanns Renette* sind zwischen den Allelen (169 nt, 179 nt) 10 nt bzw. 5 repeat-units Unterschied. Bemerkenswert ist die geringere Höhe des 179 nt Peak, was auf eine geringere Amplifikationseffizienz größerer Fragmente schließen lässt.

Beim *Gelben Bellefleur* bestehen nur 6 nt Allellängenunterschied (3 repeat-units). In diesem Fall addiert sich das Fluoreszenzsignal der - 6 nt Stotterbande des 179 nt Allels zum 173 nt langen Allel was dessen höheren Peak erklärt.

Beim *Gravensteiner* zeigen sich nur 2 nt Längenunterschied zwischen den beiden Allelen (181 nt, 183 nt). Das Fluoreszenzsignal der - 2 nt Stotterbande des 183 nt langen Allels addiert sich zum 181 nt Allel, das Signal der - 4 nt Stotterbande des 183

nt Allels addiert sich zur -2 nt Stotterbande des 181 nt Allels. Dadurch ergibt sich das sogenannte Triangel-Muster des heterozygoten Dinukleotid-Repeat Mikrosatelliten.

- einen speziellen Fall zeigt die Apfelsorte *Haslinger*. Hier sind 3 Mikrosatelliten unterschiedlicher Länge (169 nt, 179 nt und 183 nt) detektiert worden. 3 Allele an einem SSR-Locus können ein triploid heterozygotes Individuum darstellen, oder es handelt sich um einen sogenannten Multilocus-SSR.

Ein Multilocus SSR deutet auf das Vorhandensein von 2 verschiedenen Loci hin die vom selben Primerpaar amplifiziert werden. Dadurch können mehr als 2 Allele in einem diploid heterozygoten Individuum nachgewiesen werden.

(GENESCAN<sup>®</sup> REFERENCE GUIDE 2000, LIEBHARD et al. 2002)

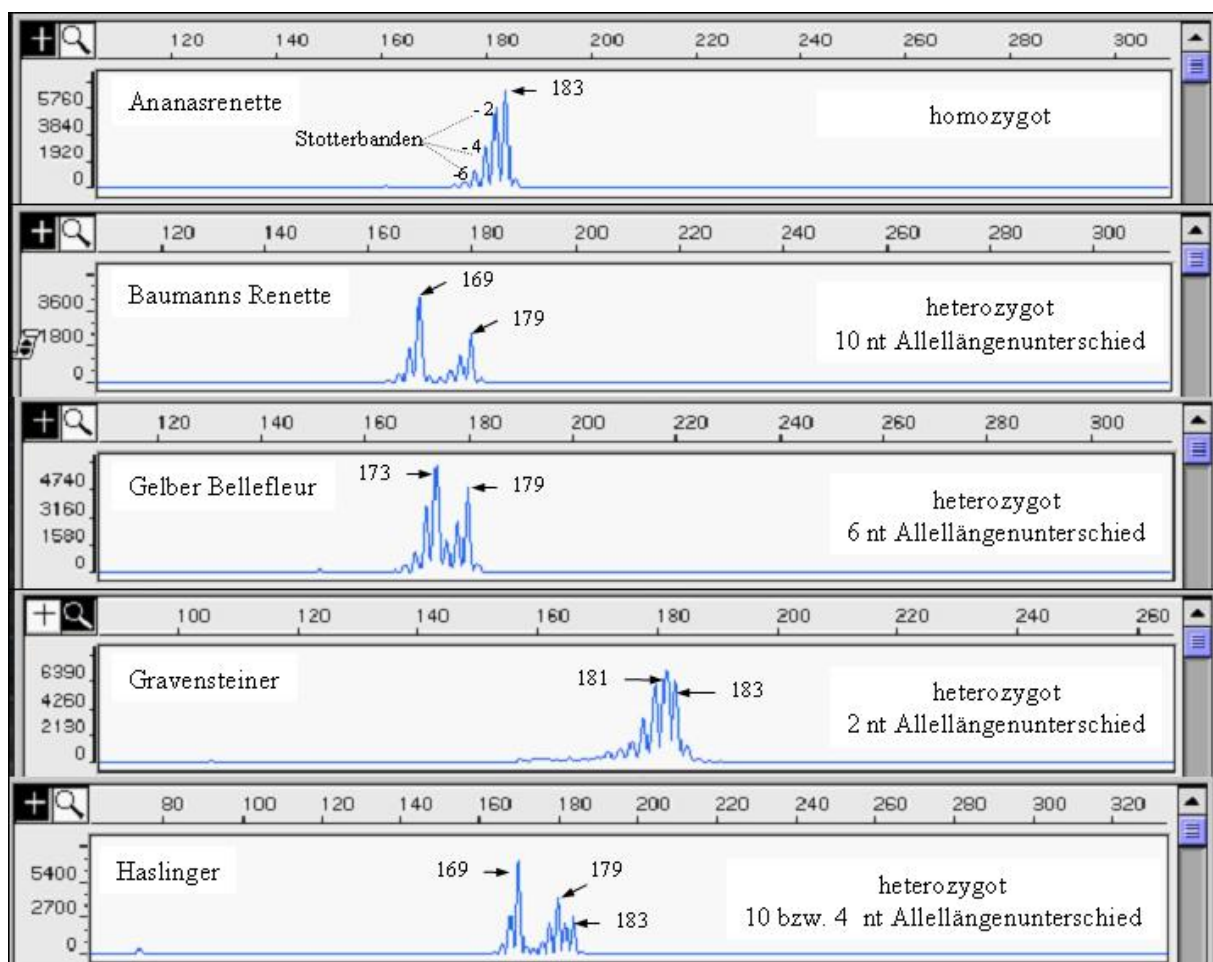


Abb. 11: Elektropherogramme des Mikrosatellitenlocus CH01F02 bei unterschiedlichen Apfelsorten. Stotterbanden (negative Werte geben die Nukleotid-Kontraktionen im Vergleich zum Mikrosatellitenpeak an) und Mikrosatellitenpeaks (mit Pfeilen markiert).

### 3.2 Differenzierung und Charakterisierung mittels 3 Mikrosatelliten

Die Differenzierung und Charakterisierung alter Apfel- und Birnensorten erfolgt über deren Fragmentlängen in den untersuchten Mikrosatellitenloci.

So manche Arbeitsgruppe hat sich schon, mit unterschiedlichen Bestrebungen, der genetischen Sortendifferenzierung im Bereich des Apfels und der Birne zugewandt (z. B. GUILFORD et al. 1997, GIANFRANCESCHI et al. 1998, HOKANSON et al. 1998, VORNAM & GEBHARDT 2000, GOULÃO & OLIVEIRA 2001, HOKANSON et al. 2001, KENIS et al. 2001, LIEBHARD et al. 2002 bzw. YAMAMOTO et al 2002/a, YAMAMOTO et al 2002/b).

Das Ziel unserer Arbeit war es, die genetische Diversität alter, ökologisch optimal angepasster Kernobstvarietäten möglichst rationell festzustellen. Diese Intention wurde durch die Verwendung von jeweils 3 spezifischen Apfel- und Birnenmikrosatelliten methodisch manifestiert.

Die Entscheidung, sich primär mit je 3 SSRs zu begnügen, begründet sich auf der einen Seite mit der Publikation von GIANFRANCESCHI et al. 1998, welche besagt, dass die Verwendung von nur 2 selektierten Mikrosatelliten ausreichte, um alle in der Studie involvierten Apfelkultivare (bis auf zwei) genetisch voneinander unterscheiden zu können.

Weiters hatte die Festlegung auf jeweils 3 Mikrosatellitenloci für Apfel und Birne durchaus methodische Ursachen.

Der für die automatisierte Fragmentanalyse verwendete ABI PRISM<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ist in der Lage, gleichzeitig 4 Farbstoffe zu detektieren. So war es möglich, 3 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Mikrosatelliten sowie den für die Analyse der Fragmentlängen notwendigen, Fluoreszenzfarbstoff markierten Längenstandard gemeinsam elektrophoretisch auftrennen zu lassen.

Die Abbildung 12 zeigt als Beispiel das Elektropherogramm der Apfelsorte *Kronprinz Rudolf* mit den 3 Fluoreszenzfarbstoff markierten Mikrosatelliten CH01F02 (blau), CH02C06 (grün) und CH02D12 (schwarz).

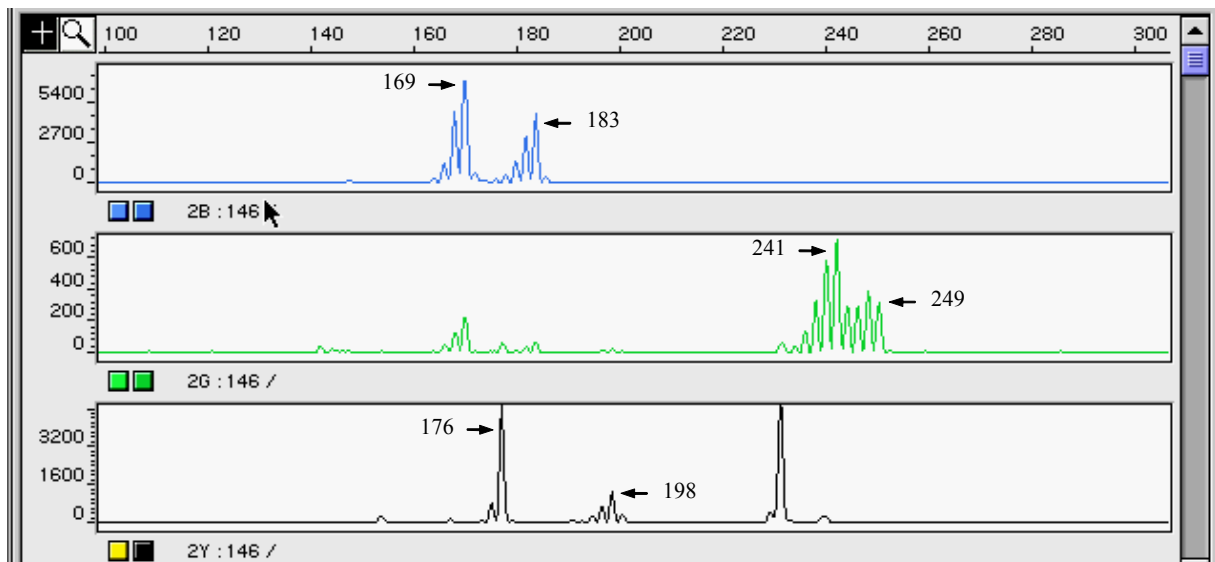


Abb.12: Elektropherogramm des *Kronprinz Rudolf*.

Pfeile markieren die amplifizierten SSR mit deren Längen in Nukleotiden.

Aufgrund der Nukleotidlängen eines jeden Mikrosatellitenlocus ergibt sich für jede untersuchte Aufsammlung (Apfel oder Birne) eine spezifische Allelkomposition, mit deren Hilfe sich die Kultivare voneinander unterscheiden und charakterisieren lassen.

Am Beispiel des *Kronprinz Rudolf* ergibt sich die Allelzusammenstellung 169/183 am Locus CH01F02, 241/249 am Locus CH02C06 und 176/198 am Locus CH02D12.

Der Locus CH02D12 zeigt noch einen dritten Peak. Dieser ist aufgrund fehlender Stotterpeaks, die wie bereits beschrieben als Mikrosatelliten-Charakteristikum anzusehen sind, als Artefakt (Locus-unspezifische Amplifikation) zu bewerten. Unterstützt wird diese Annahme durch die Länge dieses Fragments. Sie liegt weit ausserhalb des für diesen Locus publizierten Fragmentlängenbereichs (GIANFRANCESCHI et al. 1998).

Das gleiche analytische Prinzip verfolgt die genetische Untersuchung der aufgesammelten alten Birnensorten, wobei hier folgende Mikrosatelliten mit ihren Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen Verwendung fanden: NH013a (blau), NH001c (grün) und KU10 (schwarz).

Im Folgenden wird die Differenzierungskapazität der verwendeten Mikrosatelliten sowohl bei den 651 untersuchten Apfel- wie den 180 Birnensorten dargestellt.

### 3.2.1 Allelkomposition der untersuchten Apfelkultivare

Das Ergebnis der spezifischen Amplifikation und elektrophoretischen Analyse der 651 aufgesammelten Apfelproben stellt deren Allelzusammensetzung in den 3 untersuchten Mikrosatellitenloci dar (Tab. 7).

In die Analyse miteinbezogen wurden Apfelvarietäten aus der Steiermark, aus Slowenien (Štajerska, Gorenjska und Koroška), aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg), der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten) und aus dem Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg (Südtirol).

Grundsätzlich stellte die Feststellung der gegenwärtigen Vielfalt alter Apfelsorten im Untersuchungsgebiet (Steiermark, Teile Sloweniens) das Ziel dieser Arbeit dar. Die Einbeziehung von Probenmaterial aus Obstgenbanken sollte die Bestimmung unbekannter Aufsammlungen erleichtern.

Die Bezeichnungen der Aufsammlungen wurden den Erhebungsbögen entnommen, bzw. entstammen den Angaben der jeweiligen Genbanken.

Durch die Anwendung der 3 spezifischen Apfelmikrosatelliten (CH01F02, CH02C06 und CH02D12) war es möglich, von den insgesamt 651 aufgesammelten und untersuchten Apfelkultivaren 248 Varietäten zu unterscheiden.

Eine Varietät wird durch eine bestimmte Allelkomposition der 3 verwendeten Mikrosatelliten charakterisiert und dadurch von anderen Varietäten mit divergenter Allelkomposition unterschieden.

In weiterer Folge werden Aufsammlungen, die in ihrer Allelkomposition übereinstimmen zum Begriff „Kultivargruppe“ zusammenfasst.

Eine Kultivargruppe wird also von Einzelaufsammlungen gebildet, deren Mikrosatelliten die gleichen Längen aufweisen.

Kultivar	Mikrosatellitenlocus								
	CH01F02			CH02C06			CH02D12		
Steirischer Passamaner	169	171		215	231		184	198	
Weißer Apfel	169	171		215	231		184	198	
Maschanzker	169	171		215	231		184	198	
Steirischer Passamaner	169	171		215	231		184	198	
Holzapfel	169	171		215	249		184	198	
Zitronenapfel	169	171		215	249		196	198	
großer gelber Apfel	169	171		231	249		184	196	
Sommerköniger	169	171		247			182	198	
Roter Jungfernapfel	169	171		249			198		
Plattapfeltyp, Zwiebelapfel	169	173	183	227	243	249	194	198	
Wuchse 20	169	173	183	227	243	249	194	198	
Strudelapfel	169	173	183	227	243	249	194	198	
Steinpepping	169	173	183	227	243	249	194	198	
Spätblühender Taffetapfel	169	173		227	249		176	182	
Spätblühender Taffetapfel	169	173		227	249		176	182	
Frauenapfel	169	173		227	249		176	182	
Holzapfel	169	173		249			182	198	
Holzapfel	169	173		249			188	202	
Quitten-Maschanzker	169	177		227	249		198	206	
Quitten-Maschanzker	169	177		227	249		198	206	
Kasseler Renette	169	179	183	227	247		180	190	198
Steir. Pogatschenapfel	169	179	183	249			176	182	190
Pogačarica	169	179	183	249			176	182	190
Breitschädel	169	179	183	249			176	182	190
Haselapfel	169	179	183	249			176	182	190
Brixner Plattling	169	179	183	249			176	182	190
Haslinger	169	179	183	249			176	182	190
Haslinger	169	179	183	249			176	182	190
Köstl. von Herberstein	169	179	183	249			176	182	190
Roter Pogatschenapfel	169	179	183	249			176	182	190
Steir. Pogatschenapfel	169	179	183	249			176	182	190
Brixner Plattling	169	179	183	249			176	182	190
Roter Stettiner	169	179	187	227	241		182	198	
Zwiefler	169	179	187	227	241		182	198	
Kardinal Geflammter	169	179		215	227	247	182	198	210
Tafelapfel	169	179		215	227	247	182	198	210
Zgodnja Kavcic	169	179		215	227	247	182	198	210
Strudelapfel	169	179		215	227	247	182	198	210
Geflammter Kardinal	169	179		215	227	247	182	198	210
Chewill	169	179		215	227	247	182	198	210
Geflammter Kardinal	169	179		215	227	247	182	198	210
Geflammter Kardinal	169	179		215	227	247	182	198	210
Baumanns Renette	169	179		215	227		182	198	
Baumanova reneta	169	179		215	227		182	198	
Baumanns Renette	169	179		215	227		182	198	
Kranzler	169	179		215	227		182	198	
Türken, rot	169	179		215	227		182	198	
Kornkranzler	169	179		215	227		182	198	
Goldrenette	169	179		215	227		182	198	
Baumann Renette	169	179		215	227		182	198	
Nikolausapfel	169	179		215	227		182	198	
Grünling	169	179		215	249		176	206	

Lokalsorte "Kohlilan"	169	179		215	249		198	
Roter Jungfernapfel (Kohlapfel)	169	179		215	249		198	
Spitzapfel	169	179		215	249		198	
Jakob Lebel	169	179		227	249		176	198 210
Gelber Winterstättiner	169	179		227	249		176	198 210
Gelber Winterstättiner	169	179		227	249		176	198 210
Holzapfel	169	179		231			184	198
Minister von Hammerstein	169	179		233	237	249	190	194 198
I. S. Bgld.	169	179		233	237	249	190	194 198
Golden Delicious	169	179		233	237		194	198
Jonathan	169	179		233	249		190	198
Pfundapfel	169	179		237	247		176	198
Pontoise Schöner von	169	179		237	249		190	198
Klon 68	169	179		237	251		190	198
Mohringer Rosenapfel	169	179		241	247		190	198
Sternrenette	169	179		241	249		176	182
Wintertaffet	169	179		247			176	182
Debela Vahna	169	179		249			180	198 200
Debela vahna	169	179		249			180	198 200
Großer Brünnerling	169	179		249			180	198 200
Welschbrunner	169	179		249			180	198 200
Welschbrunner	169	179		249			180	198 200
Großer Brünnerling	169	179		249			180	198 200
Großer Brünnerling	169	179		249			180	198 200
Bernecker	169	181	187	227	241	249	176	182
Rotmohrling	169	181		215	241		176	198
Falchs Gulderling	169	181		215			198	
Wuchse 18	169	181		227	251		176	198
Krummstiel Rheinischer	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Mostapfel	169	181		237	249		176	198
Rheinischer Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Schwarzschillender Kohlapfel	169	181		237	249		176	198
Maschanzker	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Krummstiel	169	181		237	249		176	198
Sommermaschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Klöcher Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Tiroler Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Ananas	169	181		243	249		190	198 206
Klöcher Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Klöcher Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Maschanzker	169	181		243	249		190	198 206
Wuchse 19	169	181		247			190	198
Apfel gelb	169	181		249			180	198 206
Wagenerapfel	169	181		249			180	206
Wagnerapfel	169	181		249			180	206
Wagener Renette	169	181		249			180	206
Adersleber Kalvill	169	181		249			198	206
Maschanzker	169	181		249			198	206
Maschanker	169	181		249			198	206



Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Stajersky mosancelj (Maschanzker)	169	181		249		198	206
Steirischer Maschanzker	169	181		249		198	206
Faßtaufenapfel	169	181		249		198	206
Steirischer Maschanzker	169	181		249		198	206
St. Maschanzker	169	181		249		198	206
Canadarenette	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Eisapfel	169	181		249		198	206
Steirischer Maschanzker	169	181		249		198	206
Maschanzker	169	181		249		198	206
Steir. Maschanzker	169	181		249		198	206
Köstl. von Herberstein	169	181		249		198	206
Köstl. von Herberstein	169	181		249		198	206
Zufallss. Maitz	169	181		249		200	206
Wuchse 15	169	181		249		204	206
Debela Vahna (Wagnerapfel)	169	183	193	249		198	206
Dolenjska voscenka	169	183	193	249		198	206
Brünnerling	169	183	193	249		198	206
Weinling	169	183	193	249		198	206
Weinling	169	183	193	249		198	206
Herren Brünnerling	169	183	193	249		198	206
Sommergewürzapfel	169	183		205	237	198	210
Stockapfel	169	183		215	251	182	198
Stockapfel	169	183		215	251	182	198
Stockapfel	169	183		215	251	182	198
Weinapfel St. Pauler	169	183		215	251	198	206
Tiroler Spitzleder	169	183		229	231	176	190
Muskat Reinette	169	183		229	237	198	
Engelsberger	169	183		229		180	182
Engelsberger	169	183		229		180	182
Maschanzker	169	183		231	249	198	206
Mauth. Limoni	169	183		231	249	198	206
Mauth. Limoni	169	183		231	249	198	206
Wuchse 8	169	183		237	247	198	
Mostapfel	169	183		237	249	182	198
Mostapfel	169	183		237	249	182	198
Peasgoods Sondergleichen	169	183		237	251	176	198
Kardinal Bea	169	183		237	251	176	198
Wuchse 4	169	183		237		198	
Karmelitter Reinette	169	183		239	241	198	
Kronprinz Rudolf	169	183		241	249	176	198
Kronprinz Rudolf	169	183		241	249	176	198
Kronprinz Rudolf	169	183		241	249	176	198
Kronprinz Rudolf	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz Rudolf	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198
Kronprinz	169	183		241	249	176	198

Kronprinz Rudolf	169	183	241	249	176	198		
Kronprinz	169	183	241	249	176	198		
Kronprinz	169	183	241	249	176	198		
Kronprinz	169	183	241	249	176	198		
Kronprinz	169	183	241	249	176	198		
Kronprinz Rudolf	169	183	241	249	176	198		
Gelber Edelapfel	169	183	241	249	182			
Grünstettiner	169	183	241	249	182			
Grünstettiner	169	183	241	249	182			
Traubenapfel	169	183	241	249	190	198		
Grüner Jägerapfel	169	183	249		176	196		
Elise Rathke	169	183	249		180	190		
Sommerbrunner	169	183	249		182	198	206	
Sommerpassamaner	169	183	249		182	198		
Apfel weiß	169	183	249		182	198		
Gr. Hordapfel	169	183	249		182	198		
Gr. Hordapfel	169	183	249		182	198		
Rumencek (kl. Gelbe)	169	183	249		182			
Maschanzker	169	183	249		198	206		
Puhovka	169	183	249		198	206		
Saure Nuschkerl	169	183	249		198	206		
Großer Rheinischer Bohnapfel	169	183	249		198	206		
Welschbrunner	169	183	249		198	206		
Schmidberger Renette	169	183	249		198	210		
Zeiler	169	183	249		200			
Eßapfel grün-gelb	169	183	251		198			
Maunzenapfel	169	185	227	229	180	182		
Weinapfel Trierscher	169	185	227	229	180	182		
Schneiderapfel	169	185	229	247	176	182	198	
Schmidberger Renette	169	187	215	231	180	198		
Holzapfel	169	187	215	243	176	198		
Rosmarin	169	187	215	247	198			
Södliapfel	169	187	233		176	182		
Weißpriacher	169	189	205	251	198			
Kornapfel	169	189	205	251	198			
Schafnase bitte	169	189	251		198	202		
Muskatapfel	169	191	229	249	182	186		
Zachling	169	191	249		190	198		
Edelböhmer	169	191	249		176	182		
Wintertaffetapfel Weißer	169	191	259		182	190		
Ehrbachhofer Weinapfel	169	193	241	259	176	184		
Odenwälder	169	193	249		176	198		
Odenwälder	169	193	249		176	198		
Parkers Pepping	169	195	227	231	184	198		
Gehrsers Rambour	169		215	227	249	198		
Gehrsers Rambour	169		215	227	249	198		
Plankenapfel	169		215	231	180	198		
Grünstettiner	169		215	233	255	180	194	198
Glasbrunner	169		215	233	255	180	194	198
Grünstettiner	169		215	233	255	180	194	198
Schöner Boskoop	169		215	233	255	180	194	198
Russapfel=Zwiebelapfel=Blutapfel	169		215	247	198			
Zwiefelapfel	169		215	247	198			
Mura	169		215	247	198			
Maschanzker	169		215	249	182	198		
Mostapfel	169		215	249	182	198		
Brunner	169		215	255	184	198		
Roter Oderling	169		215	255	194	198		
Roter Oderling	169		215	255	194	198		
Roter Oderling	169		215	255	194	198		
Roter Oderling	169		215	255	194	198		
Otterling	169		215	259	198			

Holzapfel	169	215		182	190
Odelen	169	215		198	
Kaiser Alexander	169	227	251	176	198
Zinka	169	227	259	198	
Kalterer Böhmer	169	229	231	182	206
Kalterer Böhmer	169	229	231	182	206
Wildböhmer	169	229	231	182	206
Wildböhmer	169	229	231	182	206
Wildbacher	169	229	231	182	206
Wildbacher	169	229	231	182	206
Kalterer Böhmer	169	229	231	182	206
Wildböhmer	169	229	231	182	206
Schafnase Steirische	169	229	231	198	204
Rote Schafnase	169	229	231	198	204
Rote Schafnase	169	229	231	198	204
Tupay 2	169	229	231	198	204
Empire	169	229	231	198	204
Empire	169	229	231	198	204
Schafnase	169	229	231	198	204
Schafnase	169	229	231	198	204
Schafnase	169	229	231	198	204
Schafnase	169	229	231	198	204
Schafnase	169	229	231	198	204
Eslacher Luiken	169	229	247	182	190
Eslacher Luiken	169	229	247	182	190
Eslacher Luiken	169	229	247	182	190
Eslacher Luiken	169	229	247	182	190
Dr. Walter	169	229	249	196	206
Danziger Kantapfel	169	229	251	180	198
Trierscher Mostapfel	169	229	251	180	198
Danziger Kantapfel	169	229	251	180	198
Kl. Herrenapfel	169	229	251	180	198
Kl. Herrenapfel	169	229	251	180	198
Roter Passamaner	169	229		180	198
Taubenapfel	169	231	241	182	198
Lederapfel	169	231	241	176	182
Mostapfel gestreift	169	231	249	176	206
Krippele	169	231	249	176	206
Sternappi	169	231	249	176	
Böhmer Maschanzker	169	231	249	184	206
Böhmer Maschanzker	169	231	249	184	206
Gala	169	233	237	198	
Gala	169	233	237	198	
Gala	169	233	237	198	
Gala	169	233	237	198	
Gala	169	233	237	198	
Gala	169	233	237	198	
Gala	169	233	237	198	
Weißer Rosmarin	169	233	247	176	182
Weberbartlapfel	169	233		176	198
Zigeunerapfel	169	233		176	182
Weißer Rosmarin	169	231	233	176	182
Ingrid Marie	169	237	251	198	
Ingrid Marie	169	237	251	198	
Siebenschläfer	169	237	251	190	
Cox Orange	169	237		198	
Cox Orange	169	237		198	
Wuchse 7	169	239	249	196	198
Weißer Wiesling	169	241	243	196	
Hirnsdorfer Bockapfel	169	241	249	198	
Erbachhofer	169	239	241	176	184
Roter Trierer Weinapfel	169	247		180	182

Martinsapfel	169			247		180	182		
Holzapfel, rot	169			247		180	182		
Roter Trierer Weinapfel	169			247		180	182		
Wintergoldparmäne	169			247		180	182		
Boikenapfel	169			247		180	182		
Maschanzker	169			247		180	182		
Orig. Tosiner	169			247		180	182		
Orig. Tosiner	169			247		180	182		
Mostapfel	169			247		190	196		
Weinapfel	169			247		198	204		
Holzapfel	169			247		198	204		
Mostapfel	169			247		198	204		
Mostapfel	169			247		198	204		
Holzapfel	169			247		198	204		
Mostapfel Huber	169			247		198	204		
Mostapfel Huber	169			247		198	204		
Preßapfel LH	169			247		198	204		
Preßapfel LH	169			247		198	204		
Cantilisinap	169			247		198	206		
Roter Fleischapfel	169			247		198	206		
Pfreisling	169			249		176	198		
Kardinal Graf Galen	169			249		176	206		
Lav. Mostapfel	169			249		176	206		
Kardinal Graf Galen	169			249		176	206		
Glasapfel	169			249		176	206		
Glasapfel	169			249		176	206		
Glasapfel	169			249		176	206		
Davendapfel	169			249		182	196		
Holzapfel	169			249		182	198		
Holzapfel	169			249		182	198		
Eisapfel	169			249		182	206		
Lesans Kalvill	169			249		190	196		
Lesans Kalvill	169			249		190	196		
Sommerbrunner	169			249		196	198		
Mostapfel	169			249		198	204		
Ilzer Rosenapfel	169			259		182	198		
Wachsapfel	169			259		182	198		
Ilzer Rosen	169			259		182	198		
Ilzer Rose	169			259		182	198		
Ilzer Weinler	169			259		182	198		
Ilzer Rosen	169			259		182	198		
Ilzer Rosen	169			259		182	198		
Tupay 1	169			259		182	198		
Eiserapfel Roter	171	179	187	215	251	176	194	198	
Roter Gisenapfel	171	179	187	215	251	176	194	198	
Roter Gisenapfel	171	179	187	215	251	176	194	198	
Roter Gisenapfel	171	179	187	215	251	176	194	198	
Silberschneider	171	183		251		200			
Silberschneider	171	183		251		200			
Herrenapfel	171	185		229	249	180	190		
Medencek	171	187		215	227	190	198		
Kideika	171	189		241	251	182	198		
Charlamowsky	171			205	251	176	198		
Charlamowsky	171			205	251	176	198		
Wuchse 30	171			205	215	196	198		
Wintergravensteiner	171			231	249	182	184		
Britzers Dauer	173	179		227	231	241	190	198	210
Geflammter Kardinal	173	179		227	231	241	190	198	210
Bellefleur Gelber	173	179		233	249	194	198		
Bellefleur	173	179		233	249	194	198		
Gelber Bellefleur	173	179		233		194	198		
Bittenfelder Sämling	173	183		227	249	180			

Nürnberger	173	183		229	241		182	200	
Königsfleiner	173			249			176	198	
großer, gelber Apfel	173			249			176	198	
weißer Apfel	173			249			176	198	
Kavül	173			249			176	198	
Graham Jubiläum	173			249			176	198	
Graham Jubiläum	173			249			176	198	
Herbstkalvill Roter	173			249			182	198	
Herzapfel = Klachlapfel	173			249			182	198	
Roter Herbstkalvill	173			249			182	198	
Rodlapfel	173			249			182	198	
Klingler, Tschepperer	173			249			182	198	
Himbeerapfel, Erdbeerapfel	173			249			182	198	
Rdeči jesenski kalvil	173			249			182	198	
Roter Paradiesapfel	173			249			182	198	
Wiltshire Schöner von	173			247			198	210	
Schöner von Wiltshire	173			247			198	210	
Unbekannt	179	181	195	249			190	198	
Double Green	179	181		227	229		182	198	
Ontario	179	181		227	249		180	198	
Ontario	179	181		227	249		180	198	
Spätapfel rot	179	181		233	249		198	206	
Spätapfel rot	179	181		233	249		198	206	
Moling	179	181		241	251		176	198	
Behm III	179	183		215	229		176		
Behm III	179	183		215	229		176		
Hausmütterchen	179	183		215	233		198		
Topcrop	179	183		215	247		176	198	
Bozener Apfel	179	183		215	249		176	182	198
Bozener Apfel	179	183		215	249		176	182	198
Bozener Apfel	179	183		215	249		176	182	198
Bozener Apfel	179	183		215	249		176	182	198
Bohnapfel Großer Rheinischer	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Großer Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Kleiner Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Gorenjska voscenka (Oberkreiner Winterapfel)	179	183		215	249		194	198	
Bobovec (Bohnapfel)	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Rh. Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Schafnase	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
unbekannt	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Bohnapfel	179	183		215	249		194	198	
Hagedorn (Hageborn)	179	183		215	251		176	198	
Hagedorn (Hageborn)	179	183		215	251		176	198	
Roter Astrachan	179	183		227	243		198		
Lederapfel	179	183		233	243	253	182	198	
Damason Renette	179	183		233	243	253	182	198	
Lederapfel	179	183		233	243	253	182	198	
Rauchlinger Apfel	179	183		233	243	253	182	198	
Damason Renette	179	183		233	243	253	182	198	
Damason Renette	179	183		233	243	253	182	198	
Graue Herbstrenette	179	183		233	243	253	182	198	
Graue Herbstrenette	179	183		233	243	253	182	198	
Mostapfel	179	183		233	243		182	194	198

Graue Herbstrenette	179	183		233	243		182	198	200
Gr. Französische Renette	179	183		233	243		182	198	200
Gr. Französische Renette	179	183		233	243		182	198	200
Wintergoldparmäne	179	183		233	249		198		
Wilerrrot	179	183		239	247		184	198	
Rapid	179	183		243	249		194	200	
Thurgauer Weinapfel	179	183		243	249		194	200	
Thurgauer Weinapfel	179	183		243	249		194	200	
Karmeliter Renette	179	183		257			198		
Karmeliter Renette	179	183		257			198		
Tobiasler	179	185		215	241		180	182	
Tobiasler	179	185		215	241		180	182	
Thurgauer Weinapfel	179	185		215	241		180	182	
Thurgauer Weinapfel	179	185		215	241		180	182	
Wuchse 22	179	185		227	243		182	198	
Gewürzluiken	179	185		227	243		182	198	
Jakob Label	179	187	195	227	237		176	182	198
Sommerapfel Pfirsichroter	179	187	195	227	237		176	182	198
alte Landsorte	179	187	195	227	237		176	182	198
Jakob Lebel	179	187	195	227	237		176	182	198
Wuchse 29	179	189		231	245		184	198	
Treffener Apfel	179			215	227	251	182	210	
Empire	179			215	227		176	190	
Empire	179			215	227		176	190	
Kaiser Wilhelm	179			215	229	249	176	190	206
Weißer Bananenapfel	179			215	229		198	204	
Boikenapfel	179			215	233		198	200	
Boikenapfel	179			215	233		198	200	
Boikenapfel	179			215	233		198	200	
Megumi	179			215	233		176	198	
Lederapfel	179			215	237	241	176	208	
Lederapfel	179			215	237	241	176	208	
Herbstkalvill Gelber	179			215	241		190	198	
Winterkalvill Weißer	179			215	241		190	198	
Zgodnja zinsko Kavcic	179			215	249		190	206	
London Pepping	179			215			176	206	
London Pepping	179			215			176	206	
London Pepping	179			215			176	206	
London Pepping	179			215			176	206	
Quittenapfel	179			215			182	190	
Winterbananen	179			227	233		194		
Winterbananen	179			227	233		194		
Bananen Apfel	179			227	233		194		
Dolenjska Voscenka (Wachsapfel)	179			227	237	247	198	208	
Mostapfel Dennig	179			227	237	247	198	208	
Mostapfel Dennig	179			227	237	247	198	208	
Kanada Renette	179			227	247		182	190	198
Kanadarenette Graue	179			227	247		182	190	198
Kanadarenette Weiße	179			227	247		182	190	198
Weiße Kanadarenette	179			227	247		182	190	198
Canada Blanche	179			227	247		182	190	198
Canada Blanche	179			227	247		182	190	198
Kanada Reinette	179			227			182	190	198
Süßapfel	179			229	233		204	208	
Weißer Wintertaffet	179			229	233		204	208	
Weißer Wintertaffet	179			229	233		204	208	
Topcrop	179			229	233		204	208	
Wuchse 6	179			233	237		198		
Wagnerapfel	179			233	251		194	200	
Wagnerapfel	179			233	251		194	200	
Purpurmantel	179			233	251		198		
Wuchse 12	179			237	241		182	198	

Roter Mostapfel	179		237	249	176	198
Holzapfel	179		237	249	176	206
Beffert	179		251	259	182	194
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Roter Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Schmalzapfel	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Gravensteiner	181	183	215	249	198	212
Coulons Renette	181	183	227	237	180	210
Sauergrauch	181	183	233	247	198	
Sauergrauch	181	183	233	247	198	
Sauergrauch	181	183	233	247	198	
Sauergrauch	181	183	233	247	198	
Sauergrauch	181	183	233	247	198	
Chüsenrainer	181	183	233	249	190	198
Klarapfel Weißer	181	187	215	249	178	198
Weißer Klarapfel	181	187	215	249	178	198
Butterapfel	181	187	215	249	178	198
Klarapfel	181	187	215	249	178	198
Butterapfel	181	187	215	249	178	198
Minister Hammerstein	181	189	237	249	176	198
Graue Herbstrenette	181	189	237	249	176	198
Graue Herbstrenette	181	189	237	249	176	198
Weißbriacher	181	189	249		176	182
Grenadier	181	193	249		198	
Croncel Apfel aus	181		205	249	198	
Magna Super	181		205	249	198	
Magna Super	181		205	249	198	
Pomona Tafelapfel	181		215	249	176	182
saurer gelber Apfel	181		215	249	176	182
Rote Frühsorte	181		227	255	176	198
Boskoop	181		229	237	243	190
Ribston Pepping	181		229	237	243	190
Ribston Pepping	181		229	237	243	190
Ribston Pepping	181		229	237	243	190
Ribston Pepping	181		229	237	243	190
Kronprinz Rudolf	181		233	249	180	190
Berner Rosenapfel	181		233	249	198	206
Berner Rosen	181		233	249	198	206
Berner Rosen	181		233	249	198	206
Berner Rosen	181		233	249	198	206
Berner Rosen	181		233	249	198	206
Gelber Richard	181		241	249	176	198
Wozapfel	181		241	251	176	198
Kirarjeva	181		247		190	198
Shinko	181		247		190	198
Priol Delicious	181		247		198	
Weißer Winterkalvill (Belizimski Calvil)	181		249		182	198
Södliapfel	181		249		182	198
Harbertsrenette	183	185	241	249	180	198
Unbekannt	183	185	241	249	180	198
Goldrenette	183	185	241	249	180	198
Harberts Renette	183	185	241	249	180	198
Harberts Renette	183	185	241	249	180	198
Landsberger Renette	183	189	237	251	176	190
Unbekannt	183	189	237	251	176	190
Landsberger Renette	183	189	237	251	176	190





Schafnase	183		241	249	190	198
Ananasrenette	183		241	249	190	198
Gelbe Baumann Renette	183		241	249	198	
Mostapfel Wiedner	183		247		194	206
Mostapfel Wiedner	183		247		194	206
Mostapfel Wiedner	183		247		194	206
Mostapfel Wiedner	183		247		194	206
Champagner Renette	183		249		190	200
Champagner Renette	183		249		190	200
Passamaner	183		249		190	200
Passamaner	183		249		190	200
Winterstreifling	183		249		200	206
Lavantaler Bananenapfel	183		249		206	210
Lav. Bananenapfel	183		249		206	210
Lavantaler Bananen	183		249		206	210
Lavantaler Bananen	183		249		206	210
Gelbe Schafnase	183		251		190	198
Gelbe Schafnase	183		251		190	198
Sternrenette	187	195	215	227	176	200
Sternrenette	187	195	215	227	176	200
Haferapfel	187		205	215	178	202
Astrachan Roter	187		215	251	176	210
Roter Astrachan	187		215	251	176	210
Roter Astrachan	187		215	251	176	210
Mostapfel Rotholz	187		227	249	196	208
Mostapfel Rotholz	187		227	249	196	208
Signe Tillisch	189		215	251	176	
Signe Tillisch	189		215	251	176	
Signe Tillisch	189		215	251	176	
Zuccalmaglions Renette	189		231	245	184	198
Oldenburg Dr. Geheimrat	189		249		176	190
Cox Orange	189		249		176	190
Hauks Hybrid	189		249		176	190
Hauks Hybrid	189		249		176	190
Spitzapfel Abel	189		249		176	200
Zitronenapfel	189		249		176	
Sommerkalvill	189		215	251	176	
Perlrenette	191	193	229	249	180	182
Glockenapfel	191		233	251	176	200
Heimhofer	197	199	229	237	176	198
Gestreifter Taubenapfel	219		233	251	198	

Tab. 7: Mikrosatellitenlängen von 651 Kultivaren. Sortenbezeichnungen nach Angaben in Erhebungsbögen bzw. den jeweiligen Obstgenbanken; nach Allellängen sortiert.

Kultivargruppen können sich nun aus nur einer Aufsammlung z. B. *Holzapfel*, *Zitronenapfel*, *großer gelber Apfel*, *Sommerköniger*, oder mehreren bis vielen verschiedenen Aufsammlungen zusammensetzen. Dies wären z. B. die Gruppen *Steirischer Passamaner*, *Geflammerter Kardinal*, *Baumanns Renette*, *Rheinischer Krummstiel*, *Kronprinz Rudolf*, *Ananasrenette*.

Bei der Betrachtung einfacher und komplexer (mehrgliedriger) Kultivargruppen lassen sich folgende Phänomene beobachten.

Als erstes fielen vor allem jene Kultivargruppen auf, die nur eine Aufsammlung umfassten (siehe Tab. 7).

Einerseits ist es möglich, dass es sich um ganz seltene Apfelvarietäten handelt, die im gesamten Untersuchungsgebiet von uns nur einmal aufgesammelt wurden.

Durch die Einbeziehung von internationalen Genbanken in diese Diversitätsstudie kann es auch sein, dass es sich bei diesen aus nur einer Aufsammlung zusammensetzenden Kultivargruppen um Varietäten handelt, die nur im jeweiligen Herkunftsland dieser Genbank Verbreitung finden. Dies wäre bei der Aufsammlung *Sommerköniger* der Fall, eine Apfelsorte die aus der Sortenaufsammlung des Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrums Laimburg (Südtirol) stammt und offensichtlich von uns im Untersuchungsgebiet (Steiermark, Teile Sloweniens) nicht aufgefunden wurde.

Eine andere Möglichkeit besteht im Vorkommen so genannter Zufallssämlinge und Sports („Spontan auftretende Sprossmutationen“), die von den jeweiligen Landwirten aufgrund ihrer Frucht- und Baumeigenschaften weiterkultiviert wurden. Diese, nach GABER 1994 unter dem Begriff der genotypischen Varianz bereits im Kapitel 1.3 behandelten Phänomene, können zu neuen Sorten führen, was wiederum ihre abweichenden genetischen Muster (spezifische Allelkomposition) von den anderen Kultivargruppen erklären würde.

Letztendlich wäre auch das Vorkommen so genannter durchgewachsener Unterlagen (Kapitel 1.3) zu nennen, welche die gesamte Baumkrone und somit Früchte ehemals kultivierter Edelsorten ersetzen, als Sämlingsunterlagen (Zufallssämlinge) eigene Varietäten darstellen und sich somit in ihrem genetischen Muster von anderen Kultivargruppen unterscheiden.

Bei der Betrachtung komplexer, also sich aus mehreren Aufsammlungen zusammensetzender Kultivargruppen, müssen zwischen folgenden Resultaten der genetischen Differenzierung alter Apfelsorten mittels 3 spezifischer Mikrosatelliten unterschieden werden.

Auf der einen Seite gibt es Aufsammlung gleicher Mikrosatellitenlängen, deren angegebene Sortenbezeichnungen sich als quasi ident darstellen. Dies wäre z. B. bei den Gruppen *Rheinischer Krummstiel* (mit der Abkürzung *Krummstiel*) und *Kronprinz Rudolf* (mit der Abkürzung *Kronprinz*) der Fall.

Meist handelt es sich dabei um Apfelsorten mit großer geographischer Verbreitung und damit großem Bekanntheitsgrad bezüglich sortenspezifischer Fruchtausformung und korrekter pomologischer Nomenklatur.

Damit stellte die richtige pomologische Bezeichnung der Einzelproben dieser Kultivargruppen kein Problem dar.

Anders verhält es sich jedoch mit den meisten anderen Gruppen gleicher genetischer Merkmalsausprägung in den untersuchten Charakteren (CH01F02, CH02C06 und CH02D12).

Als Beispiel wird hier eine Gruppe angeführt, die sich aus Aufsammlungen mit folgenden Sortenbezeichnungen zusammensetzt:

„ *Steir.[ischer] Pogatschenapfel, Pogačarica, Breitschädel, Haselapfel, Brixner Plattling, Haslinger, Köstl.[licher] von Herberstein, Roter Pogatschenapfel und Brixner Plattling*“

Eine Benennung dieser Kultivargruppe mit korrekter pomologischer Nomenklatur lässt sich nun vorerst, aufgrund der Angaben in den Erhebungsbögen bzw. jenen der Genbanken, nicht durchführen.

Zurückzuführen ist dies einerseits auf das bereits in Kapitel 1.3 dargestellte Problem der Verwendung lokaler Sortenbezeichnungen in der Bevölkerung aufgrund des Verwendungszweckes, der Fruchteigenschaften (z. B. *Breitschädel* für Sorten mit sehr breit ausgeformter Frucht) oder dem Reifezeitpunkt der Früchte.

Allerdings stellten sich die pomologischen Bezeichnungen der Einzelproben dieser Kultivargruppen auch in den Genbanken als uneinheitlich heraus, was gerade unsere Intention der Involvierung dieser fachmännisch betreuten Sortenaufsammlungen in diese Diversitätsstudie zur Erleichterung der Sortenbestimmung und –benennung untergrub.

So stammt die Bezeichnung *Brixner Plattling* aus dem Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg (Südtirol), die Bezeichnungen *Köstl. von Herberstein, Steir. Pogatschenapfel, Haslinger* und ebenfalls *Brixner Plattling* aus der Obstgenbank Steiermark, *Pogačarica* aus Slowenien und *Roter Pogatschenapfel, Breitschädel* und *Haselapfel* sowie ebenfalls die Bezeichnungen *Haslinger* aus den Aufsammlungen in der Steiermark.

Die dritte große Herausforderung, die sich aus der Auswertung der, durch die Anwendung der Mikrosatellitenanalyse, erhaltenen Daten ergibt, ist das Auftreten gleicher Nennungen mit unterschiedlich genetischen Charakteristika (Mikrosatellitenlängen).

Als Beispiel sei hier die Sortenbezeichnung *Maschanzker* angeführt, die sich in unterschiedlichsten Kultivargruppen wieder findet und so pomologisch vorerst nur schwer zu fassen war.

Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der weiten geographischen Verbreitung und damit Bekanntheit des Sortennamens *Maschanzker* (große geschichtliche Bedeutung, Kapitel 1.2) ohne ausreichend pomologische Kenntnis der äußeren und inneren Fruchtmerkmale dieser Varietät was schließlich zu fälschlicher Verwendung dieser Sortenbezeichnung für unterschiedliche, sich in ihrer Fruchtausformung ähnelnder, Kultivare führt.

Das Phänomen der phänotypischen Varianz (nach GABER 1994), also der Variabilität der Fruchtausformung dieser Varietät aufgrund umweltbedingter (natürlicher und anthropogener) Einflussfaktoren könnte ebenfalls diese augenscheinlich falsche Zuordnung der Sortenbezeichnung *Maschanzker* zu sich in ihren pomologischen Charakteristiken gleichenden Kultivaren erklären.

Allerdings umfasst die Nennung *Maschanzker*, wie man später im Kapitel 3.3 erfährt, eigentlich zwei Sorten; den *Klöcher Maschanzker* und den *Steirischen Maschanzker*. Somit ist das Auftreten der Sortenbezeichnung *Maschanzker* zumindest in 2 unterschiedlichen Kultivargruppen legitimiert.

Das Vorkommen von Populationssorten und Farbmutanten als eine Form der sog. Sports (nach GABER 1994, Kapitel 1.3) konnte anhand der Kultivargruppen „*Brünnerlinge*“, „*Boskoop*“ und „*Gravensteiner*“ beobachtet werden, die Vorgehensweise bezüglich dieser Formen der genotypischen Varianz wird in Kapitel 3.4 beschrieben.

Die Analyse der Mikrosatellitenlängen der 651 untersuchten Apfelaufsammlungen bringt also somit erste Erkenntnisse bezüglich der genetischen Sortendiversität im Untersuchungsgebiet bzw. in den involvierten Genbanken.

Die Differenzierungskapazität der 3 spezifischen Apfelmikrosatelliten stellte sich als ausreichend dar. So konnten durch deren Anwendung 248 Apfelvarietäten bzw. Kultivargruppen voneinander unterschieden werden.

Abgesehen von Kultivargruppen, die nur aus einer Aufsammlung bestehen und deren pomologische Identität, aufgrund fehlender genetischer Vergleichsdaten (Aufsammlung gleicher Mikrosatellitenlängen, siehe Kapitel 3.3) mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode nicht festzulegen war (siehe oben), konnten die Phänomene wie lokale Sortenbezeichnung sowie der phänotypischen und genotypischen Varianz beobachtet und größtenteils (mit Ausnahme der Populationssorten und Farbmutanten, Kapitel 3.5) insofern klargestellt werden, dass es

sich bei Aufsammlungen einer Kultivargruppe trotz unterschiedlicher Bezeichnungen um ein und dieselben Sorte handelt bzw. bei mehrmaligem Auftreten der gleichen Sortenbezeichnung in unterschiedlichen Kultivargruppen ebendieser Sortenname als inkorrekt bzw. pomologisch falsch bestimmt zu gelten hat.

Die Zuordnung von korrekten pomologischen Sortenbezeichnungen zu diesen sich in ihren genetischen Merkmalen entsprechenden Gruppen stellte sich aber aufgrund fehlender Referenzen nicht immer als unmißverständlich heraus.

Die Uneinheitlichkeit der pomologischen Nomenklatur von Aufsammlung ein und derselben Kultivargruppe aus unterschiedlichen Genbanken war ebenfalls als erstes Ergebnis zu werten und stellte klar, dass sich Obstgenbanken nicht unbedingt als verlässliche Referenzsortenaufsammlungen zur Erleichterung der Bestimmung und korrekten Vergabe pomologischer Sortennamen eignen.

Wie jetzt mit diesen neu aufgeworfenen Fragestellungen umgegangen wurde, wird in den folgenden (3.3 und 3.4) Kapiteln behandelt.

### 3.2.2 Allelkomposition der untersuchten Birnenkultivare

Durch die Anwendung der Mikrosatellitenmethode konnten von den 180 Birnenkultivaren, welche aus der Steiermark, aus Slowenien (Štajerska, Gorenjska und Koroška), aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) und der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten) stammten, 86 Kultivargruppen unterschieden werden.

Der Begriff Kultivargruppe wird auch hier, in Übereinstimmung mit den untersuchten Apfelproben, als eine Zusammenfassung von Einzelaufsammlungen gleicher Mikrosatellitenlängen verstanden.

Die Untersuchung der Birnenvarietäten erfolgte ebenfalls mit Hilfe 3er Mikrosatellitenloci, wobei es sich hier um spezifische Birnenmikrosatelliten handelte: NH013a, NH001c und KU10.

Die Tab. 8 zeigt die Allelkompositionen der aufgesammelten Proben, wobei die Probenbezeichnungen jenen der Angaben in den jeweiligen Erhebungsbögen bzw. Obstgenbanken entsprechen.

Entsprechend den Apfelaufsammlungen, finden sich auch bei den Birnenproben Kultivargruppen, die nur aus einem Individuum bestehen, z. B. *Lacknerbirne*, *Axbirne*, *Holzbirne*, *Grabenbirne*, *Klosterneuburger Mostbirne*.

Dabei kann es sich um seltene, im Untersuchungsgebiet von uns nur einmal aufgesammelte Varietäten handeln. Das Auftreten von Zufallssämlingen, Sports oder durchgewachsenen Unterlagen (Kapitel 1.3), welche aufgrund ihrer Fruchteigenschaften weiterkultiviert wurden, wäre, wie beim Apfel, ebenfalls möglich.

Einen besonderen Fall stellt die *Klosterneuburger Mostbirne* dar, welche nur in der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) kultiviert wird.

Zum Unterschied zur Apfelsorte *Sommerköniger*, welche nur in der Sortensammlung des Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrums Laimburg (Südtirol) vorgefunden und daher gemutmaßt wurde, dass es sich in diesem Fall um eine typisch südtiroler Apfelsorte handelt, kann dies bezüglich der Sorte *Klosterneuburger Mostbirne* nicht geltend gemacht werden, da aufgrund ihrer Kultivierung in der Obstgenbank Steiermark die Verbreitung in diesem Bundesland induziert wird.

Eine Erklärung für das einmalige Auffinden dieser Varietät wäre, dass die *Klosterneuburger Mostbirne* ihre Hauptverbreitung in Niederösterreich hat, ausgehend von Klosterneuburg, und so von uns in der Steiermark nicht aufgefunden wurde.

Die pomologische Identität dieser nur durch eine Aufsammlung vertretenen Kultivargruppen war aufgrund fehlender genetischer Vergleichsdaten (Aufsammlungen gleicher Mikrosatellitenlängen) mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode nicht zu ergründen (Kapitel 3.3).

Die Analyse komplexer (aus mehreren Aufsammlungen gleicher Allelzusammensetzung bestehender) Kultivargruppen stellte sich bis auf wenige Ausnahmen als äußerst schwierig heraus.

Einerseits muss darauf hingewiesen werden, dass der historische Stellenwert der Birne im Sinne systematischer Obstzüchtung wesentlich geringer war als der des Apfels (HARTMANN 2003). Dies könnte sich sowohl in einer eher inkonsequenten Vergabe korrekter Sortenbezeichnungen ausdrücken oder den Verlust ebensolcher Namensgebungen bzw. deren Substitution durch lokale Sortennamen begünstigt haben.

Die mäßige pomologische Erfahrung der jeweiligen Baumbesitzer aber auch unsererseits auf dem Gebiet der Birnenbestimmung bzw. –charakterisierung und eindeutigen Benennung ist aber auch die Folge der begrenzten gegenwärtigen Bedeutung dieser Kernobstsorten (Kapitel 1.2, Prozentuelle Zusammensetzung der Kernobsternte 2006 in Österreich) für das Untersuchungsgebiet. So wurden im Gegensatz zu den 651 Apfelproben nur 180 Birnenaufsammlungen genetisch auf ihre Sortenidentität hin untersucht, was die wesentlich geringere Häufigkeit der Erwähnung dieser Obstsorte in den Erhebungsbögen widerspiegelt.

Bei erster Analyse der durch die Verwendung 3er Mikrosatelliten erhaltenen Allelkompositionen fällt vor allem auf, dass es nur wenige Kultivargruppen zu finden gibt, die aus einzelnen Aufsammlungen mehrheitlich gleicher bis ähnlicher Nennungen bestehen, wie z. B. bei der *Schweizer Wasserbirne* und der *Luxemburger Mostbirne*.

Bei diesen Birnenvarietäten handelt es sich wohl um bekannte, in diesem Fall Mostbirnensorten (LÖSCHNIG 1913), die im Untersuchungsgebiet bzw. den involvierten Obstgenbanken sowohl namentlich wie auch hinsichtlich ihrer pomologischen Merkmale weithin bekannt sind. So findet sich die Sortenbezeichnung *Schweizer Wasserbirne* ausschließlich in einer Kultivargruppe wieder, was die Konstanz hinsichtlich korrekter Bestimmung und Benennung dieser Varietät ausdrückt.

Kultivar	Mikrosatellitenlocus								
	NH013a			NH001c		KU10			
Luzerner Weinbirne	162	180	212	118	138	144	231	261	
Luzerner Weinbirne	162	180	212	118	138	144	231	261	
Lacknerbirne	162	184	198	102	124	144	231		
Axbirne (Gelbmöstler)	162	184	200	138			239	263	
Holzbirne	162	196	212	140			243	249	
Grabenbirne	162	196	222	140			231		
Klosterneuburger Mostbirne	162	196		120			231		
Schlagerbirne	162	196		102	154		231		
Honigbirne	162	196		102	144		231		
Tepka	162	198	204	112	118	146	231	235	249
Tepka	162	198	204	112	118	146	231	235	249
Fleischbirne 26	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne 30	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne 67	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Steirische Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Lederbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Scheiberbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Gruabirne	162	198	204	112	118	146	237	249	
Gozdarski Zawod	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne = Loarmbirn (Grüne Pichlbirne)	162	198	204	112	118	146	237	249	
Kleine Landlbirne (Grüne Landlbirne)	162	198	204	112	118	146	237	249	
Fleischbirne	162	198	204	112	118		237	249	
Mostbirne	162	198	204	112	118		237	249	
Mostbirne	162	200		138	149		235		
Winterbirne	162	200		138	149		235		
Unbekannt	162	200		138	149		235		
Smarjesca	162	200		138	149		235		
Srsenka	162	208		112			261		
Glosbirne	162	212		118	144		231	261	
Alte Sorte	162	216	226	102	118	140	231	249	
Gräfin	162	226		116	120		231		
Williams	162			120			231		
Unbekannt	162			122			231	235	
Huber Mostbirne std.	180	186		116	122		231	239	
Mostbirne	180	196	212	118			231	243	
Schweizer Wasserbirne	180	196	222	118	122	136	235	265	
Schweizer Wasserbirne	180	196	222	118	122	136	235	265	
Schneiderbirne	180	196	222	118	122	136	235	265	
Schweizer Wasserbirne 72	180	196	222	118	122	136	235	265	



Schweizer Wasserbirne	180	196	222	118	122	136	235	265
Luxenburger Mostbirne 7	180	196	222	118	148		241	
Luxenburger Mostbirne 54	180	196	222	118	148		241	
Luxenburger Mostbirne	180	196	222	118	148		241	
Luxenburger Mostbirne	180	196	222	118	148		241	
Wallische Mostbirne	180	196		138	150		231	235
Laporsica	180	208		108			233	
Theilersbirne vf.	180	212		118	144		231	237 261
Theilersbirne vf.	180	212		118	144		231	237 261
Mostbirne	180	222		110	124	144	231	241
Rote Honigbirne 22	184	192		112	122		231	
Rote Honigbirne	184	192		112	122		231	
Birne	184	196		112			231	235
Winterbirne	184	196		104	122		235	261
Birne grün	184	226		120			231	
Butterbirne	186	196		108	112		231	235
Unbekannt (frühe Birne)	186	196		112			231	
Hoandlbirne	186	196		112	150		231	
Ungerbirne	186	198	226	112	138	144	249	261
Lehmbirne	186	198	226	112	138	144	249	261
Rote Carisi	186	214		124	138		231	243
Purkharthofer spät std.	196	198		102	118		237	249
Steirische Weinmostbirne std.	196	198		102	118		237	249
Salzburger std.	196	198		102			231	
Birne	196	198		102			231	
Salzburger Birne	196	198		102			231	235
Gelbmöstler vf.	196	198		108	136		231	237 249
Gelbmöstler vf.	196	198		108	136		231	237 249
Frühbirne	196	198		112			233	253
Haferbirne	196	198		144			231	239
Honigbirne	196	198		144			231	239
Birne klein, gelb	196	198		144			231	239
Kerschbirne	196	198		144			231	239
Nagovitzer	196	198		144			231	239
Honigbirne	196	198		144			231	239
Frauenbirne (ev. Nagowitz)	196	198		144			231	239
Neubirne (Nagowitz)	196	198		144			231	239
Lederbirne 85	196	200		102	118	124	231	235
Unbekannt	196	200		102	118	124	231	235
Lederbirne	196	200		102	118	124	231	235
Lederbirne	196	200		102	118	124	231	235
Lederbirne	196	200		102	118	124	231	235
Süße Lederbirne (Gute Graue)	196	200		102	118	124	231	235
Honigbirne (Gute Graue)	196	200		102	118	124	231	235
Gozdarski Zawod	196	200		112	118	132	233	245
Lacknerbirne	196	204		118	136		233	241 261
Schmotzbirne	196	204		118	136		233	261
Gemeine Kochbirne	196	204		118	136		233	261
Landlbirn (kleine Landlbirne)	196	204		118	136		233	261
Tafelbirne	196	208	226	102	112	120	231	235 263
Birne	196	208		102	112		231	235
Holzbirne II	196	212		120	138		235	
Gean Birn	196	212		102			241	
Rote Österreicherbirne 8	196	214		116	118		231	235
Ahatzibirne 37	196	214		116	118		231	235
Ahatzibirne	196	214		116	118		231	235

Ahatzbirne	196	214		116	118		231	235	
Purkharthofer früh std.	196	216	226	102	138		231	235	
Innerhofer Mostbirne std.	196	216	226	102	138		231	235	
Schmalzbirne	196	216	226	102	138		231	235	
Pfundbirne	196	222		140			231		
Haferbirne	196	226		102	120		231		
Weihnachtsbirne	196	226		112	120		231	237	
Weihnachtsbirne (Gute Luise)	196	226		112			231		
Kaiserbirne (Neue Poiteau)	196	226		116	122		231		
Gute Luise	196			102	112		231	235	
Krummetbirne	196			102	112		231		
Gellerts Butterbirne	196			102	122		231	237	
Butterbirne	196			102	124		231		
Winterbirne	196			116	120		231		
Rote Österreicherbirne 75	196			118			231	233	241
Rote Österreicherbirne	196			118			231	233	
Grüne Winawitzbirne (Rote Pichlbirne)	196			118			231	233	
Mostbirne	198	204	212	112	118	136	237	249	
Tepkovec	198	204	216	112	118	148	231	235	249
Herbstbirne std.	198	204	222	102	112	118	237	249	
Obersteirische Herbstbirne std.	198	204	222	102	112	118	237	249	
Hirschbirne	198	204	222	102	112	118	237	249	
Seiling	198	204	222	102	112	118	237	249	
Wasserbirne	198	204		112	118		237	249	
Fleischbirne	198	210	222	102	136		231		
Luxenburger Mostbirne	198	210	222	102	136		231		
Rote Scheibelbirne	198	210	222	102	136		231		
Speckbirne	198	210	222	102	136		231		
Speckbirne	198	210	222	102	136		231		
Unbekannt	198	210	222	102	136		231		
Speckbirne	198	210	222	102	136		231		
Speckbirne	198	210	222	102	136		231		
Champagnerbirne	198	210	222	102	136		231		
Speckbirne	198	210	222	102	136		231		
Speckbirne	198	210	222	102	136		231		
Österreicher	198	210	222	102	136		231		
OÖ Mostbirne	198	210	222	102	136		231		
Mostbirne Kamnic	198	210	222	102	136		231		
Mostbirne	198	210	222	102	136		231		
Gozdarski Zawod	198	210	222	102	136		231		
Weinmostbirne	198	210	222	102	136		231		
Mostbirne (kleine Leutsbirne)	198	210	222	102	136		231		
Lederbirne (Speckbirne)	198	210	222	102	136		231		
Grüne Pichlbirne (Speckbirne)	198	210	222	102	136		231		
Küber Birne	198	210	222	102	136		231		
Mostbirne (Speckbirne)	198	210	222	102	136		231		
Mostbirne	198	210	222	102	136		231		
Hofratsbirne	198	210	222	102	136		231		
Große Landlbirne	198	210	222	102	136		231		
Scheiblbirne	198	214		108	112		231	237	
Lacknerbirne	198	216	222	108	144		231		
Tepka	198			112	118		231	237	249
Gelbe Honigbirne 88	204			112			261		
Gelbe Honigbirne	204			112			261		
Kleine Landlbirne	208	222		104	144		231	241	
Champagnerbirne	208	222		104	144		231	241	

Landbirne	208	222	104	144	231	241
Winterbirne	208	226	122		231	
Kaiserbirne	208	226	102	122	231	263
Kaiserbirne	208	226	102	120	235	
Betzelsbirne	208		118	144	235	261
Gelbe Österreicherbirne 113	210	222	102	136	231	
Gelbe Österreicherbirne	210	222	102	136	231	
Gelbe Österreicherbirne	210	222	102	136	231	
Lacknerbirne	212	222	142		231	
Holzbirne	214	222	144		233	
Holzbirne	214	222	144		233	
Zwiehefelbirne	216	222	102	124	128	261
Eßbirnen	216	226	112	120	231	
Eßbirne rotwangig	216	226	112	120	231	
Eßbirne grün-braun	216	226	112	144	231	235
Iseport	216	226	112	144	231	235
Kompottbirne	216	226	112	144	231	235
Tafelbirne	216	226	118	140	156	231 235 249
Tepka	216		108	144	237	
Stuttgarter Birne	222	226	102		231	235

Tab. 8: Mikrosatellitenlängen von 180 Kultivaren. Sortenbezeichnung nach Angaben in Erhebungsbögen bzw. den jeweiligen Obstgenbanken; nach Allellängen sortiert.

Gerade solche Eindeutigkeiten hinsichtlich Bestimmung und Vergabe korrekter pomologischer Sortenbezeichnungen stellen bei Birnen aber eher eine Seltenheit dar.

In der Regel unterscheiden sich Aufsammlungen gleicher Mikrosatellitenlängen in ihren, aus Erhebungsbögen bzw. Genbanken stammenden Sortenbezeichnungen.

Als Beispiel werden folgende Nennungen einer Kultivargruppe angeführt: *Haferbirne*; *Honigbirne*; *Birne klein, gelb*; *Kerschbirne*; *Nagovitzer*; *Frauenbirne*; *Neubirne*.

Diese Fülle an lokalen und synonymen Sortenbezeichnungen für ein und dieselbe Varietät und damit das Auffinden der korrekten pomologischen Betitelung stellen für den Pomologen eine große Herausforderung dar (Kapitel 1.3).

Die Bezeichnungen wie *Haferbirne*, *Kerschbirne* und *Frauenbirne* beziehen sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Reifezeitpunkt der Früchte dieser Varietäten, welche zur Schnittzeit des Hafers, zur Kirschenreife bzw. rund um den 15. August (großer Frauentag, Maria Himmelfahrt) liegen dürfte.

Die Titulierung *Birne klein, gelb* rührt vom äußeren Erscheinungsbild, *Honigbirne* (siehe unten) wiederum primär vom Geschmack der Früchte her.

*Neubirne* könnte sich vom Zeitpunkt der Pflanzung des jeweiligen Baumes im betreffenden Streuobstgarten ableiten.

Einzig *Nagovitzer* stellt eine korrekte Sortenbezeichnung dar, wobei nur die Schreibweise zu bekritteln wäre, die korrekt *Nagowitz* bzw. *Nagowitzer* (LÖSCHNIG et al. 1912, GRILL & KEPPEL 2005) zu lauten hätte.

Tatsächlich stellt, wie man in Kapitel 3.3 erfährt, diese Kultivargruppe Einzelindividuen dar, die alle der Birnensorte *Nagowitzer* zuzurechnen sind.

Das Ersetzen richtiger durch synonyme Sortennamen findet sich aber nicht nur in den Erhebungsbögen wieder, auch die Nennungen der Obstgenbanken sind keinesfalls frei von solchen Lokalbezeichnungen.

Bei den Birnenproben *Purharthofer früh* und *Purharthofer spät* aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) handelt es sich wohl um Varietäten, die im Obstgarten eines Herrn/einer Frau Purharthofer aufgefunden und in der Obstgenbank, ohne genauere Bestimmung, veredelt und weiterkultiviert wurden. Die einzige Spezifität, die sich aus diesen Bezeichnungen ableiten lässt, wäre der jeweilige Reifezeitpunkt der Früchte der einzelnen Aufsammlungen, der sich entweder als *früh* oder *spät* im Jahr darstellen dürfte.

Interessant ist ebenfalls die oftmalige Nennung *Fleischbirne*, die in erster Linie Proben aus der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten) charakterisiert. Neben dem mehrmaligen Auftreten dieser Bezeichnung in unterschiedlichen Kultivargruppen ist vor allem die Tatsache erwähnenswert, dass es sich bei dieser Betitelung um keinen korrekten pomologischen Sortennamen handelt. Nach LÖSCHNIG 1913 dürfte es sich hierbei um die Lokalbezeichnung für die Mostbirnensorte *Welsche Bratbirne* handeln, was aber wiederum ihr Vorkommen in unterschiedlichen Kultivargruppen nicht erklärt und somit die Annahme einer nicht eindeutigen pomologischen Charakterisierung unterstreicht.

Somit hat, wie bei den Apfelvarietäten, die Einbeziehung von Probenmaterial aus Genbanken den Zweck einer Erleichterung der Charakterisierung und Bestimmung unbekannter Aufsammlungen nicht erfüllt.

Als vorerst letztes Ergebnis der Analyse der in Tab. 8 aufgelisteten Varietäten mit ihren spezifischen Mikrosatellitenlängen wird das Auftreten gleicher Sortenbezeichnungen in unterschiedlichen Kultivargruppen, also mit divergierender Allelkomposition, vorgestellt. Diese Erscheinung trat auch bei verschiedenen Apfelkultivaren (z. B. *Maschanzker*) auf und wurde bereits bei der Nennung *Fleischbirne* kurz angerissen.

Als Beispiele für diese heikle Sachlage wären Nennungen wie *Lederbirne*, *Kaiserbirne*, *Mostbirne* und *Honigbirne* anzuführen.

Auf der einen Seite könnte diese Problematik, wie bei der Apfelsortenbezeichnung *Maschanzker* auf die große Bekanntheit dieser Sortennamen zurückzuführen sein. Dies ist hier aber weitgehend auszuschließen, da es sich bei den oben angeführten Birnennamen um keine korrekten pomologischen Bezeichnungen handelt, sondern vielmehr um reine Sammelbezeichnungen unterschiedlichster Varietäten aufgrund sich ähnelnder innerer und äußerer Fruchtmerkmale bzw. Verwendungszwecke.

Die *Lederbirne* zeigt sich, nach LÖSCHNIG et al. 1912 und LÖSCHNIG 1913 als Lokalbezeichnung für die Sorten *Gute Graue*, *Späte Rotbirne* und *Rote Lederbirne*. Das ausschlaggebende Charakteristikum für die Zusammenfassung dieser Sorten zur Sammelbezeichnung *Lederbirne* dürfte wohl starke Berostung, d. h. Verkorkung der Fruchtschale sein.

Die *Kaiserbirne* stellt sich nach LÖSCHNIG et al. 1912 als eine Sammelbezeichnung für verschiedene Butterbirnsorten (schmelzendes Fruchtfleisch) dar. Dies wären die *Weißer Herbstbutterbirne*, *Napoleons Butterbirne (Grüne Kaiserbirne)*, *Diels Butterbirne (Große Kaiserbirne)* und *Holzfarbige Butterbirne (Doppelte Kaiserbirne, Kaiser von Österreich)*. Die Bezeichnung Kaiserbirne deutet auf außergewöhnlich schmackhafte Butterbirnsorten hin, die selbst die anspruchsvollen kulinarischen Bedürfnisse eines Kaisers befriedigen konnten.

*Mostbirnen* bezeichnen Sorten, die sich besonders für die Obstweinerzeugung eignen und umfassen nach LÖSCHNIG 1913 über 100 verschiedene Varietäten.

Letztendlich wäre noch die Sammelbezeichnung *Honigbirne* näher erklärt. Dabei handelt es sich nach LÖSCHNIG 1927 um Frühbirnensorten, die sich „vor allem durch gelblichweißes, grünlichgelbliches oder rein gelbliches Fruchtfleisch und honigsüßen, häufig schwach gewürzten Geschmack ohne Herbe“ auszeichnen. Auch hier werden mehrer Sorten wie z. B. die *Sommerhonigbirne* oder die *Zimtbirne* angeführt.

Die Auflistung der diese Sammelbezeichnungen zusammensetzenden Birnensorten verdeutlicht und erklärt die Ergebnisse der genetischen Charakterisierung.

Eine Gruppe von Birnenvarietäten, die nur aufgrund ähnlicher äußerer und/oder innerer Fruchtmerkmale zu einer Sammelbezeichnung zusammengefasst werden, kann sich nicht in ihren genetischen Merkmalen (Mikrosatellitenlängen) entsprechen, da es sich ja um unterschiedliche Sorten handelt. Dies erklärt das Vorkommen dieser Sammelbezeichnungen in mehreren verschiedenen Kultivargruppen.

Wie beim Apfel scheint auch bei den 180 aufgesammelten Birnenvarietäten die Verwendung von 3 spezifischen Birnenmikrosatelliten auszureichen um eine entsprechend genetische Sortendifferenzierung zu erreichen bzw. um die gegenwärtige genetische Diversität alter Birnensorten festzustellen. So konnten anhand der Allelkompositionen der untersuchten Varietäten 86 Kultivargruppen voneinander unterschieden werden.

Neben der Enthüllung synonymmer Sortenbezeichnungen als Mitglieder ein und derselben Kultivargruppe und somit ihre Festlegung als dieselbe Sorte, war vor allem die Aufspaltung der Birnen-Sammelbezeichnungen, welche in unterschiedlichen Kultivargruppen wieder zu finden waren, als ein Beweis für die Differenzierungsqualität der 3 selektierten Birnenmikrosatelliten anzusehen.

Die Verifizierung der über Erhebungsbögen oder Angaben in Obstgenbanken erhaltenen pomologischen Bezeichnungen für die aufgesammelten Birnenvarietäten stellt sich jedoch, im Vergleich zum Apfel, als viel schwieriger dar.

Auf der einen Seite wird dies in der wesentlich geringeren Verbreitung und Bedeutung dieser Kernobstsorten im bzw. für das Untersuchungsgebiet begründet, was auf der einen Seite ein Defizit an pomologischer Fachkenntnis im Bereich der Birne nach sich zieht, andererseits die Substitution korrekter pomologischer Sortennamen durch Lokalbezeichnungen begünstigt.

Diese Tatsachen spiegeln sich leider auch häufig in den von den Obstgenbanken kultivierten und von uns in die genetische Charakterisierung miteinbezogenen Birnenproben wider. So war, wie auch bei den Apfelproben, die Involvierung dieser Sortenaufsammlungen hinsichtlich einer Erleichterung der Bestimmung und korrekten pomologischen Benennung unbekannter Birnenvarietäten nicht von Erfolg gekrönt.

Die weitere Vorgehensweise für die Gewährleistung einer korrekten Bestimmung und pomologischen Benennung alter Birnensorten erfährt man im Kapitel 3.3.

### 3.3 Referenzsortendatenbanken für Apfel und Birne

Die Differenzierung und Charakterisierung alter Apfel- (*Malus x domestica* BORKH.) Birnen- (*Pyrus communis* L.) Varietäten mittels jeweils 3 spezifischen Mikrosatelliten stellte den Inhalt des Kapitels 3.2 dar.

Das Ergebnis dieser genetischen Charakterisierung verkörpern spezifische Mikrosatellitenlängen für jede von uns untersuchte Aufsammlung. Dieser methodische Zugang ermöglicht eine Sortenbeschreibung und Differenzierung unabhängig von äußeren, natürlichen oder anthropogen bedingten Einflüssen.

Dies ist bei der auf pomologischen Kennzeichen basierenden Sortendifferenzierung nicht der Fall. Trotz sorgfältigster Untersuchung und Dokumentation von Fruchteigenschaften wie deren Form, Größe, Kernhausbeschaffenheit, Ausprägung von Grund- und Deckfarbe, Pflück- und Genussreife sowie des Geschmacks sind diese Merkmale als nicht beständig zu betrachten, sondern werden unterschiedlich stark von der Umwelt (z. B. Bewirtschaftungsmaßnahmen) in ihrer Ausprägung beeinflusst (Kapitel 1.1).

Letztendlich prägt aber auch das jeweilige Anbaugebiet, in welchem die verschiedenen Varietäten kultiviert werden, die Ausbildung der sortentypischen Fruchtmerkmale. Die Kultivare werden mit unterschiedlichsten Standortansprüchen konfrontiert, auf welche sie innerhalb ihres genetischen Potentials mit ökophysiologischer Variation reagieren.

Dieses Phänomen der phänotypischen Varianz (GABER 1994), welche wohl die herausragendste Rolle hinsichtlich Ungereimtheiten in der Sortenbestimmung spielt, konnte durch die Anwendung der Mikrosatellitenmethode als genetische und damit von äußeren Einflüssen unabhängige Charakterisierungsmethode eliminiert werden.

Das Auftreten von Zufallssämlingen, Spontan auftretenden Sprossmutationen sowie von durchgewachsenen Unterlagen, welche in den verschiedenen Obstgärten aufgrund ihrer Fruchteigenschaften weiterkultiviert werden, konnte ebenfalls beobachtet werden. Da es sich in allen drei Fällen meist um, aufgrund unterschiedlicher Einflüsse (Kapitel 1.3), neu entstandene Sorten handelt, konnten diese genetisch, aufgrund ihrer Allelkomposition, von anderen Aufsammlungen unterschieden werden. Da diese Proben naturgemäß meist nur in den „Entstehungs-Obstgärten“ aufgefunden werden, stellen sie Kultivargruppen mit nur einem Mitglied dar.

Die weite Verbreitung lokaler und synonyme Sortenbezeichnungen für ein und dieselbe Kernobstvarietät wurde schon mehrmals erwähnt. Auch diese Anforderung an den Verfasser dieser Diversitätsstudie konnte mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode und der Verwendung 3er spezifischer SSRs gelöst werden. Aufsammlungen gleicher Mikrosatellitenlängen, mit zum Teil recht originellen Bezeichnungen, bilden ein und dieselbe Kultivargruppe und stellen sich so als die gleiche Kernobstsorte dar.

Gerade bei der Birne konnte das Auftreten von Sammelbezeichnungen für verschiedene Varietäten aufgedeckt werden. Die diese Sammelbezeichnungen zusammensetzenden Einzelsorten konnten durch die Mikrosatellitenmethode voneinander unterschieden und so unterschiedlichen Kultivargruppen zugeordnet werden.

Die Differenzierungskapazität der 3 spezifischen Apfel- und Birnenmikrosatelliten ist also als ausreichend anzusehen.

Ein bis dahin ungelöstes Problem stellen allerdings die korrekten pomologischen Sortennamen für die durch gleiche Allelkomposition definierten Kultivargruppen dar, also deren Bestimmung im eigentlichen Sinn.

Dazu muss vorerst der Begriff der Bestimmung geklärt werden. Dafür werden folgende Beispiele als Definitionen angeführt.

Nach DER BROCKHAUS 1997 lautet diese: „Unter Bestimmung versteht man in der Biologie das Erkennen einer dem Betrachtenden unbekannt, aber bereits beschriebenen Pflanze oder eines Tieres“; in unserem Fall wäre dies die Kernobstsorte.

Die Internet Enzyklopädie WIKIPEDIA 2008 liefert folgende Erklärung: „Bestimmung ist in der Biologie der Vorgang, einem Organismus (.....) einen bereits existierenden Namen zuzuordnen.

Für die Bestimmung alter Kernobstsorten sind also zwei Voraussetzungen zu erfüllen.

Einerseits müssen die Kernobstsorten zuvor schon pomologisch, z. B. über ihre Fruchtmerkmale, beschrieben worden sein, also in einer obstsortenkundigen Abhandlung eine entsprechende Berücksichtigung erfahren haben. Die zweite Voraussetzung ist die Zuweisung eines klar definierten und sich von anderen Varietäten unterscheidenden Sortennamens.



Die Bestimmung alter Kernobstvarietäten besteht also in einem Vergleich der vorliegenden Merkmale mit jenen von bereits in pomologischen Werken beschriebenen und, bei Übereinstimmung, einer Zuweisung des entsprechenden Sortennamens.

Die Inkonsistenz der Varietäten hinsichtlich der beschriebenen pomologischen Merkmale macht es notwendig, ein neues Kriterium, die Mikrosatellitenlängen als ein von der Umwelt unabhängiges Sortencharakteristikum einzuführen. Dieses Ansinnen war, wie in Kapitel 3.2 ausführlich behandelt, mit Erfolg gekrönt.

Damit war aber das Problem der Vergabe korrekter Sortennamen noch nicht gelöst.

Vorerst gingen wir davon aus, dass durch die Berücksichtigung von Probenmaterial aus Obstgenbanken dieser Herausforderung dahingehend begegnet werden kann, dass die jeweiligen Aufsammlungen mit korrekten Sortennamen versehen sind und so als zuverlässige Referenzen hinsichtlich korrekter pomologischer Nomenklatur dienen. Dies war aber, wie im Kapitel 3.2 beschrieben, nicht der Fall.

Zusätzlich sei erwähnt, dass die Sortenzusammenstellungen in den involvierten Genbanken auf pomologischem Niveau, also primär auf Fruchtmerkmalen, basieren, was zusätzlich eine gewisse Fehlerquelle (siehe phänotypische und genotypische Varianz) in der Ausweisung dieser Varietäten birgt.

Somit war es notwendig, eine genetische Referenzsortendatenbank, welche sich auf Mikrosatellitenlängen der einzelnen Kultivargruppen bezieht, zu erstellen.

Die Grundsätze der „klassischen“ Bestimmung werden auch hier nicht verletzt.

Die Determination von Kernobstorten besteht in einem Vergleich zu der auf analytischem Wege erhaltenen Charaktere unbekannter Varietäten, Mikrosatellitenlängen, mit jenen von bereits sowohl genetisch wie nomenklatorisch definierten Referenzsorten.

Damit wurde die Gründung einer Referenzsortendatenbank auf Basis der Mikrosatellitenlängen vollzogen, deren Erstellung im Folgenden, getrennt für Apfel und Birne, behandelt wird.

### 3.3.1 Referenzsortendatenbank für Apfel

Die Ergebnisse der genetischen Charakterisierung alter Apfelsorten mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode wurden im Kapitel 3.2.1 behandelt.

Durch die Anwendung von nur 3 spezifischen Apfel-SSRs war es möglich, unter den 651 aufgesammelten Proben, 248 Varietäten zu unterscheiden.

Aus diesen 248 Varietäten waren nun jene Kultivargruppen auszuwählen, welche sich für die Erstellung einer Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau eignen.

Grundsätzlich ist zwischen einfachen (136) und komplexen (112) Kultivargruppen zu unterscheiden. Für die Erstellung einer Referenzsortendatenbank dienen prinzipiell nur komplexe Kultivargruppen, also wiederholte Aufsammlungen gleicher Allelkomposition.

Einfache Kultivargruppen können Zufallssämlinge, Sports oder durchgewachsene Unterlagen repräsentieren, oder Varietäten darstellen, die nur einmal im Untersuchungsgebiet vorkommen oder von uns nur einmal aufgesammelt wurden. All diese Eventualitäten unterbinden deren Verwendung als gesicherte, also sowohl genetisch wie auch nomenklatorisch definierte Referenzen, da sie entweder neue Sorten darstellen, die noch keine pomologische Beschreibung erfahren haben, oder, wie dies häufig der Fall ist, mit Lokalbezeichnungen versehen sind und deshalb keinerlei Rückschlüsse auf deren tatsächliche pomologische Identität zulassen.

Dessen ungeachtet sind solche Kultivargruppen trotzdem von großem Interesse, gerade wenn man sich die Entstehung von vielen alten Apfelsorten als Zufallssämlinge (z. B. *Kronprinz Rudolf*) vor Augen führt. So induziert das einmalige Auftreten solcher Aufsammlungen deren Bedeutung als speziell kleinräumig verbreitete Varietäten, was den Schluss zulässt, dass sich gerade solche Apfelkultivare optimal an lokale, besonders anspruchsvolle Lebens- und Umweltbedingungen angepasst haben und trotz oder gerade wegen der an sie gestellten ökologischen Anforderungen Frucht- und/oder Baumeigenschaften ausbilden, die für den jeweiligen Besitzer von Nutzen sind. Sie könnten also als ökologische Spezialisten angesehen werden, deren genauere Untersuchung und Beschreibung hinsichtlich genetischer und physiologischer Eigenschaften bedeutend wäre.

Unter den 248 sich in ihren Längen der 3 untersuchten Mikrosatelliten unterscheidenden Varietäten konnten 112 komplexe Kultivargruppen definiert werden.

Doch nicht jede dieser Kultivargruppen eignete sich auch als eine Referenzsorte (siehe unten).

Die Auswahl von Referenzsorten wird am Beispiel der Kultivargruppe *Geflammtter Kardinal* (Tab. 9) erklärt.

Kultivar	Mikrosatellitenlocus							
	CH01F02		CH02C06		CH02D12			
Kardinal Geflammtter	169	179	215	227	247	182	198	210
Tafelapfel	169	179	215	227	247	182	198	210
Zgodnja Kavcic	169	179	215	227	247	182	198	210
Strudelapfel	169	179	215	227	247	182	198	210
Geflammtter Kardinal	169	179	215	227	247	182	198	210
Chewill	169	179	215	227	247	182	198	210
Geflammtter Kardinal	169	179	215	227	247	182	198	210
Geflammtter Kardinal	169	179	215	227	247	182	198	210

Tab. 9: Kultivargruppe am Beispiel *Geflammtter Kardinal*

Die einzelnen Mitglieder dieser Kultivargruppe zeigen unterschiedliche geographische Herkunft. So stammt eine Apfelprobe aus der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten), zwei Proben aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg), je eine Apfelprobe wurde in den steirischen Kerngebieten Rein, Gröbming und Knittelfeld aufgefunden und zwei in Štajerska (Velenje bzw. Pleterje).

Neben dem Vorkommen in weit auseinander liegenden Obstbaugebieten, bzw. verschiedenen Obstgenbanken zeichnen sich die Aufsammlungen durch regionale (z. B. Strudelapfel) aber auch richtige Sortennamen (Geflammtter Kardinal) aus. Damit war es möglich, natürlich mit Hilfe historisch pomologischer Werke hinsichtlich fehlerfreier Schreibweise der korrekten Sortenbezeichnung (siehe Kapitel 1.3), dieser Kultivargruppe den Sortennamen *Geflammtter Kardinal* zuzuweisen.

Die Voraussetzung der Auswahl einer Kultivargruppe als Referenzsorte lag also im mehrmaligen Vorkommen der diese Kultivargruppe zusammensetzenden Aufsammlungen gleicher Allelkomposition in unterschiedlichen Regionen bzw. Obstgenbanken.

Diese strengen Auswahlkriterien wurden von 47 komplexen Kultivargruppen erfüllt. Zusätzlich zu diesen 47 ausgewählten Apfelsorten wurden noch die Varietäten *Jonathan* und *Schmidberger Renette*, jeweils Aufsammlungen aus dem Kerngebiet 1 (St. Stefan ob Stainz) der Steiermark, in der Auswahl der Referenzsorten mitberücksichtigt, da sie, obwohl nur als einfache Kultivargruppe vertreten, aufgrund ihrer pomologischen, also Fruchtcharakteristika eindeutig von fachkundigen Experten (Siegfried Bernkopf, Linz; Herbert Keppel, Graz) als ebendiese Sorten identifiziert wurden.

Der Anspruch einer zuverlässigen Referenz für die Bestimmung unbekannter Aufsammlungen war also genüge getan.

Das von äußeren Einflüssen unabhängige Sortencharakteristikum, Mikrosatellitenlänge, wurde mit richtiger pomologischer Namensgebung versehen.

Daraus ergibt sich eine Referenzsortendatenbank aus 49 alten Apfelsorten, die sich aufgrund ihrer genetischen Merkmale, Allele der 3 Mikrosatelliten, definieren (Tab. 10).

Kultivar	Mikrosatellitenlocus		
	CH01F02	CH02C06	CH02D12
Ananasrenette	183	241:249	190:198
Baumanns Renette	169:179	215:227	182:198
Berner Rosenapfel	181	233:249	198:206
Boikenapfel	179	215:233	198:200
Champagner Renette	183	249	190:200
Charlamowsky	171	205:251	176:198
Damasonrenette	179:183	233:243:253	182:198
Danziger Kantapfel	169	229:251	180:198
Geflammter Kardinal	169:179	215:227:247	182:198:210
Geheimrat Dr. Oldenburg	189	249	176:190
Gehrsers Rambur	169	215:227:249	198
Gelber Bellefleur	173:179	233:249	194:198
Goldrenette von Blenheim	183	241:249:257	198
Grahams Jubiläumsapfel	173	249	176:198
Graue Herbstrenette	179:183	233:243	182:198:200
Großer Rheinischer Bohnapfel	179:183	215:249	194:198
Grüner Stettiner	169	215:233:255	180:194:198

Hagedorn	179:183	215:251	176:198
Harberts Renette	183:185	241:249	180:198
Haslinger	169:179:183	249	176:182:190
Huberscher Mostapfel	169	247	198:204
Ilzer Rosenapfel	169	259	182:198
Jakob Lebel	179:187:195	227:237	176:182:198
Jonathan	169:179	233:249	190:198
Kalterer Böhmer	169	229:231	182:206
Kanada Renette	179	227:247	182:190:198
Kardinal Graf Galen	169	249	176:206
Karmeliter Renette	179:183	257	198
Klöcher Maschanzker	169:181	243:249	190:198:206
Kronprinz Rudolf	169:183	241:249	176:198
Landsberger Renette	183:189	237:251	176:190
Lavanttaler Bananenapfel	183	249	206:210
London Pepping	179	215	176:206
Odenwälder	169:193	249	176:198
Rheinischer Krummstiel	169:181	237:249	176:198
Rote Schafnase	169	229:231	198:204
Roter Herbstkalvill	173	249	182:198
Roter Jungfernapfel	169:179	215:249	198
Roter Stettiner	169:179:187	227:241	182:198
Roter Trierer Weinapfel	169	247	180:182
Sauergrauech	181:183	233:247	198
Schmidberger Renette	169:183	249	198:210
Signe Tillisch	189	215:251	176
Steirischer Maschanzker	169:181	249	198:206
Steirischer Passamaner	169:171	215:231	184:198
Wagener Apfel	169:181	249	180:206
Weißer Klarapfel	181:187	215:249	178:198
Weißer Winterkalvill	181	249	182:198
Wintergoldparmäne	183	237:249	198:210

Tab. 10: Allellängen der 49 Referenzapfelsorten. Nomenklatur nach GRILL & KEPPEL 2005.  
(modifiziert nach MONSCHEIN et al. 2006)

Von den 112 komplexen Kultivargruppen fanden nur 47 ihre Berücksichtigung in der Referenzsortendatenbank. Die übrigen 65 erfüllten die Kriterien – große geographische Verbreitung der Einzelproben *in situ* bzw. deren Vorkommen in mehreren Genbanken (*ex situ*) nicht.

Einen Sonderfall stellen die Kultivargruppen „*Brünnerling*“, „*Boskoop*“ und „*Gravensteiner*“ dar. Diese Fälle werden im Kapitel 3.4 ausführlich behandelt.

Die Erweiterung dieser Datenbank auf genetischem Niveau kann nur durch zusätzliche Aufsammlungen bzw. der Einbeziehung weiterer Obstgenbanken erfolgen.

Von den 136 einfachen Kultivargruppen fanden nur 2 Sorten den Einzug in die Referenzsortendatenbank.

Wie aber bereits darauf hingewiesen wurde, stellen diese Varietäten häufig recht kleinräumig verbreitete Sorten dar, die in besonderen, ökologisch anspruchsvollen Regionen vorkommen können und so nicht als weniger wichtig, sondern als erst noch eingehend zu untersuchend zu beurteilen sind.

Handelt es sich bei diesen einfachen Kultivargruppen um Proben, die von uns nur einmal aufgefunden wurden, könnte es natürlich auch durch zusätzliche Aufsammlungen im Untersuchungsgebiet bzw. der Einbeziehung mehrerer Obstgenbanken zu einer Klärung ihrer pomologischen Identität und einer Auszeichnung ihrerseits als Referenzsorten kommen.

Eine Referenzsortendatenbank ermöglicht die exakte Identifizierung unbekannter Aufsammlung über deren Allele in den untersuchten Mikrosatellitenloci.

Für das künftige Management einer Obstgenbank (*ex situ* Kultivierung) liefert diese Methode die Möglichkeit, von einer auf genetischen Daten basierenden Referenzsortendatenbank ausgehend, eine auserwählte und verifizierte Sammlung von alten Apfelsorten zu betreiben (HOKANSON et al. 1998), ohne Gefahr zu laufen, Mehrfachaufsammlung ein und derselben Sorte verwalten und pflegen zu müssen, was unnötig Kosten verursacht.

Weiters kann sich eine Genbank mit tatsächlich definiertem Sortenspektrum durch ein gezielt vorgenommenes Sammlungsmanagement komplementieren bzw. Varietäten mit anderen Genbanken austauschen.

Das Ziel ist eine sogenannte „Integrierten Genbank“, unter der man eine gezielte Sortenaufsammlung sowie die Analyse qualitativer und quantitativer Frucht- und Baumeigenschaften unter Berücksichtigung und Kombination der Methoden der Molekularbiologie und Biodiversitätsforschung mit den klassischen Techniken der *ex situ* Kultivierung sowie die standortgerechte Wiederauspflanzung sortenreicher Kernobstbäume versteht (HAMMER 2003).

Wie sich im Folgenden zeigen wird, stellt sich eine Referenzsortendatenbank auf Basis der Allellängen 3er Mikrosatelliten als durchaus angemessen dar, um damit unbekannte bzw. mit Lokalbezeichnungen versehene Varietäten zu bestimmen (Tab. 11)

Die Sorte *Baumanns Renette* wird, neben korrekter pomologischer Bezeichnung, auch als Kranzler, Türken rot, Nikolausapfel oder, in Slowenien, als Baumanova reneta geführt. Diese Lokalbezeichnungen lassen zwar teilweise Rückschlüsse auf die bevorzugte Verwendung der Früchte zu, z. B. Nikolausapfel, die Zuweisung einer korrekten Sortenbezeichnung ist aber dadurch nicht möglich. Erst der Vergleich der genetischen Merkmale (Mikrosatellitenlängen) dieser Aufsammlungen mit jenen von definierten Referenzsorten gewährleistet deren Bestimmung.

Als weitere Beispiele für die Bedeutung der Datenbank werden die Nennungen Steirischer Pogatschenapfel, Roter Pogatschenapfel, Haselapfel, Breitschädel, Brixner Plattling und, aus Slowenien, Pogačarica angeführt. All diese synonymen bzw. lokalen Sortenbezeichnungen stehen für die Sorte *Haslinger*. Vor allem die lokalen Bezeichnungen Breitschädel (aus der Steiermark) und Brixner Plattling (Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrums Laimburg, Südtirol) seien hier hervorgehoben. Sie beziehen sich auf die flachkugelige, mittelbauchige Fruchtform (BERNKOPF et al. 1996), die sie als eher breit bzw. platt geformt erscheinen lässt.

Eine Fülle an Lokalbezeichnungen finden wir für die Sorte *Roter Herbstkalvill*. Himbeerapfel, Erdbeerapfel, Roter Paradiesapfel und Herzapfel beziehen sich wohl auf die kräftig rote Ausprägung der Deckfarbe bzw. dem von der Fruchtschale ausgehend rötlich gefärbten Fruchtfleisch. Betitelungen wie Klachapfel, Klingler und Tschepperer rühren vom Schüttelgeräusch reifer Früchte her, da zu diesem Zeitpunkt die Kerne frei beweglich im Kernhaus vorliegen. Rdeči jesenski kalvil stellt die slowenische Bezeichnung dieser Sorte dar.

Butterapfel leitet sich von der Fruchtfleischfestigkeit (Textur) dieser Sorte ab, welche bei Genussreife als ausgesprochen weich gilt. Korrekt ist sie als *Weißer Klarapfel* zu bezeichnen.

Anhand dieser wenigen Beispiele kann man schon erkennen, wie schwierig die Bestimmung alter Apfelsorten ohne geeignete Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau wäre,

bzw. wie einfach die Änderung lokaler Sortenbezeichnungen in korrekte pomologische Sortennamen vonstatten geht.



Kultivar	Mikrosatellitenlocus		
	CH01F02	CH02C06	CH02D12
<b>Baumanns Renette</b>	169:179	215:227	182:198
Kranzler	169:179	215:227	182:198
Türken rot	169:179	215:227	182:198
Nikolausapfel	169:179	215:227	182:198
Baumanova reneta	169:179	215:227	182:198
<b>Haslinger</b>	169:179:183	249	176:182:190
Steirischer Pogatschenapfel	169:179:183	249	176:182:190
Roter Pogatschenapfel	169:179:183	249	176:182:190
Haselapfel	169:179:183	249	176:182:190
Breitschädel	169:179:183	249	176:182:190
Brixner Plattling	169:179:183	249	176:182:190
Pogačarica	169:179:183	249	176:182:190
<b>Roter Herbstkalvill</b>	173	249	182:198
Himbeerapfel	173	249	182:198
Erdbeerapfel	173	249	182:198
Klachlapfel	173	249	182:198
Roter Paradiesapfel	173	249	182:198
Herzapfel	173	249	182:198
Klingler	173	249	182:198
Tschepperer	173	249	182:198
Rdeči jesenski kalvil	173	249	182:198
<b>Weißer Klarapfel</b>	181:187	215:249	178:198
Butterapfel	181:187	215:249	178:198

Tab. 11: Beispiele für synonyme Sortenbezeichnungen. Korrekte Sortennamen sind fett geschrieben. Nomenklatur nach GRILL & KEPPEL 2005 (modifiziert nach MONSCHEIN et al. 2006).

### 3.3.2 Referenzsortendatenbank für Birne

Die Einführung einer Referenzsortendatenbank stellte sich bei der Birne als ungleich schwieriger dar als beim Apfel.

Der Grund dafür liegt im wesentlich geringeren historischen wie auch rezenten Stellenwert der Birne für das Untersuchungsgebiet was sich im viel geringeren Ausmaß der Nennungen dieser Kernobstsorte in den Erhebungsbögen widerspiegelt (Kapitel 3.2.2).

Von den 180 in die genetische Diversitätsstudie involvierten Birnenkultivare konnten insgesamt 86 Kultivargruppen mit Hilfe 3er spezifischer Birnenmikrosatelliten selektiert werden, wobei davon 27 als komplexe und 59 als einfache Kultivargruppen zu gelten haben.

Für die Auswahl von Referenzsorten eignen sich auch bei der Birne prinzipiell nur komplexe Kultivargruppen. Die Ursachen dafür wurden bereits unter Kapitel 3.3.1 entsprechend dargelegt.

Wie beim Apfel kann es sich bei diesen nur einmal unter den 180 Birnenproben vorkommenden Aufsammlungen aber um an besonders anspruchsvolle Umweltbedingungen optimal angepasste Varietäten handeln, weswegen eine Geringschätzung dieser Kultivargruppen sicher nicht zu empfehlen wäre, sondern nach genauen genetischen wie biochemischen Untersuchungen verlangt.

Die noch viel inkonsequenter Vergabe korrekter Sortennamen im Vergleich zum Apfel bzw. deren Ersatz durch Lokalbezeichnungen unterstreicht nur deren heute geringe Bedeutung für das Untersuchungsgebiet (Kapitel 3.2.2).

Ein speziell bei Birnen auftretendes Phänomen ist Verwendung von Sammelbezeichnungen für unterschiedliche Kultivare. Dadurch treten wiederholt gleiche Sortennennungen in unterschiedlichen Kultivargruppen auf, was es quasi unmöglich macht, diesen Gruppen korrekte Sortenbezeichnungen zuzuweisen. Der Grund dafür liegt in einer willkürlichen Zusammenfassung von Sorten unter einem „Sortennamen“ aufgrund der weitgehenden Entsprechung der Früchte dieser von der Erscheinung betroffenen Varietäten hinsichtlich innerer oder äußerer Fruchtmerkmale bzw. des Geschmackes (Kapitel 3.2.2).

Trotzdem wurde versucht, aus den 27 komplexen Kultivargruppen jene Birnensorten zu extrahieren, die sich für den Aufbau einer Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau als geeignet erweisen.

Als Grundvoraussetzung für die Auswahl einer komplexen Kultivargruppe als Referenzsorte lag, wie beim Apfel, im mehrmaligen Vorkommen der diese Gruppe zusammensetzenden Aufsammlungen gleicher Allelkomposition in unterschiedlichen Regionen bzw. Obstgenbanken.

Diesen Anforderungen entsprachen nur sehr wenige Birnenkultivargruppen, weswegen sie gemeinsam mit ihren Lokalbezeichnungen in Tab. 12 vorgestellt werden.

Kultivar	Mikrosatellitenlocus							
	NH013a		NH001c		KU10			
<b>Welsche Bratbirne</b>								
Fleischbirne 26	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne 30	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne 67	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Steirische Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Lederbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Scheiberbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Mostbirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Gruabirne	162	198	204	112	118	146	237	249
Gozdarski Zawod	162	198	204	112	118	146	237	249
Fleischbirne = Loarmbirn (Grüne Pichlbirne)	162	198	204	112	118	146	237	249
Kleine Landbirne (Grüne Landbirne)	162	198	204	112	118	146	237	249
<b>Schweizer Wasserbirne</b>								
Schweizer Wasserbirne	180	196	222	118	122	136	235	265
Schweizer Wasserbirne	180	196	222	118	122	136	235	265
Schneiderbirne	180	196	222	118	122	136	235	265
Schweizer Wasserbirne 72	180	196	222	118	122	136	235	265
Schweizer Wasserbirne	180	196	222	118	122	136	235	265
<b>Luxemburger Mostbirne</b>								
Luxemburger Mostbirne 7	180	196	222	118	148		241	
Luxemburger Mostbirne 54	180	196	222	118	148		241	
Luxemburger Mostbirne	180	196	222	118	148		241	
Luxemburger Mostbirne	180	196	222	118	148		241	
<b>Ungerbirne</b>								
Ungerbirne	186	198	226	112	138	144	249	261
Lehmbirne	186	198	226	112	138	144	249	261
<b>Nagowitz</b>								
Haferbirne	196	198		144			231	239
Honigbirne	196	198		144			231	239
Birne klein, gelb	196	198		144			231	239
Kerschbirne	196	198		144			231	239

Nagovitzer	196	198	144	231	239			
Honigbirne	196	198	144	231	239			
Frauenbirne (ev. Nagowitzter)	196	198	144	231	239			
Neubirne (Nagowitzter)	196	198	144	231	239			
<b>Hirschbirne</b>								
Herbstbirne std.	198	204	222	102	112	118	237	249
Obersteirische Herbstbirne std.	198	204	222	102	112	118	237	249
Hirschbirne	198	204	222	102	112	118	237	249
Seiling	198	204	222	102	112	118	237	249

Tab. 12: Referenzsorten Birne (fett, Nomenklatur nach LÖSCHNIG 1913 und GRILL & KEPPEL 2005) und deren synonyme Sortenbezeichnungen (Kultivarbezeichnung nach Angaben in Erhebungsbögen bzw. den jeweiligen Obstgenbanken).

Aufsammlungen der Referenzsorte *Welsche Bratbirne* stammen aus der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten) und aus unterschiedlichen Kerngebieten (St. Stefan ob Stainz, Eibiswald, Feldbach, Pöllau, Rein, Murau) der Steiermark. Die wiederholte Nennung des lokalen Sortennamens Fleischbirne sowie eingehende Studium der Mostbirnen nach LÖSCHNIG 1913, nach dessen Ansicht die Lokalbezeichnung Fleischbirne als Synonym für die *Welsche Bratbirne* gilt, ließ den Verfasser dieser Diversitätsstudie zur Ansicht kommen, dass Aufsammlungen dieser Kultivargruppe mit dem korrekten pomologischen Sortennamen *Welsche Bratbirne* zu versehen ist.

Die Kultivargruppen *Schweizer Wasserbirne* und *Luxemburger Mostbirne* stellten aufgrund der Einheitlichkeit der Nennungen ihrer Aufsammlungen bzw. dem Vorkommen der Einzelproben in unterschiedlichen Obstgenbanken (Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal; Kärnten und Obstgenbank Steiermark; Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) sowie deren *in situ* Verbreitung im Untersuchungsgebiet keine Probleme bei der Bestimmung und Festlegung des korrekten pomologischen Sortennamens dar.

Die *Ungerbirne* fand trotz ihres nur zweimaligen Vorkommens (Kerngebiet Pöllau und Kerngebiet Murau) innerhalb der 180 Birnenproben ihre Aufnahme in den Reigen der Referenzsorten. Verantwortlich dafür war deren eindeutige Identifizierung durch fachkundige Experten (Siegfried Bernkopf, Linz; Herbert Keppel, Graz).

Die Frühbirnensorte *Nagowitzer* stellt das klassische Beispiel einer Kultivargruppe mit Aufsammlungen dar, welche mit Lokalbezeichnungen versehen sind, die sich von Fruchtreife (z. B. Haferbirne) oder Fruchteigenschaften (z. B. Honigbirne) ableiten (Kapitel 3.2.2).

In diesem Zusammenhang wäre zu erwähnen, dass lokale Sortennamen nicht nur zu Unklarheiten bezüglich korrekter pomologischer Bestimmung beitragen. Durch die genaue Analyse dieser Bezeichnungen können sich erste Hinweise (z. B. Fruchtreife) hinsichtlich der Identität der Kernobstsorte, Apfel wie Birne, ergeben.

Eine der wenigen in der Steiermark heute auch ökonomisch bedeutenden Birnensorten stellt die *Hirschbirne* dar. Ihre Lokalbezeichnung Herbstbirne wäre eigentlich der richtige Sortenname, denn nach LÖSCHNIG 1913 leitet sich die Sortenbezeichnung *Hirschbirne* von Herbstbirne ab, da aber *Hirschbirne* als allgemein gebräuchlich gegolten hat und gilt, wird dieser Sortenname beibehalten. Neben Aufsammlungen aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) stammt Probenmaterial sowohl aus der Obersteiermark (Kerngebiet Gröbming) wie auch aus dem Kerngebiet Pöllau, wo die *Hirschbirne* heute die vorherrschende Birnenvarietät darstellt.

Von 27 komplexen Kultivargruppen der Birnen konnten nur 6 als Referenzsorten definiert werden.

Die geringe Bedeutung der Birne für das Untersuchungsgebiet - reflektiert durch das Erhebungsergebnis, welches die Analyse von nur 180 Varietäten dieser Kernobstsorte ermöglichte - sind wohl die maßgeblichsten Gründe für diesen eher bescheidenen Umfang der Referenzsortendatenbank für Birnen.

Die Auswahl von nur 6 Referenzsorten begrenzt natürlich auch ganz entscheidend die durch sie mögliche Bestimmung unbekannter bzw. mit lokalen Sortenbezeichnungen versehener Birnenproben.

Durch weitere Aufsammlungen und genetische Analysen könnten jedoch die verbleibenden 21 komplexen Kultivargruppen auf das Niveau einer Referenzsorte gehoben werden (siehe Voraussetzung für die Auswahl von Referenzsorten).

Die 59 als Einzelvarietäten auftretenden Proben könnten ebenfalls durch erneute Aufsammlungen im Untersuchungsgebiet bzw. der Involvierung weiterer Genbanken als Referenzsorten anerkannt werden, oder, wenn es sich um genetische Varianten handelt

(GABER 1994), durch weiter genetische wie biochemische Untersuchungen ihren besonderen Stellenwert als ökologische Spezialisten untermauern.

All dies zeigt aber, dass gerade auf dem Gebiet der Birnenbestimmung noch eine Reihe von umfassenderen Erhebungen nötig sind, um gegebenenfalls den Status einer ausreichend großen Datenbank auf genetischer Basis zu erreichen. Die Verwendung von 3 spezifischen Mikrosatelliten stellte sich jedoch, wie beim Apfel als durchaus ausreichend dar.

### **3.4 Grenzen der genetischen Sortendifferenzierung mittels Mikrosatelliten**

Der Zugang, die gegenwärtige genetische Diversität alter Apfel- und Birnensorten mittels der Mikrosatellitenmethode aufzudecken, stellte sich, wie in den vorangegangenen Kapiteln belegt, als durchaus richtig dar.

So konnten durch die Verwendung von nur jeweils 3 spezifischen Apfel- und Birnenmikrosatelliten die Probleme der traditionellen pomologischen, also primär auf Fruchtmerkmalen basierenden Sortenbestimmung gelöst werden.

Verschiedene Lokalbezeichnungen für ein und dieselbe Kernobstvarietät wurden aufgrund ihrer Entsprechung in den genetischen Merkmalen (Mikrosatellitenlängen) als die gleiche Sorte identifiziert.

Die fälschliche pomologische Bestimmung und Benennung unterschiedlicher Sorten als Folge der phänotypischen Varianz (GABER 1994) konnte ebenfalls durch die Verwendung von, von äußeren Einflussfaktoren, unabhängigen Charakteristika (Mikrosatellitenlängen) aufgedeckt werden.

Die Zuweisung korrekter Sortennamen zu den jeweiligen Kultivargruppen erfolgt mit Hilfe einer auf genetischen Kriterien (Allelkomposition) beruhenden Referenzsortendatenbank.

Eine Sonderstellung nahmen die unterschiedlichen Formen der genotypischen Varianz ein. Während Zufallssämlinge und durchgewachsene Unterlagen ohne weiteres als einfache, sich in ihrem genetischen Muster von all den anderen Aufsammlung unterscheidende Kultivargruppen zu definieren waren (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2), musste bei der Untersuchung von Populationssorten und Farbmутanten (Spontan auftretende Sprossmutation), welche speziell bei den Apfelproben auftraten (Kapitel 3.2.1), eine gewisse Grenze des Differenzierungspotentials der Mikrosatellitenmethode festgestellt werden.

Im Folgenden wird die Vorgehensweise hinsichtlich dieser Herausforderungen beschrieben.

Als Beispiel für die genetische Variante der Populationssorten wird die Gruppe der „Brünnerlinge“ behandelt, Farbmутanten werden durch die „Boskoop“- und die „Gravensteiner“-Gruppe vertreten.

Die Tab. 13 zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse der Untersuchung und Auswertung unterschiedlicher Apfelproben mit Hilfe der 3 Mikrosatelliten CH01F02, CH02C06 und CH02D12 (siehe Tab. 7).

Durch die Zusammenfassung der Aufsammlungen gleicher Merkmale (Längen) in den untersuchten Mikrosatelliten ergaben sich die drei komplexen Kultivargruppen „Brünnerlinge“, „Boskoop“ und „Gravensteiner“.

Die Einzelproben der „Brünnerling“-Gruppe stammen aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) bzw. aus Slowenien (Kerngebiet Kamnik und Pleterje) und entsprechen einander in ihrer Allelkomposition.

Damit waren eigentlich die Kriterien für die Auswahl einer Kultivargruppe als Referenzsorte, mehrmaliges Vorkommen der diese Kultivargruppe zusammensetzenden Aufsammlung gleicher Allelkomposition in unterschiedlichen Regionen bzw. Obstgenbanken, erfüllt. Allerdings konnte aus den einzelnen Sortenbezeichnungen die korrekte pomologische Nomenklatur nicht abgeleitet werden, ganz im Gegenteil.

Das Studium einschlägiger pomologisch historischer Werke (z. B. LÖSCHNIG et al. 1912) verdeutlichte das Dilemma hinsichtlich Vergabe eines korrekten Sortennamens zu dieser Kultivargruppe.

So beschreiben LÖSCHNIG et al. 1912 die Brünnerlinge als „eine Reihe von Spielarten, die sich sowohl durch die Frucht als auch im Baume voneinander unterscheiden lassen“, und zwar: *Kleiner Brünnerling*, *Oberösterreichischer Brünnerling*, *Böhmischer Brünnerling*, *Oberösterreichischer Passamauer* und *Welsch-Brunner*. Der Begriff Spielart spiegelt schon eine weitgehende Entsprechung der diese Gruppe zusammensetzenden Varietäten hinsichtlich ihrer Frucht- und Baumeigenschaften wider, was natürlich deren pomologische Bestimmung entsprechend erschwert.

Als Beispiele dafür werden die offenkundigen Fruchtmerkmale Form und Farbe der diese Gruppe zusammensetzenden Varietäten, nach LÖSCHNIG et al. 1912, vorgestellt.

Der *Kleine Brünnerling* weist eine flachrunde Fruchtform auf, in der Farbe ist er den übrigen Spielarten ähnlich, doch schwächer punktiert. Die Früchte des *Oberösterreichischen Brünnerling* sind von plattrunder bis hochaussehender Form mit lebhafter, doch etwas lichterer Färbung als beim kleinen Brünnerling. Der *Böhmische Brünnerling* zeigt eine hochgebaute Fruchtform, von ähnlicher Färbung wie der Oberösterreichische Brünnerling, doch mit



deutlicher brauner und lichter Punktierung. Die Früchte des *Oberösterreichischen Passamaner* sind flachkugelförmig, die rote Färbung ist dunkler, die Punktierung rötlich oder rot umsäumt. Schließlich gilt es noch den *Welsch-Brunner* vorzustellen. Seine Früchte sind flach gebaut, dem Oberösterreichischen Brünnerling ähnlich, mit schwachen Rostfiguren und großen Punkten in der roten Färbung.

Beim Studium dieser Charakteristika wird zweierlei deutlich.

Einerseits weisen die beschriebenen Charaktere nur marginale Unterschiede zwischen den „Spielarten“ der Brünnerlinge auf. Andererseits wurde bereits im Kapitel 1.1 darauf hingewiesen, dass es eine Reihe von Umweltfaktoren gibt, die diese pomologischen Merkmale ganz beträchtlich in ihrer Ausprägung beeinflussen können (phänotypische Varianz). So wären der Boden, Anbau- und Kulturmaßnahmen, Klima, Höhenlage der Kultivierung und Behangdichte der Obstbäume als Beispiele zu nennen.

Die pomologische Differenzierung und Bestimmung dieser Aufsammlungen stellt sich daher häufig als äußerst schwierig dar.

Dass sich diese „Spielarten“ jedoch auch genetisch durch die Verwendung 3er spezifischer Apfelmikrosatelliten nicht voneinander unterscheiden lassen, war einigermaßen überraschend.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der „Boskoop“-Gruppe. Auch diese Zusammenstellung weist Einzelaufsammlungen unterschiedlicher Herkunft (Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal, Kärnten; unterschiedliche Kerngebiete der Steiermark; Obstgenbank Steiermark, Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) auf, welche sich durch gleiche Mikrosatellitenlängen hervortun.

Doch auch in diesem Fall war die Auszeichnung dieser Kultivargruppe als Referenzsorte aufgrund fehlender Eindeutigkeit hinsichtlich der Zuweisung eines Sortennamens nicht möglich. Dass es sich um einen „Boskoop“ handelt war klar, aber um welchen?

KRÜMMEL et al. 1964 unterscheiden pomologisch zwischen einem *Schönen von Boskoop* und seiner rotfrüchtigen Mutante, dem *Roten Boskoop*. Der Unterschied zwischen diesen beiden Varietäten liegt vor allem in der Ausprägung der Deckfarbe, welche beim *Schönen von Boskoop* nur etwa  $\frac{1}{4}$  bis zur  $\frac{1}{2}$  der Fruchtoberfläche einnimmt und als orange bis rot

beschrieben wird. Beim *Roten Boskoop* nimmt die Deckfarbe eine rote bis dunkelrote Ausprägung an und überzieht flächig fast die ganze Fruchtoberfläche.

Die Ausweisung dieser beiden Varietäten (*Schöner von Boskoop*, *Roter Boskoop*) als eigene Sorten ist vor allem durch deren Unterschied im wohl augenfälligsten pomologischen Charakterisierungsmerkmal - Deckenfarbenausprägung - nicht verwunderlich, dass jedoch auch im Falle der „Boskoop“-Gruppe eine genetische Unterscheidung dieser beiden Kultivare mit Hilfe der ansonsten hinsichtlich Sortendifferenzierung erprobten Mikrosatelliten verwährt blieb, wahr ebenfalls als außergewöhnlich zu bezeichnen.

Die dritte Gruppen bilden die „Gravensteiner“. Die einzelnen Proben dieser Gruppe stammen aus der Obstbauversuchsanlage St. Andrä im Lavanttal (Kärnten), aus den Kerngebieten Eibiswald, Gröbming, Knittelfeld, Murau und St. Marein im Mürztal und aus der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg). Auch hier ist geographische Verbreitung dieser Varietät als nicht gerade gering anzusehen.

Trotzdem konnte auch diese Kultivargruppe keine Referenzsorte bilden. Die Eindeutigkeit des Vorkommens der Nennung Gravensteiner täuscht darüber hinweg, dass es sich bei den Aufsammlungen, laut pomologischer Literatur (OBERDIECK 1881, KRÜMMEL et al. 1964) um zwei unterschiedliche Sorten handeln kann, und zwar um den Gravensteiner und seine rote Sprossmutante den Roten Gravensteiner, der sich durch eine viel intensivere Deckfarbenausprägung auszeichnet. Eine Sortendifferenzierung mittels der 3 Mikrosatelliten gelang auch in diesem Fall nicht.

Kultivar	Mikrosatellitenlocus		
	CH01F02	CH02C06	CH02D12
<b>Brünnerlinge-Gruppe</b>			
Debela Vahna	169:179	249	180:198:200
Debela vahna	169:179	249	180:198:200
Großer Brünnerling	169:179	249	180:198:200
Welschbrunner	169:179	249	180:198:200
Welschbrunner	169:179	249	180:198:200
Großer Brünnerling	169:179	249	180:198:200
Großer Brünnerling	169:179	249	180:198:200

<b>Boskoop-Gruppe</b>			
Boskoop Schöner von	183	227:237	180:194
Wagenerapfel	183	227:237	180:194
Winterrhambour Rheinischer	183	227:237	180:194
Schöner von Boskoop	183	227:237	180:194
Schöner von Boskoop	183	227:237	180:194
Lederapfel	183	227:237	180:194
Roter Boskoop	183	227:237	180:194
Roter Boskoop	183	227:237	180:194
Schöner von Boskoop	183	227:237	180:194
Boskoop	183	227:237	180:194
<b>Gravensteiner-Gruppe</b>			
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Roter Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Schmalzapfel	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212
Gravensteiner	181:183	215:249	198:212

Tab. 13: Allelkomposition Angehöriger der „Brünnerling“- , „Boskoop“- und „Gravensteiner“-Gruppe. Kultivarbezeichnungen nach Angaben in Erhebungsbögen bzw. den jeweiligen Obstgenbanken. Verwendete Mikrosatelliten: CH01F02, CH02C06 und CH02D12.

Mehrmals schon wurde darauf hingewiesen, dass die Entscheidung, nur 3 spezifische Mikrosatelliten für die Bestimmung der genetischen Diversität alter Apfel- und Birnensorten zu verwenden, durchaus begründet war.

Einerseits wurde diese Vorgehensweise mit der methodischen Durchführung der automatisierten Fragmentanalyse mit Hilfe des ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) gerechtfertigt, andererseits bildete die Publikation von GIANFRANCESCHI et al. 1998 die theoretische Grundlage für diese Praktik (Kapitel 3.2).

In der Arbeit von GIANFRANCESCHI et al. 1998 wird betont, dass die Verwendung von nur 2 selektierten Mikrosatelliten ausreichte, um alle in der Studie involvierten Apfelnkultivare (bis auf zwei) genetisch voneinander unterscheiden zu können.

Diese zwei nicht zu unterscheidenden Proben stellen die Varietäten *Starking* und *Red Delicious* dar, wobei *Starking* die somatische Mutante von *Red Delicious* mit verbesserter, intensivierter Deckfarbenausprägung verkörpert (GIANFRANCESCHI et al. 1998).

Wie wir bereits im Kapitel 1.3 erfahren haben, lassen sich „Spontan auftretende Sprossmutationen“ ebenfalls auf somatische (nicht die Keimzellen betreffende) Mutationen im Knospenbereich zurückführen, deren vegetative Vermehrung (Veredelung) zu einer neuen Varietät führen kann (GABER 1994).

Daher wäre die Entstehung der Sorte *Starking* als „Spontan auftretende Sprossmutation“ zu definieren.

Was hat das mit der Differenzierungsqualität der verwendeten Mikrosatelliten zu tun?

Das äußere Erscheinungsbild (z. B. Deckfarbenausprägung), also der Phänotyp der Kernobstsorten wird prinzipiell durch den Genotyp festgelegt, genauer gesagt durch die Genexpression, also der Manifestierung der genetischen Information.

Wie wir bereits erfahren durften, können Mikrosatelliten die Transkription, die Überschreibung der genetischen Information von DNA auf RNA beeinflussen, und zwar durch deren Vorkommen in den Promoterregionen der jeweiligen Gene, bzw. durch deren längenabhängige Bindung von Transkriptionsfaktoren (KASHI & SOLLER 1999).

Daraus leitet sich folgende Hypothese ab.

Kommt es durch Mutationen zu Veränderungen in den Mikrosatellitenlängen, so kann dies eine Modifikation des Phänotyps (z. B. Deckfarbenausprägung) aufgrund sich ändernder Transkriptionsbedingung nach sich ziehen (KASHI et al. 1997, KASHI & SOLLER 1999).

Wird nun, wie in unserem Fall, nur eine sehr begrenzte Anzahl an Mikrosatelliten zur genetischen Differenzierung alter Apfelsorten herangezogen, so kann es dazu kommen, dass gerade jene Bereiche des Genoms (Mikrosatelliten), welche von einer somatischen Mutation betroffen sind und diese Veränderung des Phänotyps bedingen, in der Analyse nicht

berücksichtigt werden. Folglich kommt es dadurch zu keiner genetischen Differenzierung von Wildtyp und Mutanten.

Diese Annahme wird auch von GIANFRANCESCHI et al. 1998 unterstützt, indem sie klarstellen, dass die Veränderung der Deckfarbenausprägung nur durch eine oder wenige kleine Mutationen bedingt wird. Damit ist es nicht überraschend, dass die genetische Unterscheidung von *Starking* und *Red Delicious* durch die Verwendung von nur 2 selektierten Mikrosatelliten misslang, da die mutierten SSRs in der Differenzierungsstudie nicht inkludiert waren.

Um jetzt wieder auf unsere Problemstellung der „Brünnerling“- , „Boskoop“- und „Gravensteiner“-Gruppe zurückzukommen, so dürften deren Einzelaufsammlungen aufgrund ihrer nur geringfügigen Unterschiede in den pomologischen Charakteristika (siehe oben) wohl auch genetische Varianten, also durch eine oder wenige somatische Mutationen hervorgerufene Modifikationen darstellen.

Dieser theoretische Hintergrund veranlasste uns, die einzelnen Aufsammlungen der „Brünnerling“- und „Boskoop“-Gruppe mit weiteren 3 Mikrosatelliten zu untersuchen, um somit die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, jene SSRs involviert zu haben, die die somatischen Mutationen, also eine Längenänderung erfahren haben. Über die Detektion der verschieden langen Mikrosatelliten der Aufsammlungen innerhalb der betreffenden Kultivargruppen wäre schließlich eine genetische Unterscheidung der Mutanten möglich.

Durch die Ähnlichkeit der Sachlage bei der „Boskoop“- und „Gravensteiner“-Gruppe (unterschiedlich intensive Deckfarbenausprägung der Einzelaufsammlungen) wurde aus zeitlichen wie ökonomischen Gründen nur die „Boskoop“-Gruppe als Vertreter der Farbmутanten weiter untersucht.

Dafür wurden folgende 3 Mikrosatelliten von LIEBHARD et al. 2002 ausgewählt: CH01C06, CH02b10 und CH03a04. Die methodische Durchführung entsprach jener der schon verwendeten Mikrosatelliten und wird unter Kapitel 2.7 ausführlich behandelt.

Mit einiger Überraschung mussten die Ergebnisse dieses weiteren Differenzierungsversuchs zur Kenntnis genommen werden (Tab. 14).

Kultivar	Mikrosatellitenlocus		
	CH01C06	CH02b10	CH03a04
<b>Brünnerlinge-Gruppe</b>			
Debela Vahna	159:161	118:128:130	111:113
Debela vahna	159:161	118:128:130	111:113
Großer Brünnerling	159:161	118:128:130	111:113
Welschbrunner	159:161	118:128:130	111:113
Welschbrunner	159:161	118:128:130	111:113
Großer Brünnerling	159:161	118:128:130	111:113
Großer Brünnerling	159:161	118:128:130	111:113
<b>Boskoop-Gruppe</b>			
Boskoop Schöner von	157:161	118:120:122	89:111
Wagenerapfel	157:161	118:120:122	89:111
Winterrhambour Rheinischer	157:161	118:120:122	89:111
Schöner von Boskoop	157:161	118:120:122	89:111
Schöner von Boskoop	157:161	118:120:122	89:111
Lederapfel	157:161	118:120:122	89:111
Roter Boskoop	157:161	118:120:122	89:111
Roter Boskoop	157:161	118:120:122	89:111
Schöner von Boskoop	157:161	118:120:122	89:111
Boskoop	157:161	118:120:122	89:111

Tab. 14: Allelkomposition Angehöriger der „Brünnerling“- und „Boskoop“-Gruppe. Kultivarbezeichnungen nach Angaben in Erhebungsbögen bzw. den jeweiligen Obstgenbanken. Verwendete Mikrosatelliten: CH01C06, CH02b10 und CH03a04

Alle Varietäten der „Brünnerling“- und „Boskoop“-Gruppe entsprachen einander in den durch die Fragmentanalyse erhaltenen Mikrosatellitenlängen.

So zeigten auch die 3 zusätzlich in die genetische Analyse involvierten Mikrosatelliten keine verbesserte Differenzierungskapazität hinsichtlich Populationssorten und Farbmutanten. Damit konnten keine neuen Erkenntnisse bezüglich Sortenzugehörigkeit der diese Gruppen zusammensetzenden Aufsammlungen gewonnen werden.

Jetzt stellte sich die Frage der weiteren Vorgehensweise. Sollten zusätzliche Mikrosatelliten auf ihre Differenzierungskapazität hinsichtlich dieser Kultivargruppen getestet werden? Sind derartige somatische Mutationen überhaupt durch die Anwendung dieser Art genetischer Marker zu unterscheiden?

Eine Antwort darauf finden wir in der Publikation von GOULAO & OLIVEIRA 2001. Sie attestieren, dass somatische Mutationen bzw. die Kultivare, die aus solchen hervorgegangen sind, durch Mikrosatelliten nicht unterscheidbar sind.

Damit wurden unsere Beobachtungen bestätigt. Die Verwendung weiterer Mikrosatelliten war also als nicht zielführend zu bewerten.

Doch warum lassen sich nun somatische Mutanten nicht durch die Mikrosatellitenmethode voneinander unterscheiden.

Die Erklärung dafür liefert VENTURI et al. 2006.

Vorerst versuchte diese Forschungsgruppe, somatische Mutanten von *Gala* und *Braeburn* mit 24 Mikrosatelliten-Primerpaaren zu unterscheiden. Trotz der Detektion von 64 Allelen war es nicht möglich, die Mutanten voneinander bzw. vom Wildtyp zu differenzieren.

Dieser Sachverhalt liegt laut VENTURI et al. 2006 darin begründet, dass sich somatische Mutationen von der Insertion von Retrotransposons (Transposons, die RNA als mobile Zwischenstufe verwenden) ableiten lassen.

Diese Retrotransposons, bzw. Variationen in den flankierenden DNA-Bereichen der Retrotransposon-Insertions-Seite, lassen sich nur mit Hilfe sogenannter S-SAP-Marker (sequence-specific amplified polymorphism) nachweisen.

Durch die Anwendung dieser Marker war es für VENTURI et al. 2006 möglich, alle untersuchten Mutanten von *Gala* und *Braeburn* untereinander und von den Original-Varietäten zu unterscheiden.

Die Konsequenzen aus diesen neu gewonnenen Erkenntnissen bezüglich begrenzter Differenzierungskapazität von Mikrosatelliten stellen sich wie folgt dar.

Kernobstkultivare, welche aus Spontan auftretenden Sprossmutationen (somatischen Mutationen) hervorgegangen sind, lassen sich durch die Mikrosatellitenmethode nicht voneinander unterscheiden. Dies fällt aber gerade bei der Untersuchung der genetischen Diversität alter Apfel- und Birnensorten nicht so sehr ins Gewicht.

Die Form der gezielten Obstzüchtung anhand von Sports („Mutationszüchtung“, KEPPEL et al. 1998) gewann erst in letzten Jahrzehnten an Bedeutung. Ein Vorteil der Vermehrung solcher somatischen Mutanten liegt vor allem darin, dass sie sich häufig nur in einem phänotypischen Charakter vom Wildtyp unterscheiden, all die anderen wünschenswerten Sorteneigenschaften bleiben erhalten (z. B. *Royal Gala* und *Galaxy* als Knospenmutanten mit stärker ausgeprägter Deckfarbe als deren Wildtyp *Gala*).

Damit kann aber davon ausgegangen werden, dass sich Phänomene wie Populationssorten und Farbmутanten nur in einem sehr geringen Umfang innerhalb des alten Sortenspektrums präsentieren. Dies zeigen auch unsere Untersuchungen, die quasi nur die „Brünnerling“- , „Boskoop“- und „Gravensteiner“-Gruppe als somatische Mutanten ausweisen.

Da von uns jedoch die genetische Differenzierung dieser Kultivare mit Hilfe von S-SAP-Markern nicht durchgeführt wurde, werden bei der Definition des gegenwärtigen Kernobstspektrums im Untersuchungsgebiet diese Gruppen zu den Sorten *Brünnerlinge*, *Boskoop* und *Gravensteiner* zusammengefasst.

Die fehlende Differenzierungskapazität der Mikrosatelliten hinsichtlich somatischer Mutationen hat aber durchaus auch positive Konsequenzen.

So wurden wir in unserer grundsätzlichen Beschränkung auf nur 3 spezifische Mikrosatelliten zur Feststellung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten in der Steiermark und Teilen Sloweniens bestärkt. Auch die Verwendung eines größeren Primersets (mehr SSRs) hätte keine weitere Unterscheidung der 651 Apfel- und 180 Birnenaufsammlungen nach sich gezogen (3.2.1, 3.2.2), vor allem hinsichtlich von aus spontan auftretenden Mutationen hervorgegangener Varietäten.

Die Grenzen der genetischen Sortendifferenzierung mittels Mikrosatelliten werden nicht primär quantitativ, also durch die Anzahl der Mikrosatelliten, sondern qualitativ, durch die spezifische Auswahl der SSRs bestimmt.

Überdies sind aber auch jene Prozesse zu berücksichtigen, die die Umwandlung des jeweiligen Genotyps und letztendlich die Ausbildung eines neuen Phänotyps bedingen können: Mutationen in den Mikrosatellitenlängen oder Insertionen von Retrotransposons. Diese unterschiedlichen Formen der genetischen Modifikation sind nur unter Zuhilfenahme entsprechender Marker festzustellen (siehe oben).



Abgesehen von der Genese genetischer und phänotypischer Varianten alter Kernobstsorten stellen gerade diese Modifikationen die Basis für die Fähigkeit der Besiedelung unterschiedlichster ökologisch anspruchsvoller Lebensräume dar, gerade wie wir sie in der Steiermark für die Kulturlandschaft Streuobstwiese mit ihren alten Kernobstsorten vorfinden.

### 3.5 Das Kernobstsortenspektrum im Untersuchungsgebiet

Mit Hilfe der Mikrosatellitenmethode und der Verwendung von 3 spezifischen SSRs konnten von den 651 Apfelaufsammlungen 248 Varietäten voneinander unterschieden werden. Die Birnen waren mit 180 Proben in dieser Diversitätsstudie vertreten, eine Differenzierung in 86 Kultivargruppen konnte verwirklicht werden.

Im Folgenden wird das Kernobstsortenspektrum bzw. die Diversität alter Apfel- und Birnensorten im Untersuchungsgebiet (Steiermark und Teile Sloweniens) genauer betrachtet. Die primären Ziele dieses Kapitels sind die Beantwortung der Frage, wie viele Varietäten tatsächlich heute noch in den jeweiligen Kerngebieten vorkommen, und welche Faktoren diese rezente Verteilung beeinflussen.

Die Kernobstsorten Apfel und Birne werden getrennt voneinander behandelt.

#### 3.5.1 Apfelvarietäten in der Steiermark und Teilen Sloweniens

Wie bereits in den Kapitel 2.1 und 2.2 beschrieben, wurde das Untersuchungsgebiet in unterschiedliche Kerngebiete eingeteilt.

In der Steiermark finden wir die 10 Kerngebiete mit folgender Nummerierung:

1	St. Stefan ob Stainz	6	Rein
2	Eibiswald	7	Gröbming
3	Straden	8	Knittelfeld
4	Feldbach	9	Murau
5	Pöllau	10	St. Marein im Mürztal

Slowenien wurde in 8 Kerngebiete gegliedert:

1	Velenje	5	Pleterje
2	Šmartno	6	Tržič
3	Jareninski	7	Kamnik
4	Podsreda	8	Muta

Bezüglich der Bezeichnung der diese Kerngebiete zusammensetzenden Apfelvarietäten wurde wie folgt vorgegangen.

Stellen diese Varietäten Mitglieder von Kultivargruppen dar, die als Referenzsorten definiert wurden, so erhalten sie den jeweils korrekten pomologischen Referenzsortennamen.

Handelt es sich um Kultivargruppen, die aufgrund der im Kapitel 3.3.1 angeführten Gründe den Status einer Referenzsorte nicht erhalten haben, so werden die Aufsammlungen mit der Sortenbezeichnung versehen, wie sie den jeweiligen Erhebungsbögen zu entnehmen waren.

Die Brünnerlinge, Boskoop und Gravensteiner werden als „*Brünnerling*“-Gruppe, „*Boskoop*“-Gruppe und „*Gravensteiner*“-Gruppe ausgewiesen (siehe Kapitel 3.4).

In der Steiermark wurden über die 10 Kerngebiete verteilt 221 Apfelkultivare aufgesammelt. Unter diesen Aufsammlungen konnten mit Hilfe 3er spezifischer Mikrosatelliten 113 Varietäten unterschieden werden (Tab. 15). Diese 113 Apfelkultivare lassen sich wie folgt in unterschiedliche Kategorien einteilen.

36 Varietäten stellen Referenzsorten dar, die „*Gravensteiner*“- und „*Boskoop*“-Gruppen sind als Zusammenfassungen somatischer Mutanten gleicher Mikrosatellitenlängen zu verstehen, 75 genetisch differenzierte Varietäten der Steiermark konnten den Status einer Referenzsorte nicht erreichen bzw. konnten aufgrund ihrer Allelkomposition keiner Referenzsorte zugewiesen werden, sie werden mit jener Sortenbezeichnung versehen, welche in den Erhebungsbögen angeführt wurden.

Bei der Analyse der Tab. 15 werden vor allem 2 Fragen aufgeworfen.

Welche Sorten kommen in welchen Kerngebieten bevorzugt vor und welches Kerngebiet zeichnet sich durch besonders große Apfelsortendiversität aus.

Die gegenwärtige Sortenverteilung wird vornehmlich durch 3 Faktoren bedingt.

Als wichtigster Punkt ist die Widerstandskraft der Sorten hinsichtlich der an sie gestellten edaphischen und klimatischen Ansprüche anzuführen, die anthropogene Beeinflussung der Kulturlandschaft Streuobstwiese durch Intensivierung der Obstproduktion spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle wobei insgesamt die geschichtliche Entwicklung des Obstbaus in der Steiermark in der Reflektion bezüglich der in der Tab. 15 dargestellten Ergebnisse zu berücksichtigen wäre.







<b>Landsberger Renette</b>										
Wintergravensteiner										
Herrenapfel										
Moling										
<b>„Boskoop“-Gruppe</b>										
Birnapfel										
<b>Wintergoldparmäne</b>										
<b>Goldrenette von Blenheim</b>										
<b>Ananasrenette</b>										
Gelbe Baumann Renette										
<b>Champagner Renette</b>										
<b>Lavanttaler Bananenapfel</b>										
<b>Signe Tillisch</b>										
Cox Orange										
Perlrenette										
Glockenapfel										
Gestreifter Taubenapfel										
<i>Anzahl der Apfelvarietäten/Kerngebiet</i>	<i>24</i>	<i>9</i>	<i>14</i>	<i>19</i>	<i>15</i>	<i>19</i>	<i>19</i>	<i>17</i>	<i>26</i>	<i>20</i>

Tab. 15: Apfelvarietäten der Steiermark.

Referenzsortennamen bzw. „Gravensteiner“- und „Boskoop“-Gruppe fett. Übrige Sortenbezeichnungen entsprechen den Angaben in den Erhebungsbögen.

Die Steiermark lässt sich prinzipiell in zwei für den Obstbau unterschiedlich geeignete Regionen einteilen.

Die Süd-, Ost- und Weststeiermark bietet mit mildem Klima, ausreichenden Niederschlägen, tiefgründigen Böden und langen Vegetationsperioden optimale Kulturbedingungen für den Streuobstbau (FAULAND et al. 2005). In unserer Einteilung der Steiermark entspricht das in etwa den Kerngebieten 1 – 6.

In der Obersteiermark erfolgt Streuobstbau vor allem entlang der Flusstäler Enns, Mur und Mürz sowie in den jeweiligen Seitentälern (FAULAND et al. 2005). In besonderen Gunstlagen, z. B. Südexposition, kann der Streuobstwiesenbau jedoch in diesen Regionen bis auf 1300 m

vordringen (KEPPEL et al. 2002, FUSSI 2003). In unserer Studie wird diese sowohl klimatisch wie edaphisch anspruchsvolle Region mit den Kerngebieten 7 – 10 vertreten.

Die Widerstandskraft und Anpassungsfähigkeit einer Apfelsorte bezüglich der an sie gestellten ökologischen Anforderungen spielt naturgemäß eine große Rolle hinsichtlich der gegenwärtigen geographischen Verbreitung einer Varietät.

Sorten mit großer ökologisch physiologischer Amplitude wären z. B. die *Baumanns Renette*, der *Rheinische Krummstiel*, der *Steirische Maschanzker*, der *Kronprinz Rudolf*, der *Grahams Jubiläumsapfel*, der *Rote Herbstkalvill*, der *Große Rheinische Bohnapfel* sowie Mitglieder der „Gravensteiner“- (*Gravensteiner* und *Roter Gravensteiner*) und der „Boskoop“-Gruppe (*Schöner von Boskoop* und *Roter Boskoop*). Sie zeichnen sich durch ihr Vorkommen in ökologisch unterschiedlich anspruchsvollen Regionen aus (siehe Tab. 15).

Den beschriebenen Generalisten sind die so genannten Spezialisten gegenüberzustellen, Sorten, welche nur in engen geographischen Gefilden ihre rezente Verbreitung finden.

Zurückführen lässt sich diese Tatsache auf spezielle Frucht- und Baumeigenschaften der Varietäten (z. B. Frostempfindlichkeit).

Die nach GRILL & KEPPEL 2005 als frostempfindlich beschriebene Sorte *Kanada Renette* findet sich in Tab. 15 auch nur im Kerngebiet 1 wieder, einer für den Streuobstbau optimal geeigneten Region. Einen anderen Fall repräsentiert die Sorte *Danziger Kantapfel*. Diese Varietät gilt als besonders frosthart. So konnte sie sich in den Kerngebieten 9 und 10 bis heute behaupten, in der Süd-, Ost- und Weststeiermark konnte sie von uns nicht mehr gefunden werden.

Dies leitet schon auf einen weiteren Grund des Vorkommens von regionalen Spezialisten in der gegenwärtigen Sortenverteilung über. Regionen, die prinzipiell gute Kultivierungsgebiete für Streuobstwiesen darstellen, sind es auch für den Intensivobstbau. So wurden viele Sorten, welche grundsätzlich eine Verbreitung über die gesamte Steiermark aufwiesen, aus diesen Gunstlagen verdrängt und durch ein „modernes“ Sortensortiment ersetzt. Die trifft auf die bereits genannte Sorte *Danziger Kantapfel* zu, aber auch der *Rote Herbstkalvill*, welcher heute hauptsächlich in der Obersteiermark kultiviert wird, wäre ein gutes Beispiel für diese anthropogene Beeinflussung der heutigen regionalen Sortendiversität in der Steiermark.



Der Entstehungsort einer Sorte stellt ebenfalls einen Einflussfaktor hinsichtlich seiner gegenwärtigen Verbreitung dar. Der *Ilzer Rosenapfel* entstammt dem Ort Ilz in der Oststeiermark. So zeigt er auch einen eher süd- ost- und weststeirischen Verbreitungsschwerpunkt, in der Obersteiermark wurde er nicht aufgefunden, obwohl er prinzipiell eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Frost aufweist (GRILL & KEPPEL 2005).

Letztendlich wäre auch noch das Auswahlkriterium „Reifezeitpunkt der Früchte“ für die Anpflanzung und Kultivierung einer speziellen Sorte anzuführen.

In der Obersteiermark werden neben widerstandsfähigen wohl nur jene Sorten kultiviert, deren Früchte in einer kurzen Vegetationszeit auch entsprechend reif werden können. Die trifft vor allem auf die „*Gravensteiner-Gruppe*“ zu, deren Früchte Ende August bis Anfang September reif werden und so auch noch in für den Obstbau ungünstigeren Lagen ein ausgewogenes und sortenspezifisches Inhaltsstoffspektrum (z. B. Zucker, Säuren, Phenole) ausbilden können.

Die historische Bedeutung des Obstbaus für die Steiermark hinterlässt natürlich auch heute noch seine Spuren im vorliegen Apfelsortiment. Dieser Tatsache spiegelt sich in vielen Übereinstimmungen mit dem Landes-Normal-Apfel-Sortiment aus dem Jahre 1904 wider (Kapitel 1.2).

Bei der Betrachtung der Kerngebiete lässt sich folgende Reihung nach Anzahl der Apfelvarietäten pro Kerngebiet anstellen:

Murau > St. Stefan ob Stainz > St. Marein im Mürztal > Gröbming = Rein = Feldbach  
> Knittelfeld > Pöllau > Straden > Eibiswald

Interessant ist vor allem, dass nicht primär die Regionen, welche aufgrund ihrer edaphischen und klimatischen Gegebenheit optimal für den Streuobstbau geeignet sind, auch die größte Sortenvielfalt aufweisen. Es sind dies, außer St. Stefan ob Stainz, Gebiete der Obersteiermark: Murau, St. Marein im Mürztal und Gröbming.

Verantwortlich dafür ist in erster Linie die Ausweitung von Intensivobstanlagen in der Süd-, Ost- und Weststeiermark, welche auf Kosten der extensiven Streuobstwiesen vor sich ging. Damit einhergehend ist natürlich auch ein Verlust der Diversität an alten Apfelsorten zu beklagen.

Die Obersteiermark eignet sich aufgrund ihrer anspruchsvollen ökologischen Bedingungen nicht so gut für den Intensivobstbau, so konnte sich dort zum Teil das angestammte Apfelsortenspektrum halten. Zusätzlich bieten diese Regionen aber auch Rückzugsgebiete für ehemals in der gesamten Steiermark vorkommende Varietäten (siehe oben).

Weiters finden sich gerade in der Obersteiermark eine Reihe von Kultivaren, die keine Referenzsorten darstellen, aber, wie im Kapitel 3.3.1 ausgeführt, deshalb nicht zu vernachlässigen sind. Sie könnten Zufallssämling, Sports oder durchgewachsene Unterlagen repräsentieren und, aufgrund ihrer Kultivierung, in diesen obstbaulich anspruchsvollen Regionen als ökologische Spezialisten gelten. Als Beispiele sind der *Zitronenapfel*, eine als *Roter Jungfernapfel* titulierte Sorte, *Plattapfeltyp*, *Strudelapfel*, verschiedene *Mostäpfel*, *Traubenapfel*, *Woazapfel*, *Birnapfel* usw. zu nennen. Die genaue Untersuchung dieser Aufsammlungen hinsichtlich ihrer genetischen und physiologischen Eigenschaften wäre daher unbedingt notwendig und auch im Hinblick auf etwaige Neuzüchtungen, welche gerade für raue Klimate geeignet sein sollen, zielführend.

Aus Slowenien wurden 51 Apfelaufsammlungen aus 8 Kerngebieten in diese Diversitätsstudie miteinbezogen. Von diesen Kultivaren konnten 25 Sorten unterschieden werden. 11 Varietäten präsentieren sich als Referenzsorten, 14 Aufsammlungen konnten den Status einer Referenzapfelsorte nicht erreichen (Tab. 16).

Bis zum ersten Weltkrieg (1914 – 1918) war die Region Štajerska Teil der Österreich-Ungarischen Monarchie und damit auch Teil der dieses Gebiet betreffenden obstbaulichen Maßnahmen (siehe Kapitel 1.2). Daher ist es vor allem von großem Interesse festzustellen, welche alten Apfelsorten sich nach so langer Zeit in den Teilen Sloweniens erhalten haben, ob es Übereinstimmungen im Sortiment Sloweniens mit jenem der Steiermark gibt und wodurch sich mögliche Unterschiedlichkeiten ergeben haben könnten.

Wenn man sich nochmals das Landes-Normal-Apfel-Sortiment des Steiermärkischen Landesausschusses aus dem Jahre 1904 vor Augen hält (siehe Kapitel 1.2), so lässt sich eine klare Gliederung des „Obstbaugebietes Steiermark“ in ein Oberland und Mittelland (heutige Steiermark) bzw. ein Unterland (Štajerska, Tab. 17) erkennen.

Apfelvarietäten	Kerngebiete Sloweniens							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kasseler Renette							•	
<b>Haslinger</b>		•						
<b>Geflammtter Kardinal</b>	•				•			
<b>„Brünnerling“-Gruppe</b>					•		•	
<b>Rheinischer Krummstiel</b>					•			•
<b>Steirischer Maschanzker</b>	•	•	•	•	•			•
Debela Vahna, Dolenjska voščenska					•		•	
<b>Kronprinz Rudolf</b>	•		•	•	•		•	•
Rumenček							•	
Maschanzker, Puhovka				•	•			
Zinka			•					
Medenček					•			
Geflammtter Kardinal							•	
<b>Großer Rheinischer Bohnapfel</b>		•		•	•		•	•
<b>Damasonrenette</b>							•	
<b>Boikenapfel</b>							•	
Zgodnja zinsko Kavčič					•			
Dolenjska voščenska							•	
Roter Mostapfel								•
Rote Frühsorte	•							
Kirarjeva			•					
Priol Delicious			•					
<b>Weißer Winterkalvill</b>					•			
Železmičarka		•						
<b>Wintergoldparmäne</b>					•			
<i>Anzahl der Apfelvarietäten/Kerngebiet</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>4</i>	<i>12</i>	<i>0</i>	<i>10</i>	<i>5</i>

Tab. 16: Apfelvarietäten Sloweniens.

Referenzsortennamen bzw. „Brünnerling“-Gruppe fett. Übrige Sortenbezeichnungen entsprechen den Angaben in den Erhebungsbögen.

Für Štajerska wurden folgende Sorten angeführt:

### III. Für das Unterland

mit dem unteren Mur-, dem Pösnitz-, Drau (Drava)-, Sann (Savinja)- Save (Sava)- und Sotlatalale

a) zur allgemeinen Anpflanzung

1. Charlamovsky

**2. Geflammtter Kardinal**

**3. Kanada Reinette**

**4. Baumanns Reinette**

5. Damason Reinette

6. Ribston Pepping

**7. Steirischer Wintermaschanzker**

**8. Großer Rheinischer Bohnapfel**

Mostäpfel

9. Huber'scher Mostapfel

b) für besondere Standorte

**10. Gelber Bellefleur**

**11. Ananas Reinette**

12. Lichtenwalder Wachsapfel

13. London Pepping

14. Champagner Reinette

Tab. 17: Auszug aus Tab. 1. Zusammenstellung des Landes-Normal-Apfel-Sortiments nach der Reifezeit geordnet (STEIERMÄRKISCHER LANDES-AUSSCHUSS 1904), (die fettgedruckten Sorten sind besonders empfehlenswert)

Im, durch unsere genetischen Analysen festgestellten rezenten Apfelsortenspektrum Sloweniens finden sich heute noch folgende Varietäten aus dieser Zeit: *Geflammtter Kardinal*, *Damasonrenette*, *Steirischer Maschanzker* und *Großer Rheinischer Bohnapfel*.

Allerdings finden sich zusätzlich auch noch Sorten, die im Jahre 1904 nicht unbedingt für die damalige Untersteiermark empfohlen wurden, sich offensichtlich aber für diese Region als vorteilhaft erwiesen: *Haslinger*, „*Brünnerling*“-Gruppe, *Rheinischer Krummstiel*, *Kronprinz Rudolf*, *Boikenapfel*, *Weißer Winterkalvill* und *Wintergoldparmäne*. Diese Sorten könnten trotz politischer Teilung der ehemals zusammengehörenden Regionen aus der Steiermark nach Slowenien gelangt sein oder aus benachbarten Gebieten (Kroatien oder Italien) stammen.

Die übrigen Aufsammlungen können nun wieder Zufallssämlinge, Sports oder durchgewachsene Unterlagen darstellen, die aufgrund ihrer Frucht- und Baumeigenschaften weiterkultiviert wurden und so entsprechend bedeutend für den jeweiligen Besitzer sind. Ob es sich um „lokale Spezialisten“ handelt, wäre sicher noch zu untersuchen, wobei gerade in Slowenien weitere Aufsammlung unbedingt notwendig wären, um so eine umfangreichere Probezahl zu erreichen bzw. mehrere Referenzsorten ausweisen zu können.

Die größte Sortendiversität stammt aus dem Kerngebiet 5, Pleterje. In Pleterje wurden ein alter Sortengarten eines Kartäuser-Klosters von uns beprobt, welcher nur ausnahmsweise von klosterexternen Männern besucht werden durfte. Das dort kultivierte Sortiment an alten Apfel- und Birnensorten wurde über Jahre hinweg zusammengetragen und in Form eines Sortengartens erhalten.

Abschließend wäre noch der Vergleich der gegenwärtigen steirischen Apfeldiversität mit jener aus Slowenien anzustellen.

Die Diversität an alten Apfelsorten in der Steiermark ist wesentlich höher als die in Slowenien. Begründet wird dies vor allem mit der wesentlich größeren Probenzahl, welche in der Steiermark verteilt über 10 Kerngebiete aufgesammelt wurde. In Slowenien wurde nur stichprobenartig das gegenwärtige Apfelsortiment, anhand von 8 Sortengärten, in diese Diversitätsstudie miteinbezogen.

Von den 11 Referenzsorten, die sich im Sortiment Sloweniens wiederfinden, sind 2 nur dort vorhanden. Es handelt sich um die Sorten „*Brünnerling*“-Gruppe und *Weißer Winterkalvill*. Einzigartig für die Steiermark sind die Referenzsorten *Steirischer Passamaner*, *Baumanns Renette*, *Roter Jungfernapfel*, *Klöcher Maschanzker*, *Schmidberger Renette*, *Grüner Stettiner*, *Danziger Kantapfel*, *Roter Trierer Weinapfel*, *Huberscher Mostapfel*, *Kardinal Graf Galen*, *Ilzer Rosenapfel*, *Charlamowsky*, *Gelber Bellefleur*, *Grahams Jubiläumsapfel*, *Roter Herbstkalvill*, *Jakob Lebel*, *London Pepping*, *Kanada Renette*, „*Gravensteiner*“-Gruppe, *Weißer Klarapfel*, *Berner Rosenapfel*, *Harberts Renette*, *Landsberger Renette*, „*Boskoop*“-Gruppe, *Goldrenette von Blenheim*, *Ananasrenette*, *Champagner Renette*, *Lavanttaler Bananenapfel* und *Signe Tillisch*.

Für das gegenwärtige Spektrum alter Apfelsorten im Untersuchungsgebiet spielen sowohl die edaphischen wie klimatischen Ansprüche der jeweiligen Obstbauregion an die Varietäten eine wesentliche Rolle. Die anthropogene Beeinflussung der Kulturlandschaft Streuobstwiese sowie die geschichtliche Entwicklung des Obstbaus in der Steiermark und Teilen Sloweniens sind ebenfalls für das Ausmaß und die geographische Verteilung der Vielfalt alter Sorten verantwortlich.

Zusätzliche Aufsammlungen zur Schaffung einer umfassenden Referenzsortendatenbank, sowie die Untersuchung der sich als einzeln darstellender Varietäten (Zufallssämlinge, Sports,

durchgewachsene Unterlagen) sowohl in genetischer wie biochemischer Hinsicht wären Aufgaben der Zukunft.

### 3.5.2 Birnenvarietäten in der Steiermark und Teilen Sloweniens

Wie für die Apfelproben gilt auch für die Birnen die gleiche Einteilung und Nummerierung des Untersuchungsgebietes in Kerngebiete (Kapitel 3.5.1).

Wie schon mehrmals betont wurde, stellt sich der historische Stellenwert der Birne im Sinne systematischer Obstzüchtung als wesentlich geringer dar als beim Apfel (HARTMANN 2003). Dies spiegelt sich vor allem in der spärlichen Nennung dieser Kernobstsorte in den Erhebungsbögen wider und spielt eine wesentliche Rolle bei der Definition von Referenzbirnensorten (Kapitel 3.3.2).

In der Steiermark wurden 91 Birnenproben aufgesammelt und mittels 3er spezifischer Birnenmikrosatelliten untersucht. Mit Hilfe dieser genetischen Sortendifferenzierungsmethode wurden 54 Birnenvarietäten voneinander unterschieden (Tab. 18).

5 dieser Kultivare konnten als Referenzsorten identifiziert werden, die übrigen 49 Birnenvarietäten stellen Einzelaufsammlungen dar bzw. entsprachen in ihren Mikrosatellitenlängen keiner Referenzsorte und wurden deshalb mit ihren aus den Erhebungsbögen stammenden Sortenbezeichnungen versehen.

Trotz des geringeren Probenumfangs wird im Folgenden versucht, die Kausalitäten für das präferierte Vorkommen bestimmter Sorten in einzelnen Kerngebieten zu ergründen. Die quantitative Reihung der Kerngebiete nach ihrer Birnensortendiversität wird ebenfalls diskutiert und jener der Äpfel gegenübergestellt.

Von den 5 vorgefundenen Referenzbirnensorten *Welsche Bratbirne*, *Schweizer Wasserbirne*, *Ungerbirne*, *Nagowitz* und *Hischbirne* zeichnen sich vor allem 2 Varietäten als eher anspruchslos an den jeweiligen Standort bzw. sehr widerstandsfähig gegenüber unterschiedlichste edaphische und klimatische Bedingungen aus.

Dies wären die Sorten *Welsche Bratbirne* und *Nagowitz*.

Bei der *Welschen Bratbirne* handelt es sich nach LÖSCHNIG 1913 um eine Mostbirnensorte, die mit einer Fülle unterschiedlichster Lokalbezeichnung im Untersuchungsgebiet vertreten ist (Kapitel 3.3.2). Der Baum wird nach LÖSCHNIG 1913 als anspruchslos beschrieben, der noch

in rauesten Lagen über 1000 m Seehöhe gedeiht. Auch KEPPEL et al. 1998 beschreiben Mostbirnensorten als geeignet für die Kultivierung in rauen Lagen.

Die Früchte der *Welschen Bratbirne* reifen je nach Lage zwischen Ende September und Mitte Oktober. Damit wird auch die Voraussetzung eines eher frühen Fruchtreifezeitpunktes für die Kultivierung in, durch kurze Vegetationsperioden gekennzeichnete Regionen erfüllt.

Außerdem eignet sich die Sorte vorzüglich zur Mostbereitung („Stainzer Most“, LÖSCHNIG 1913).

All diese Frucht- und Baumeigenschaften spiegeln sich auch in der rezenten Verbreitung dieser Birnensorte wider.

So wird sie sowohl in Obstbaugebieten vorgefunden, die prinzipiell eine gute Eignung für den Streuobstwiesenbau aufweisen, wie St. Stefan ob Stainz, Eibiswald, Feldbach, Pöllau und Rein. Daneben wird diese Sorte aber auch in der Obersteiermark (Murau) kultiviert, einer Region mit eher anspruchsvollen Verhältnissen (z. B. Frost, kurze Vegetationsperioden) für den Obstbau.

Als zweites Beispiel wäre hier die Tafelbirnensorte *Nagowitzer* vorzustellen. LÖSCHNIG et al. 1912 beschreiben sie als eine äußerst bescheidene Sorte hinsichtlich ihrer Standortansprüche. Sie gedeiht ebenso gut im trockenen Boden des Weinklimas, wie in rauen Lagen. Die Früchte reifen Ende Juli bis Anfang August, auch dies ein Kriterium für die Verbreitung bis in hohe Lagen. Gute Transportfähigkeit und angenehmer Geschmack wären als weitere Sortenmerkmale anzuführen.

All dies führt dazu, dass sich diese Birnensorte bis heute in den unterschiedlichsten Regionen der Steiermark hält, wie in St. Stefan ob Stainz, Feldbach, Rein, Gröbming, Knittelfeld und St. Marein im Mürztal.



Kerngebiete der Steiermark										
Birnenvarietäten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Axbirne							•			
Holzbirne				•						
Grabenbirne		•								
Schlagbirne					•					
Honigbirne									•	
<b>Welsche Bratbirne</b>	•	•		•	•	•			•	
Mostbirne				•						
Winterbirne				•						
Glosbirne		•								
Gräfin						•				
Williams		•								
Unbekannt								•		
Mostbirne							•			
<b>Schweizer Wasserbirne</b>					•					
Wallische Mostbirne						•				
Mostbirne							•			
Birne				•						
Birne grün							•			
Unbekannt							•			
Hoandlbirne							•			
<b>Ungerbirne</b>					•					
Birne				•						
Frühbirne	•									
<b>Nagowitzer</b>	•			•		•	•	•		•
Süße Lederbirne, Honigbirne								•		•
Landlbirn							•			
Birne				•						
Holzbirne		•								
Gean Birn							•			
Schmalzbirne						•				
Pfundbirne		•								
Haferbirne										•
Weihnachtsbirne						•				
Weihnachtsbirne							•			



1913). Diese Beschreibung der Baumeigenschaften dieser Sorte wird durch unsere genetischen Analysen hinsichtlich des gegenwärtigen Birnensortenspektrums in der Steiermark bestätigt. Die *Hirschbirne* wurde entsprechend ihrer Baumeigenschaften in den Kerngebieten Pöllau und Gröbming vorgefunden.

Bei der Betrachtung der Kerngebiete fällt folgende Reihung nach der Anzahl der Birnenvarietäten auf:

Gröbming > Pöllau > Eibiswald > Feldbach > Rein = St. Stefan ob Stainz > Knittelfeld > St. Marein im Mürztal > Murau > Straden

Als besonders vielfältig bezüglich alter Birnensorten präsentieren sich die Kerngebiete Gröbming und Pöllau. Einseits lässt sich dies bezüglich Gröbming vor allem damit begründen, dass sich Gebiete mit anspruchsvollen Klimaten als Rückzugsgebiete für alte Kernobstvarietäten darstellen. Das Kerngebiet Pöllau erfüllt einen Sonderstatus. Speziell im Pöllauer Tal wird gezielt die Kultivierung alter Birnensorten vorangetrieben, was auch die wirtschaftliche Vermarktung dieser Varietäten einschließt („Kletz'n“). Die *Hirschbirne* manifestierte sich hier als Leitsorte, daneben kommen aber auch andere alte Birnensorten zum Zug, wie z. B. die *Schweizer Wasserbirne* und die *Ungerbirne*.

Vergleicht man die Reihung der Kerngebiete nach Anzahl der Apfelsorten mit jener der Birnen, so ist eine Tatsache besonders augenscheinlich.

Regionen mit großer Apfelsortendiversität weisen eine eher geringe Anzahl an unterschiedlichen Birnensorten auf. Als Beispiel wären die Regionen Murau, St. Stefan ob Stainz und St. Marein im Mürztal zu nennen. Umgekehrt gilt das gleiche. Ein Obstbaugesamt mit breiter Vielfalt an Birnenvarietäten zeigt ein eher begrenztes Spektrum alter Apfelsorten (Gröbming, Pöllau und Eibiswald). Die Kausalität für diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass nicht nur die Diversität alter Kernobstsorten durch lokale Klimate und Bodengegebenheiten bewirkt wird, sondern auch Einfluss auf die Auswahl der Kultivierung der Kernobst, Apfel oder Birne zeigt.

Eine insgesamt geringe Diversität alter Apfel- und Birnensorten zeigt das Kerngebiet Straden, was wohl mit der Intensivierung der Landwirtschaft in dieser Region zu kommentieren wäre.

Die 49 Birnenvarietäten, die keiner Referenzsorte zuordenbar waren, könnten sich als ökologische Spezialisten herausstellen. Um dies jedoch tatsächlich zu verifizieren, wären weitere Aufsammlungen zur Vergrößerung der Birnenreferenzsortendatenbank auf genetischem Niveau notwendig.

In Slowenien wurden 23 Birnenkultivare aufgesammelt. Durch die genetische Analyse dieser Proben unterschieden sich 19 Varietäten hinsichtlich ihrer Mikrosatellitenlängen. Die einzige Referenzsorte, die in Slowenien gefunden wurde, war die *Welsche Bratbirne*. Die übrigen 18 Varietäten entsprachen in ihren genetischen Differenzierungsmerkmalen keiner Referenzsorte (Tab. 19).

Eine Diskussion hinsichtlich der Kausalität der Birnensortenverbreitung in Slowenien lässt sich aufgrund der sehr beschränkten Stichprobenanzahl vorerst nicht anstellen. Weitere Probenahmen in diesem Gebiet wären wohl noch erforderlich.

Interessant hingegen ist das mehrmalige Auftreten der Sortenbezeichnung *Tepka*.

Bei der *Tepka* handelt es sich nach LÖSCHNIG 1913 um eine Mostbirnenvarietät, welche eine typische Sorte der Untersteiermark (Štajerska), Krains und des Küstenlandes repräsentiert. Sie zeichnet sich durch außerordentliche Anspruchslosigkeit und ziemlich gute Tragbarkeit aus. Jetzt stellt sich die Frage, warum die Sorte *Tepka* zu keiner Referenzsorte erhoben wurde. Begründet wird dies im wiederholten Vorkommen dieser Bezeichnung in unterschiedlichen, sich durch verschiedene Mikrosatellitenlängen differenzierenden Kultivargruppen. Die weite Verbreitung der Sortenbezeichnung *Tepka* in Teilen Sloweniens ohne ausreichende Vertrautheit mit den charakterisierenden pomologischen Merkmalen dieser Sorte (wie bei der Sortenbezeichnung *Maschanzker*, Kapitel 3.2.1) ist wohl für diesen Sachverhalt verantwortlich.

Übereinstimmungen bzw. Unterschiedlichkeiten des slowenischen mit dem steirischen Birnensortiment lassen sich, abgesehen von der *Welschen Bratbirne*, die in beiden Regionen vorkommt, aufgrund der Dominanz lokaler Sortenbezeichnungen nicht analysieren, wobei auch bei den Birnen eine etwaige Herkunft dieser Varietäten aus benachbarten Regionen Kroatiens oder Italiens nicht auszuschließen ist.

Birnenvarietäten	Kerngebiete Sloweniens							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tepka						•		
<b>Welsche Bratbirne</b>		•						
Unbekannt, Smarješka					•			•
Sršenka					•			
Alte Sorte								•
Laporšica		•						
Winterbirne		•						
Butterbirne							•	
Salzburger Birne							•	
Gozdarski Zawod		•						
Tafelbirne	•							
Tepkovec						•		
Mostbirne Kamnic, Mostbirne, Gozdarski Zawod, Weinmostbirne	•	•		•			•	
Tepka				•				
Kompottbirne		•						
Tafelbirne						•		
Tepka							•	
Stuttgarter Birne							•	
<i>Anzahl der Birnenvarietäten/Kerngebiet</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>2</i>

Tab. 19: Birnevarietäten Sloweniens.

Referenzsortennamen fett. Übrige Sortenbezeichnungen entsprechen den Angaben in den Erhebungsbögen.

### 3.6 Vergleichbarkeit von Mikrosatellitendaten unterschiedlicher Labors

Die genetische Charakterisierung alter Apfel- und Birnensorten mittels jeweils 3 selektierter Mikrosatelliten stellte sich, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, als durchaus erfolgreich dar.

Die Identifikation unbekannter Aufsammlungen bzw. die Offenlegung von lokalen Sortenbezeichnungen erfolgt mit Hilfe einer auf dem genetischen Merkmal der Mikrosatellitenlängen basierenden Referenzsortendatenbank.

Dadurch ist es möglich, Varietäten unabhängig von ihren variablen Fruchtausformungen aufgrund unterschiedlichster Umwelteinflüsse über deren Erbgut zu charakterisieren und durch den Vergleich des genetischen Charakteristikums mit jenem definierter Referenzsorten zu bestimmen.

Eine solche Referenzsortendatenbank steht nun sowohl für alte Apfel- wie Birnensorten zur Verfügung (Kapitel 3.3).

Es wurde schon mehrmals darauf hingewiesen, dass sich Obstgenbanken häufig als inkonsistent hinsichtlich der korrekten Bestimmung und Bezeichnung ihrer Apfel- und Birnensortimente zeigen. Sie beinhalten eine Fülle an Obstbäumen mit unterschiedlichen Sortennamen, welche, wie wir durch unsere genetischen Analysen belegen konnten, häufig ein und dieselbe Sorte darstellen. Als Beispiel dafür wäre hier nur die Apfelsorte *Haslinger* angeführt, die in der Obstgenbank Steiermark (Landwirtschaftliches Versuchszentrum Haidegg) gleich durch 6 Baumindividuen mit unterschiedlichen Betitelungen vertreten ist.

Begründet wird dies vor allem durch die Art und Weise, wie solche Obstgenbanken zurzeit geführt werden. Die Auswahl und die Bestimmung der in diesen Genbanken kultivierten Sorten basiert auf pomologischen Merkmalen, also primär auf den Fruchteigenschaften der jeweiligen Kultivare. Gerade diese Charaktere können aber je nach Region oder Bewirtschaftung ganz wesentlich in ihrer Ausprägung variieren, was zu Fehlbestimmungen führen kann. Da das Probenmaterial für Obstgenbanken aus den unterschiedlichsten Gebieten stammt, muss auch das Problem der vielen verschiedenen Lokalbezeichnungen für ein und dieselbe Sorte berücksichtigt werden, was die Wahl des richtigen pomologischen Sortennamens erschwert.

Damit wird die Problematik der Bestimmung einer Apfel- oder Birnenaufsammlung mit Hilfe einer auf diesem Niveau geführten Genbank augenscheinlich. Weder die

Bestimmungsmerkmale noch die Sortennamen können als verlässlich betrachtet werden, beides verstößt gegen die grundsätzlichen Voraussetzungen einer erfolgreichen Sortenidentifikation.

Diese Probleme wurden durch die Gründung einer Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau gelöst.

Sie verhindert nicht nur die redundante Aufsammlung gleicher Sorten und damit eine Vergeudung ohnehin nur begrenzt vorhandener Mittel (finanziell und arbeitskräftetechnisch), sie ermöglicht auch das zur Verfügung stellen sicher bestimmter Apfel- und Birnensorten für künftige genetische und biochemische Untersuchungen.

Entsprechend des ursprünglichen Vorkommens der diese genetisch bestimmten Sortensortimente zusammensetzenden Varietäten, kann es zu gezielten Wiederauspflanzungsstrategien ökologisch passender Apfel- und Birnenkultivare kommen.

Im Kapitel 3.3 wurde immer wieder angedeutet, dass der Umfang einer genetischen Referenzsortendatenbank primär von der Anzahl der in die Mikrosatellitenanalysen involvierten Stichproben abhängt.

Je mehr Varietäten aus unterschiedlichen Regionen aufgesammelt und mit dem Charakterisierungsmerkmal „Mikrosatellitenlänge“ versehen werden, desto mehr komplexe, sich für eine Referenzsorte eignende Kultivargruppen werden sich entwickeln. Damit begründet sich eine gewisse Dynamik in der Entstehung einer sich im Umfang erschöpfenden und für die Bestimmung alter Apfel- und Birnensorten geeigneten Datenbank.

Bis zu diesem Zeitpunkt basierte die Definition von Referenzsorten in dieser Arbeit nur auf Probenmaterial aus der Steiermark und Teilen Sloweniens.

Wenn man sich aber die geschichtliche Entwicklung des Obstbaues im Untersuchungsgebiet vor Augen hält, so erkennt man, dass sich nur wenige Varietäten als autochthone Sorten darstellen. Dies wären z. B. die Apfelkultivare *Ilzer Rosenapfel* und *Kronprinz Rudolf*. Viele der anderen in der Referenzsortendatenbank enthaltenen Kultivare wurden in unterschiedlichsten Gebieten Europas als Zufallssämlinge aufgrund deren ausgezeichneter Frucht- und Baumeigenschaften für deren weitere Veredelung selektiert (z. B. *Großer Rheinischer Bohnapfel* aus Deutschland, *Roter Herbstkalvill* aus Frankreich) (HARTMANN 2003).

Damit ist klar, dass ein Großteil des heute in der Steiermark und Teilen Sloweniens vorkommenden Sortenspektrums seine zumindest teilweise Entsprechung in anderen Ländern Europas findet. Die Einbindung von Regionen außerhalb des in dieser Arbeit abgegrenzten Untersuchungsgebietes in die genetische Sortencharakterisierung macht also durchaus Sinn. So könnten Aufsammlungen, für welche noch keine Varietäten mit übereinstimmenden genetischen Merkmalen in diese Studie miteinbezogen wurden, durch eine geographische Ausdehnung der Beprobungsregion entweder eine korrekte Bestimmung erfahren, oder sich als neue Referenzsorte qualifizieren.

Die Beprobung von räumlich weit auseinander liegenden Regionen ist jedoch für eine Arbeitsgruppe sowohl zeitlich wie finanziell nur sehr schwer zu bewerkstelligen.

Daher muss es das Ziel sein, durch die Einbindung weiterer Analyselabors und Arbeitsgruppen, die mit den gleichen genetischen Sortencharakteren, Mikrosatelliten, arbeiten, diesen Anforderungen zu begegnen.

Diese Vorhaben werden jedoch durch eine methodische Besonderheit der Mikrosatellitenanalyse erschwert.

Die mittels Fragmentanalyse ermittelte Mikrosatellitenlänge stellt eine relativ zum Längenstandard ermittelte Nukleotidanzahl dar. Diese relativen Nukleotidlängen einer Sorte sind innerhalb eines Analysesystems (Probensammlung, DNA-Isolation, PCR-Bedingungen, Fragmentanalyse, siehe Kapitel 2. Material und Methode) konstant, variieren aber zwischen den verschiedenen Systemen unterschiedlicher Labors, d. h. für ein und denselben Mikrosatellitenlocus einer Sorte ergeben sich unterschiedliche Mikrosatellitenlängen.

Verantwortlich dafür sind die, von den in verschiedenen Labors verwendeten Analysegeräten definierten elektrophoretischen Bedingungen für die Fragmentanalyse, sowie die speziell für die jeweiligen Apparaturen verwendeten Hardwarekomponenten wie Kapillaren und Polymere (GENESCAN<sup>®</sup> REFERENCE GUIDE 2000, DELMOTTE et al. 2001).

Das Prinzip der Analyse alter Kernobstsorten mittels Mikrosatelliten beruht aber gerade auf der Unterscheidung bzw. Entsprechung der Varietäten hinsichtlich ihrer Allellängen.

Die oben beschriebene Tatsache der analysegerät abhängigen und laborspezifisch unterschiedlichen Längen eines Mikrosatelliten für ein und dieselbe Sorte stellt also eine große Herausforderung dar.



Daher ist ein Abgleich der durch die Mikrosatellitenanalyse erhaltenen Sortencharaktere, also Allellängen, zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen notwendig. Ansonsten würde sich die genetische Diversität nicht aufgrund der Sortenvielfalt einstellen, sondern die Folge methodischer Artefakte sein.

Die Fragestellung, ob und unter welcher Voraussetzung sich nun Mikrosatellitendaten, welche in verschiedenen Labors und mittels unterschiedlicher Analysegeräte generiert wurden, miteinander vergleichen lassen, wurde in Kooperation mit dem Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg (Südtirol) bearbeitet.

Die Idee für eine derartige Labor übergreifende Zusammenarbeit wurde von Mag. Melanie Hofer und mir, Mag. Stephan Monschein begründet. Im Zuge der Zusammenarbeit mit dem Land- und Forstwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg (Südtirol) besuchte ich im Jänner 2005 das Versuchszentrum, um die organisatorische und methodische Vorgangsweise für die Fragestellung der Vergleichbarkeit der in unterschiedlichen Labors generierten Mikrosatellitendaten festzulegen und um entsprechenden Know-How Transfer zwischen Graz und Laimburg zu gewährleisten.

Die in diesem Kapitel beschriebene Vorgangsweise und die Ergebnisse hinsichtlich des Vergleichs und der Verrechnung der in verschiedenen Labors durch unterschiedliche Methoden erhaltenen Mikrosatellitenlängen für das gleiche Probenset, die gleichen Apfelvarietäten, entstammen der Publikation „Comparability of genotyping data obtained by different procedures – an inter-laboratory survey“ aus der Zeitschrift „Journal of Horticultural Science & Biotechnology“, welche sich durch die Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe (Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl Franzens Universität Graz) mit jener aus Laimburg (Land- und Forstwirtschaftliches Versuchszentrum, Dr. G. J. Dalla Via, Dr. Sanja Baric und Mag. Melanie Hofer) entwickelt hat (BARIC et al. 2008).

Ist es im Folgenden notwendig, einzelne Arbeitsschritte, methodische Zugänge oder Ergebnisse auf deren Herkunft (Labor) zu beziehen, so erfolgt dies kurz mit dem Hinweis Uni-Graz bzw. Laimburg.

Der erste Schritt der Kooperation bestand im Austausch von Probematerial in Form von DNA-Extrakten. Von der Uni-Graz wurden 30 Apfelvarietäten ausgewählt, wobei 27 Proben

Mitglieder der Referenzsortendatenbank sind, 3 werden von der „Brünnerling“- „Boskoop“- und „Gravensteiner“-Gruppe repräsentiert (Tab. 20).

Kultivar	Herkunft	
	Uni-Graz	Laimburg
Ananasrenette	1	2
Baumanns Renette	1	
Berner Rosenapfel	1	
Böhmischer Brünnerling		1
Boikenapfel	1	
„Boskoop“-Gruppe	1	
Bozener Apfel		1
Brixner Plattling		1
„Brünnerling“-Gruppe	1	
Champagner Renette	1	
Damasonrenette	1	
Danziger Kantapfel		1
Erbachhofer		1
Geflammtter Kardinal	1	
Gelber Bellefleur		1
Gewürzluiken		1
Golden Delicious Clone B		1
Grahams Jubiläumsapfel	1	
Großer Rheinischer Bohnapfel	1	
Graue Herbstrenette	1	
„Gravensteiner“-Gruppe	1	
Harberts Renette	1	
Haslinger	1	
Ilzer Rosenapfel	1	
Jakob Lebel	1	
Kalterer Böhmer	1	2
Kanada Renette	1	1
Karmeliter Renette		1
Klöcher Maschankker	1	
Kronprinz Rudolf	1	1
Landsberger Renette	1	
Lavanttaler Bananenapfel	1	

London Pepping	1	
Maschanzker		1
Muskat Renette		1
Pfreisling		1
Plankenapfel		1
Rote Schafnase	1	
Roter Astrachan		1
Roter Herbstkalvill	1	
Schöner von Wiltshire		1
Signe Tillisch	1	
Sommerkalvill		1
Sommerköniger		1
Steinpepping		1
Steirischer Maschanzker	1	
Tiroler Spitzlederer		1
Wagenerapfel		1
Weberbartlapfel		1
Weißer Klarapfel	1	
Weißer Rosmarin		1
Weißer Wiesling		1
Winterbananenapfel		1
Wintergoldparmäne	1	
Zigeunerapfel		1
Summe	30	31

Tab. 20: Apfelvarietäten und deren Herkunft. Ziffern geben die Anzahl der Proben der jeweiligen Apfelsorten an. Nomenklatur nach GRILL & KEPPEL 2005 bzw. nach Angaben aus Laimburg (modifiziert nach BARIC et al. 2008).

Aus Laimburg stammen 31 Apfel-DNA-Extrakte, wobei sich das ausgewählte Sortiment in 4 Sorten (2 mit jeweils einer Wiederholung) mit jenem der Uni-Graz überschneidet. Die restlichen 25 Proben stellten sich vorerst als eigenständige Varietäten dar. Die Sorte *Golden Delicious Clone B* wurde aus methodischen Gründen (siehe später) in diese Studie miteinbezogen.

Der Austausch von bereits extrahierter DNA wird durch folgende Tatsache begründet.

Wie bereits in den Kapiteln 2.5 und 2.6 beschrieben, wurde von uns (Uni-Graz) die DNA aus gefriergetrockneten Blättern mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN 2000) isoliert. Laimburg gewann die DNA aus 100 mg frischen Blattmaterials, wobei ebenfalls die DNeasy<sup>®</sup>

Plant Mini Kit Methode Verwendung fand.

Der Hintergrund für diese Vorgehensweise bestand in einer Überprüfung des Einflusses von auf unterschiedlichem Wege gewonnener DNA auf die Qualität der Produkte der Mikrosatellitenanalyse, die Fragmentlängen der ausgewählten SSRs. Wie sich später herausstellen sollte, beeinflusste die optionale Verwendung von gefriergetrocknetem oder frischem Material in keinster Weise die Analyseergebnisse.

Allerdings sei darauf hingewiesen, dass die Art und Weise der Sammlung und Vorbereitung von Probenmaterial für die DNA-Extraktion, wie sie von der Uni-Graz durchgeführt wurde, einige Vorteile gegenüber jener aus Laimburg in sich birgt. So kann durch die Gefriertrocknung mit anschließender Vermahlung aufgesammelter Blattproben dieses Material nicht nur andauernd sondern auch Platz sparend, und mit entsprechender Kennzeichnung (Probencodierung) auch jederzeit auf dessen Herkunft rückführbar für weitere Analysen konserviert werden.

Um jetzt diese 61 Apfelproben auch entsprechend genetisch zu analysieren, wurde von Laimburg und der Uni-Graz ein gemeinsames Set an Mikrosatellitenprimern festgelegt. Es bestand aus 5 Mikrosatellitenloci, welche von GIANFRANCESCHI et al. 1998 und LIEBHARD et al. 2002 publiziert wurden: CH01F02, CH02D12, CH01C06, CH02b10 und CH03a04.

Die Amplifikation mittels PCR sowie die Fragmentanalyse der selektierten Mikrosatelliten erfolgte in der Arbeitsgruppe Uni-Graz nach den bereits in den Kapiteln 2.7.1 und 2.7.2 beschriebenen Bedingungen.

Die in Laimburg verwendeten Analysegeräte sowie deren Arbeitsprotokolle unterscheiden sich von jenen der Uni-Graz. Die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte sowie die zur Anwendung gebrachten Apparaturen für die Mikrosatellitenanalyse sind in BARIC et al. 2008 publiziert.

In der Tab. 21 sind die Ergebnisse der Uni-Graz hinsichtlich der Analyse der 61 Apfelproben mittels 5 Mikrosatelliten dargestellt.

		Mikrosatellitenlocus									
Herkunft	Kultivar	CH01F02	CH02D12		CH01C06		CH02b10		CH03a04		
Laimburg	Ananas Reinette	183		190	198	155	159	128	130	89	
Laimburg	Ananas Reinette	183		190	198	155	159	128	130	89	
Uni-Graz	Ananas Renette	183		190	198	155	159	128	130	89	
Uni-Graz	Baumann Renette	169	179	182	198	157	161	104		89	91
Uni-Graz	Berner Rosenapfel	181		198	206	161		130	132	109	111
Laimburg	Böhmischer Brünnerling	169	183	193	198	206	155	159	130	140	95
Uni-Graz	Boikenapfel	179		198	200	155	161	132		89	109
Uni-Graz	"Boskoop"-Gruppe	183		180	194	157	161	118	120	122	89
Laimburg	Bozener Apfel	179	183	176	182	198	157	159	167	116	130
Laimburg	Brixner Plattling	169	179	183	176	182	190	143	159	171	118
Uni-Graz	Haslinger	169	179	183	176	182	190	143	159	171	118
Uni-Graz	"Brünnerling"-Gruppe	169	179	180	198	200	159	161	118	128	130
K/1/1/30 A	Champagner Renette	183		190	200	159		130		91	115
Uni-Graz	Damason Renette	179	183	182	198	155	159	161	120	122	91
Laimburg	Danziger Kantapfel	169		180	198	155	159	116	140	89	101
Laimburg	Erbachhofer	169		176	184	161	173	126	128	109	113
Uni-Graz	Geflamnter Kardinal	169	179	182	198	210	157	161	124	128	95
Laimburg	Gelber Bellefleur	173	179	194	198	161		122	130	95	113
Laimburg	Gewürzluiken	179	185	182	198	157	161	124	126	97	115
Laimburg	Golden Delicious	169	179	194	198	155	161	118	122	115	117
Uni-Graz	Grahams Jubiläumsapfel	173		176	198	159		130	140	91	101
Uni-Graz	Großer Rheinischer Bohnapfel	179	183	194	198	155	171	116	118	103	111
Uni-Graz	Graue Herbstrenette	179	183	182	198	200	155	159	171	120	122
Uni-Graz	"Gravensteiner"-Gruppe	181	183	198	212	159	161	169	120	130	134
Uni-Graz	Harberts Renette	183	185	180	198	155	161	169	120	130	140
Uni-Graz	Ilzer Rosenapfel	169		182	198	159	171	126	130	95	117
Uni-Graz	Jakob Label	179	187	176	182	198	161	118	122	126	101
Uni-Graz	Kalterer Böhmer	169		182	206	159		110	124	97	111
Laimburg	Kalterer Böhmer	169		182	206	159		110	124	97	111
Laimburg	Kalterer Böhmer	169		182	206	159		110	124	97	111
Uni-Graz	Kanada Renette	179		182	190	198	155	161	122	128	130
Laimburg	Kanada Reinette	179		182	190	198	155	161	122	128	130
Laimburg	Karmeliter Reinette	169	183	198		159	161	120	134	101	117
Uni-Graz	Klöcher Maschanzker	169	181	190	198	206	155	159	161	124	130
Laimburg	Maschanzker	169	181	190	198	206	155	159	161	124	130
Uni-Graz	Kronprinz Rudolf	169	183	176	198	159		128	130	113	115
Laimburg	Kronprinz Rudolf	169	183	176	198	159		128	130	113	115
K/1/1/62 A	Landsberger Renette	183	189	176	190	153	155	116	140	105	117
Uni-Graz	Lavanttaler Bananenapfel	183		206	210	155	159	128	130	111	117
Uni-Graz	London Pepping	179		176	206	161		130		89	111
Laimburg	Muskat Reinette	169	183	198		159	161	116	128	111	117
Laimburg	Pfreisling	169		176	198	157	159	128	130	95	113
Laimburg	Plankenapfel	169		180	198	155	161	124		89	115
Uni-Graz	Rote Schafnase	169		198	204	159		124	134	97	113
Laimburg	Roter Astrachan	179	183	198		159	161	126		107	
Uni-Graz	Roter Herbstklavill	173		182	198	161		130	134	89	111
Laimburg	Schöner von Wiltshire	173		198	210	161		124	128	89	
Uni-Graz	Signe Tillisch	189		176		161		130	140	95	111
Laimburg	Sommerkalvill	189		176		161		130	140	95	111
Laimburg	Sommerköniger	169	171	182	198	155	161	130		113	117
Laimburg	Steinpepping	169	173	183	194	198	159	116	126	130	95
Uni-Graz	Steirischer Maschanzker	169	181	198	206	155	159	130		117	
Laimburg	Tiroler Spitzleder	169	183	176	190	157	171	110	124	107	115
Laimburg	Wagenerapfel	169	181	180	206	159		120		115	117
Laimburg	Weberbantapfel	169		176	198	157	171	130	132	95	117
Uni-Graz	Weißer Klarapfel	181	187	178	198	155	161	130		95	
Laimburg	Weißer Rosmarin	169		176	182	161		104	122	130	89
Laimburg	Weißer Wiesling	169		196		155	159	124	130	111	115
Laimburg	Winterbananenapfel	179		194		155	161	122	130	95	117
Uni-Graz	Wintergoldparmäne	183		198	210	155	161	116	130	89	117
Laimburg	Zigeunerapfel	169		176	182	171		120	140	115	117

Tab. 21: Allelkomposition der 61 Apfelproben. Nomenklatur nach GRILL & KEPPEL 2005 bzw. nach Angaben aus Laimburg

Von den 61 Apfelproben konnten 52 Sorten voneinander unterschieden werden, wobei gerade das Auftreten von 7 komplexen Kultivargruppen genauer beleuchtet werden muss.

Die *Ananasrenette*, der *Kalterer Böhmer*, die *Kanada Renette* sowie der *Kronprinz Rudolf* wurden sowohl von der Arbeitsgruppe der Uni-Graz wie jener aus Laimburg mit ihren richtigen pomologischen Sortennamen versehen und stellen Überschneidungen der für diese „Abgleichsstudie“ verwendeten Apfelsortimente dar.

Anders verhält es sich jedoch mit den 3 anderen komplexen Kultivargruppen. Durch die Anwendung der Mikrosatellitenmethode konnten folgende, von Laimburg verwendete Lokalsortenbezeichnungen aufgedeckt und letztendlich mit Hilfe der aus der Referenzsortendatenbank stammenden Varietäten aus Graz, mit richtigen Sortennamen versehen werden. Es handelt sich dabei um die synonymen Bezeichnungen *Brixner Plattling* für *Haslinger*, *Maschanzker* für *Klöcher Maschanzker* und *Sommerkalvill* für *Signe Tillisch*.

Auch Laimburg analysierte die 61 Apfelproben mit ihren Methoden und Geräten und kam so auf das gleiche Ergebnis der 52 unterschiedlichen Sorten.

Das Charakteristikum der Mikrosatellitenlängen stellte sich aber, aufgrund der oben beschriebenen Gründe, als zwischen Labors uneinheitlich dar; unterschiedliche, relative (zu den verwendeten Längenstandarts) Fragmentlängen für ein und dieselbe Sorte.

Trotz der begrenzten Probezahl an alten Apfelsorten aus Südtirol (30 alte Varietäten und der *Golden Delicious Clone B*) lässt sich durch den Vergleich mit dem steirischen bzw. slowenischen Sortensortiment eine erste Diagnose der diese italienische Obstbauregion zusammensetzenden Diversität an alten Sorten anstellen.

Als Kultivare, welche nur in Südtirol aufgesammelt wurden, wären die Varietäten *Böhmischer Brünnerling*, *Bozener Apfel*, *Erbachhofer*, *Gewürzluiken*, *Muskat Reinette*, *Pfreisling*, *Plankenapfel*, *Roter Astrachan*, *Schöner von Wiltshire*, *Sommerköniger*, *Steinpepping*, *Tiroler Spitzlederer*, *Weberbartlapfel*, *Weißer Rosmarin*, *Weißer Wiesling*, *Winterbananenapfel*, *Zigeunerapfel* zu nennen.

Es zeigt sich also, dass bloß durch die Einbeziehung von 30 Kernobstproben aus einer anderen als dem Untersuchungsgebiet (Steiermark, Teilen Sloweniens) angehörenden Obstbauregion (Südtirol) sich das Ausmaß der Diversität um 17 Varietäten vergrößert.

Zusammen mit den Ergebnissen der genetischen Charakterisierung von Aufsammlungen alter Apfel- und Birnenvarietäten speziell aus Teilen Sloweniens, wo der Einfluss Kroatiens und Italiens (Friaul-Julisch Venetien) auf die momentane Kernobstdiversität dieser Region als wahrscheinlich anzusehen ist, verdeutlicht die Notwendigkeit der Einbeziehung aller mitteleuropäischen Streuobstwiesengebiete, um eine zentraleuropäische Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau zu begründen.

Um nun die Datensätze unterschiedlicher Labors (Graz und Laimburg) miteinander vergleichen zu können war es notwendig, absolute Mikrosatellitenlängen, also die tatsächliche Nukleotidzahl der SSRs, zu ermitteln.

Über die Bestimmung absoluter Allellängen der Mikrosatelliten einzelner Kultivare kann ein generell für einen Locus und ein bestimmtes Labor geltender Umrechnungsfaktor für die Umwandlung relativer zu absoluten Fragmentlängen festgelegt werden.

Dafür bedarf es zu allererst der Bestimmung der absoluten Mikrosatellitenlängen anhand ausgewählter Kultivare, wofür in unserem Fall die Varietäten *Golden Delicious Clone B* und *Kalterer Böhmer* vorgesehen wurden. Die methodische Vorgehensweise inkludiert Verfahren wie Klonierung und Sequenzierung, die zum Teil am Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Graz aus technischen Gründen nicht durchführbar waren. Deshalb wurden diese Analyseschritte in Laimburg (von Mag. Melanie Hofer) verwirklicht, die methodische Durchführung sowie die dabei verwendete lobortechnische Ausrüstung ist in BARIC et al. 2008 beschrieben.

Durch die Klonierung und Sequenzierung der spezifisch amplifizierten Mikrosatelliten CH01F02, CH02D12, CH01C06, CH02b10 und CH03a04 der beiden Kultivare *Golden Delicious Clone B* und *Kalterer Böhmer* erhält man deren absolute Allellängen.

Durch den Vergleich der relativen Mikrosatellitenlängen, welche in Graz und Laimburg generiert wurden, mit den absoluten Allellängen dieser beiden Kultivare konnten locuspezifische Umrechnungsfaktoren für die betreffenden Labors (Graz und Laimburg) entwickelt werden (Tab. 22).

Mikrosatellitenlocus	absolute Allellängen		Umrechnungsfaktor	
	<i>Golden Delicious</i>	<i>Kalterer Böhmer</i>	Uni-Graz	Laimburg
CH01F02	171:181	171:171	+ 2	+ 1
CH02D12	197:201	185:209	+ 3	+ 2
CH01C06	156:162	160:188	+ 1	0
CH02b10	122:126	114:128	+ 4	+ 1
CH03a04	120:120	100:114	+ 3	0

Tab. 22: Umrechnungsfaktoren für die jeweiligen Mikrosatellitenloci und Labors (modifiziert nach BARIC et al. 2008).

Durch die Anwendung dieser locus- und laborspezifischen Umrechnungsfaktoren können die in den Labors generierten relativen Allellängen auf absolute Werte revidiert werden. Diese wahren Mikrosatellitenlängen dienen dem zielführenden Vergleich dieser genetischen Sortencharakteristika unabhängig von Methode und Apparatur, zielführend dahingehend, dass Diversität durch Sortenvielfalt und nicht durch methodische Artefakte entsteht.

Die Zweckdienlichkeit der Anwendung dieser Umrechnungsfaktoren wird am Beispiel des *Steirische Maschanzker* behandelt (Tab. 23).

Das Ergebnis der genetischen Charakterisierung dieser Apfelsorte mittels 5 Mikrosatelliten in den Forschungseinrichtungen Uni-Graz und Laimburg werden durch die relativen Allellängen dargestellt. Aufgrund dieser Merkmale könnte man davon ausgehen, dass es sich um unterschiedliche Kultivare handelt.

Durch die Umrechnung dieser relativen Mikrosatellitenlängen in absolute stellt sich heraus, dass es sich um ein und dieselbe Apfelsorte handelt, charakterisiert durch die gleiche Allelkomposition.

Damit wird die methodische Besonderheit der Mikrosatellitenanalyse (siehe oben) egalisiert und Proben, welche in unterschiedlichsten Labors untersucht werden, können so leicht auf ihre Sortenidentität hin überprüft und verglichen werden.



SSR- Locus	relative Allellänge	Umrechnungsfaktor	absolute Allellänge
Uni-Graz			
CH01F02	169:181	+ 2	171:183
CH02D12	198:206	+ 3	201:209
CH01C06	155:159	+ 1	156:160
CH02b10	130:130	+ 4	134:134
CH03a04	117:117	+ 3	120:120
Laimburg			
CH01F02	170:182	+ 1	171:183
CH02D12	199:207	+ 2	201:209
CH01C06	156:160	0	156:160
CH02b10	133:133	+ 1	134:134
CH03a04	120:120	0	120:120

Tab. 23: *Steirischer Maschanzker*. Umrechnung von relativen zu absoluten Allellängen mittels Umrechnungsfaktor.

Die Definition von Umrechnungsfaktoren in einem Labor geht also relativ leicht von statten. Als erster Schritt müssen die Sorten *Golden Delicious Clone B* und *Kalterer Böhmer* mit dem gleichen Primerset genetisch untersucht werden. Die dadurch erhaltenen relativen Allellängen dieser beiden Kultivare werden mit den bereits als absolut definierten (siehe oben) verrechnet. Dadurch erhält man labor- und locusspezifische Umrechnungsfaktoren, die es einem schließlich ermöglichen, das jeweils genetisch untersuchte Sortensortiment mit dem eines anderen Labors zu vergleichen. Die Zusammenfassung aller über die Mikrosatellitenmethode erhaltenen Sortencharaktere, Allelkompositionen, in einer gemeinsamen mitteleuropäischen Referenzsortendatenbank stellt schließlich das Ziel eines interlaboratorischen Datenabgleichs dar.

Wie bereits beschrieben, erfolgte vor dem beabsichtigten Datenabgleich der durch die Mikrosatellitenmethode erhaltenen relativen Allellängen zwischen der Uni-Graz und Laimburg keinerlei Standardisierung der Laborprotokolle.

Ausgehend von der DNA-Extraktion, die an der Uni-Graz aus gefriergetrocknetem Material erfolgte wohingegen in Laimburg frische Blätter Verwendung fanden, wurden auch unterschiedliche PCR-Protokolle (Kapitel 2.7.1 und BARIC et al. 2008) zur Amplifikation der 5 selektierten Mikrosatelliten angewandt. Die Detektion der Allellängen selbst wurde schließlich mit verschiedenen Analysegeräten und den durch diese bedingten Hardwarekomponenten (z. B. Kapillaren und Trennpolymeren) und Elektrophoresebedingungen durchgeführt.

Die Vorgehensweise der DNA-Extraktion stellte keine Beeinflussung der Qualität der untersuchten Mikrosatelliten dar. Ausgetestet wurde dies anhand der 4 Apfelsorten *Ananasrenette*, *Kalterer Böhmer*, *Kanada Renette* und *Kronprinz Rudolf*.

Die Isolierung reiner DNA aus diesen 4 Apfelsorten erfolgte sowohl an der Uni-Graz sowie in Laimburg mit den jeweils dort gebräuchlichen Protokollen. Durch den Austausch der DNA-Isolate zwischen den Forschungseinrichtungen erfolgte die Amplifikation sowie die Analyse der Mikrosatelliten sowohl aus Extrakten mit Herkunft Uni-Graz bzw. Laimburg. Die Entsprechung der relativen Allellängen dieser 4 Kultivare unabhängig von der Herkunft der DNA-Isolate bestätigte die Unabhängigkeit der Qualität der Mikrosatellitenlängen vom jeweiligen DNA-Extraktionsprotokoll (Tab. 21).

Dass die für die Analyse der Fragmentlängen verwendeten Geräte bzw. die durch sie bedingten Hardwarekomponenten und Elektrophoresebedingungen Einfluss auf die detektierten relativen Allellängen ausüben wurde bereits eingehend besprochen. Die Entwicklung labor- und locuspezifischer Umrechnungsfaktoren löste dieses Problem.

Als letzter Punkt wären noch die in Graz bzw. Laimburg verwendeten unterschiedlichen PCR-Protokolle (verschiedene Reagenzien und Polymerasen, unterschiedliche PCR-Thermocyclerbedingungen) als mögliche Einflussfaktoren auf die qualitative Ausbeute der Mikrosatellitenlängen zu analysieren.

Tatsächlich können sich unterschiedliche PCR-Bedingungen und Reagenzien auf die spezifische Amplifikation von Mikrosatelliten auswirken. So kann es je nach PCR-Protokoll bei bestimmten SSR-Loci zu einem Ausbleiben der Amplifikation bestimmter Allele kommen

(FERNANDEZ-FERNANDEZ et al. 2004, PIYAMONGKOL et al. 2003).

Dieses Phänomen wurde auch bei uns beobachtet und wird anhand des Beispiels der *Ananasrenette* besprochen (Tab. 24).

SSR-Locus	relative Allellängen		Umrechnungsfaktor		absolute Allellängen	
	Uni-Graz	Laimburg	Uni-Graz	Laimburg	Uni-Graz	Laimburg
CH01F02	183:183	184:208	+ 2	+ 1	185:185	185: <b>209</b>
CH02D12	190:198	191:199	+ 3	+ 2	193:201	193:201
CH01C06	155:159	156:160	+ 1	0	156:160	156:160
CH02b10	128:130	131:133	+ 4	+ 1	132:134	132:134
CH03a04	89:89	92:92	+ 3	0	92:92	92:92

Tab. 24: Unterschiedliche Allelkomposition der *Ananasrenette* aufgrund verschiedener PCR-Protokolle. Fett markiert ist das Allel (**209**), welches nur in Laimburg detektiert wurde.

Durch die Analyse der Mikrosatelliten in Graz und Laimburg ergeben sich die relativen Allellängen der Sorte *Ananasrenette*. Spätestens nach der Umrechnung der relativen in absolute Mikrosatellitenlängen wurde augenscheinlich, dass an der Uni-Graz am Locus CH01F02 nur ein Allel detektiert wurde, wohingegen in Laimburg 2 Allele festzustellen waren.

Die Lösung dieser Anforderung ist denkbar einfach. Durch die Standardisierung der PCR-Protokolle für alle Labors, die an einer mitteleuropäischen Referenzsortendatenbank mitarbeiten (gleiche Reagenzien, Polymerasen und Thermocycler Bedingungen), kann diese Dissonanz hinsichtlich verschiedener Allelkompositionen für ein und dieselben Sorte leicht behoben werden.

Durch die Entwicklung der Methode der Umrechnung relativer Allellängen in absolute genetische Merkmale und die Standardisierung von PCR-Protokollen sollte es, indem dadurch der Mikrosatellitendatenaustausch zwischen Labors durchführbar ist, relativ leicht möglich sein, das genetische Sortencharakterisierungs-Datenvolumen bezüglich alter Apfel- und

Birnensorten zu vergrößern, ohne dass man selbst in den unterschiedlichen Streuobstgebieten Mitteleuropas unterwegs ist und Probematerial aufsammelt bzw. analysiert.

Damit ist auch der limitierende Faktor der räumlichen Distanz für die Ausweitung einer Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau eliminiert. Der Bestimmung der sich bisher nur als Einzelaufsammlungen präsentierenden Kultivare (außer kleinräumig verbreiteten Zufallssämlingen, Sports oder durchgewachsenen Unterlagen) sowie die Einbeziehung von heute in der Steiermark und Teilen Sloweniens nicht mehr verbreiteten Varietäten bzw. nie kultivierten Sorten in eine mitteleuropäische Referenzsortendatenbank steht damit nichts mehr im Wege.

Die Anwendung von 3 selektierten Mikrosatelliten stellte sich im Untersuchungsgebiet (Steiermark und Teilen Sloweniens) als durchaus ausreichend dar (Kapitel 3.2 und 3.3). Es ist nicht anzunehmen, dass sich dies durch eine räumliche Ausweitung auf ein mitteleuropäisches Ausmaß ändern würde.

Ob man auch andere genetische Marker in die Untersuchung der genetischen Diversität alter Kernobstsorten mit einbezieht (Kapitel 3.4), wird vom Umfang des Auftretens so genannter Populationssorten und spontan auftretender Sprossmutationen abhängen.

#### **4. Nachhaltigkeitsprojekte zum Thema „Alte Kernobstsorten“**

Die Kultivierung alter Kernobstsorten in Form von Streuobstwiesen wird von Landwirten und Hobbygärtnern betrieben, welche damit auch entscheidenden Einfluss auf die heute noch vorzufindende Diversität dieser Apfel- und Birnensorten ausüben.

Diese Kulturlandschaften sind aber oft nur durch mühsame und schlecht automatisierbare Arbeitsvorgänge zu bewirtschaften und drohen deshalb aus dem Landschaftsbild zu verschwinden. Der Weiterbestand dieser ökologisch bedeutenden Streuobstwiesenbestände hängt damit ganz wesentlich von der Motivation der diese Flächen kultivierenden Bevölkerung sowie von der Wertschätzung ihrer Leistungen hinsichtlich des Erhaltes alter Kernobstsorten ab.

Um das Thema „Alte Kernobstsorten“ auch einem breiten und nicht unbedingt wissenschaftlich interessierten Publikum schmackhaft zu machen und damit auch wieder den Bezug zu den oft ungeliebten Streuobstwiesen mit ihrem Sortensortiment zu erneuern bzw. erst aufzubauen, wurden unterschiedliche Projekte, basierend auf den Ergebnissen dieser Diversitätsstudie, realisiert.

In Zusammenarbeit mit dem Landesmuseum Joanneum wurden in den Jahren 2005 und 2006 zwei Sonderausstellungen zum Thema „Alte Apfelsorten“ im Schloss Stainz und Schloss Trautenfels sowohl inhaltlich wie auch konzeptionell realisiert (Abb. 13).

Das Ziel dieser Ausstellungen war es, das Thema Apfel in einem historischen, aktuell wissenschaftlichen sowie ökologischen Spannungsfeld darzustellen. Damit sollte sowohl die vergangene wie gegenwärtige Bedeutung dieser Kernobstsorten speziell für die Steiermark beleuchtet, die Bedeutung von Diversität dargestellt und eine Sensibilisierung hinsichtlich der Kultivierungsform von Lebensmitteln, in diesem Fall des Apfels, erzielt werden.

Durch meine fachliche Kompetenz auf dem Gebiet alter Kernobstsorten konnte ich wesentlich zur Entstehung und dem Gelingen dieser äußerst erfolgreichen Ausstellungen beitragen. Weitere Ausstellungprojekte befinden sich in Planung.



Abb. 13: Werbeplakat für die Sonderausstellung „Rosenapfel, Krummstiel & Schafnase. Alte Schätze neu erforscht.“

Ein besonderes Projekt stellte die alternative Bepflanzungsberatung einer sich gerade in Bau befindlichen Wohnanlage in Graz dar. Unter dem Titel „Alte Kernobstsorten – Modernes Wohnprojekt“ (Abb. 14) wurde im Jahre 2003 gemeinsam mit Mag. Melanie Hofer und Mag. Dr. Karin Herbinger sowie in Zusammenarbeit mit dem Immobilien-Projekt-Entwicklungsunternehmen T.O.M. (Total Object Management) die Idee verwirklicht, unbepflanzte Grundstücke der zukünftigen Haus- bzw. Wohnungsbesitzer mit einer von ihnen ausgewählten Kernobstsorte zu bepflanzen.

Dafür wurde eine Sortenmappe erstellt, in welcher 11 alte Apfel- (*Ananasrenette*, *Cox Orange*, *Gravensteiner*, *Ilzer Rosenapfel*, *Kronprinz Rudolf*, *Lavanttaler Bananenapfel*, *London Pepping*, *Roter Herbstkalvill*, *Steirische Schafnase*, *Weißer Klarapfel* und *Wintergoldparmäne* und 4 alte Birnensorten (*Bosc's Flaschenbirne*, *Grüne Sommermagdalene*, *Gute Luise von Avranches* und *Williams Christbirne*) über Bildmaterial und kurzer Sortenbeschreibung charakterisiert wurden.

Die Sortenauswahl für diese Informationsmappe wurde von unterschiedlichen Kriterien bestimmt.

Einerseits wurden solche Apfel- und Birnensorten gewählt, die den ökologischen Ansprüchen in Graz gerecht werden. Da Graz in einer klimatischen Gunstregion liegt, konnten auch frostempfindliche Sorten, wie z. B. *Cox Orange* in das zur Auswahl stehende Sortensortiment aufgenommen werden. Würde es sich um ein Bepflanzungsprojekt in der Obersteiermark

handeln, so müsste die Sortenauswahl diese in diesem Gebiet vorherrschenden hohen ökologischen Ansprüche an die Kernobstvarietäten berücksichtigen.

Andererseits stellten die Reifezeitpunkte der jeweiligen Früchte ein Auswahlkriterium dar. So sollten in der Wohnanlage über einen längeren Zeitpunkt im Jahr unterschiedliche Sorten reifen, was den Austausch der Früchte der jeweiligen Baumbesitzer und damit die Kommunikation zwischen den Haus- bzw. Wohnungsinhabern untereinander fördern sollte. Damit wurde sowohl das Thema „Alte Kernobstsorten“ einer Bevölkerungsschicht näher gebracht, die normalerweise mit dieser Materie wohl nicht so vertraut ist, andererseits wurde ein sozialer Aspekt vor allem moderner Wohnbauprojekte, die mangelnde Kommunikation zwischen den jeweiligen Immobilienbesitzern, zum Thema gemacht. Durch den Austausch der zu unterschiedlichen Zeitpunkten reifenden Obstsorten wird möglicherweise die erste Hemmschwelle hinsichtlich sozialer Verständigung herabgesetzt.



Ansprechpersonen:  
 Mag. Stephan Monschein  
 Mag. Melanie Hofer  
 Mag. Dr. Karin Herbinger  
 Institut für Pflanzenphysiologie Graz  
 Schubertstraße 51  
 A-8020 Graz



Abb. 14: Alternative Bepflanzungsberatung

Die endgültige Sortenauswahl durch die zukünftigen Haus- bzw. Wohnungseigentümer wurde nach einer Sortenverkostungsveranstaltung, wo alle die in der Sortenmappe angeführten Varietäten zur Degustation angeboten wurden, getroffen.

Dieses Projekt hatte aber auch noch einen weiteren positiven Effekt. Durch die Notwendigkeit, für die entsprechend ausgewählten Apfel- und Birnensorten auch das Pflanzmaterial, also die Bäume zu organisieren, wurde mit unterschiedlichen Baumschulen Kontakt aufgenommen. Dadurch konnten einerseits jene Baumschulen selektiert werden, die grundsätzlich Interesse an der Kultivierung bzw. dem Verkauf alter Sorten haben, andererseits wurde durch die gezielte Nachfrage betreffend spezieller Varietäten auch das Baumschulsortiment hinsichtlich alter Kultivare verbessert.

Durch weitere Ausstellungen (z. B. Kunsthaus Köflach; 2008) und Sortenverkostungen (z. B. Bio-Apfelwettenfest, Kaindorf/Hartberg; 2007) wurde und wird versucht das Thema „Alte Kernobstsorten“ und damit auch den Begriff Vielfalt als positiv besetzten Terminus breitflächig zu etablieren.

Vielleicht gelingt es durch derlei Maßnahmen die Sensibilität für Streuobstwiesen und deren alte Kernobstsorten zu erwecken und damit den Erhalt dieser Kulturlandschaft im Sinne der Nachhaltigkeit für zukünftige Generationen zu sichern.



## 5. Schlussfolgerung

Die Intention dieser Arbeit war es, die gegenwärtige Diversität alter Apfel- und Birnensorten (*Malus x domestica* BORKH. und *Pyrus communis* L.) in der Steiermark und Teilen Sloweniens festzustellen und sie mit der edaphischen und klimatischen Vielfalt des Untersuchungsgebietes zu korrelieren.

Dieser ökologische Ansatz konnte nur für die Steiermark weiterverfolgt werden, da in Slowenien nur spezielle Sortengärten in diese Diversitätsstudie miteinbezogen wurden und so die Entwicklung dieser gesamtheitlichen Betrachtung als nicht zielführend anzusehen ist.

Um die ökologische Wechselbeziehung der aufgefundenen Varietäten mit ihrem Lebensraum feststellen zu können war es vorerst notwendig, die tatsächliche Identität der, verteilt über die gesamte Steiermark aufgesammelten Kernobstproben zu enthüllen.

Lokale Sortenbezeichnungen, sowie das Auftreten der phänotypischen und genotypischen Varianz machten die Verwendung einer genetischen Sortencharakterisierungsmethode, die Mikrosatellitenanalyse, notwendig.

Neben den klassisch pomologischen Merkmalen, wie der Beschreibung der äußeren und inneren Fruchteigenschaften, wurde nun ein neues, von biotischen und abiotischen Einflussfaktoren unabhängiges Sortencharakteristikum eingeführt: Allellängen in den untersuchten Mikrosatellitenloci.

Auf Basis dieser genetischen Merkmale wurde eine Referenzsortendatenbank zur Bestimmung unbekannter Aufsammlungen geschaffen.

Welche ökologischen Schlüsse sind aus dieser Diversitätsstudie zu ziehen?

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchung der gegenwärtigen Diversität alter Kernobstorten lassen sich die ökologischen Ansprüche der jeweiligen Sorten aus deren Verteilung im Untersuchungsgebiet ableiten. So ist zwischen „Generalisten“, mit geringen ökologisch physiologischen Ansprüchen und damit großer geographischer Verbreitung und „Spezialisten“ mit eingeschränkter Variabilität hinsichtlich ihres Standortes und damit kleinem Verbreitungsgebiet zu unterscheiden.

Als besonders bemerkenswert erweist sich die Tatsache, dass vor allem die Obersteiermark die größte noch vorhandene Sortenvielfalt aufweist. Gerade in diesen klimatisch und edaphisch anspruchsvollen Regionen konnten sich besonders widerstandsfähige Varietäten halten, die trotz ungünstiger ökologischer Bedingungen Früchte hervorbringen, die für den jeweiligen Endverbraucher von Nutzen sind.

Vielen dieser Kultivare konnte jedoch keine korrekte pomologische Sortenbezeichnung zugewiesen werden, da es sich entweder um sehr alte und seltene Varietäten handelt, die noch keine Entsprechung in der Referenzsortendatenbank finden, oder aber sie stellen genotypische Varianten dar, deren Kultivierung sich für den Besitzer als vorteilhaft erwiesen haben.

Um nun diese noch unbestimmten Varietäten ökologisch anspruchsvoller Standorte näher untersuchen zu können, wären weitere Projekte notwendig.

Durch zusätzliche Erhebungen (z. B. in den Wildalpen) und genetische Analysen könnten so weitere Kultivare in den Mikrosatelliten-Datenpool aufgenommen und deren Bestimmung ermöglicht werden. Darauf folgende Untersuchungen der Varietäten nach ökologisch physiologischen Gesichtspunkten könnten ihr Erfolgsgeheimnis der Besiedelung extremer Standorte entschlüsseln.

Gerade in den letzten Jahren ist von einer Renaissance alter Apfel- und Birnensorten zu sprechen. Dies betrifft nicht nur die Nachfrage nach den Früchten dieser Kultivare auf verschiedensten Bauernmärkten, auch die teilweise dadurch bedingten Auspflanzungsprojekte alter Kernobstvarietäten und damit die Wiederherstellung der die Kulturlandschaft in der Steiermark so prägenden Streuobstwiesen sind im Kommen begriffen.

Um nun zielführend Neuauspflanzungen durchführen zu können, ist es notwendig, die ökologischen Ansprüche der jeweiligen Sorten zu kennen, um standortgerecht die richtige Sortimentsauswahl zu treffen.

Diesen Anforderungen können durch die von uns gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der edaphisch und klimatisch bedingten Verteilung der alten Kernobstorten in der Steiermark Rechnung getragen werden.

Die heute noch vorkommenden Kernobstvarietäten repräsentieren ein an den jeweiligen Standort mit seinen ökologischen Ansprüchen optimal angepasstes Sortenspektrum. Weitere Untersuchungen dieser Kultivare wären unbedingt von Nöten.

## 6. Zusammenfassung

Die Kulturlandschaft Streuobstwiese mit ihrer Diversität an alten Apfel- (*Malus x domestica* BORKH.) und Birnensorten (*Pyrus communis* L.) ist durch unterschiedlichste anthropogene Einflüsse vom Aussterben bedroht.

Um gezielte Schutzmaßnahmen betreffend der genetischen Vielfalt dieser optimal an die unterschiedlichsten edaphischen und klimatischen Gegebenheiten des Untersuchungsgebietes (Steiermark, Teile Sloweniens) angepassten Kernobstvarietäten treffen zu können, ist es zu allererst notwendig, das tatsächlich noch vorhandene Sortenspektrum zu erfassen. Dafür wurde eine von biotischen und abiotischen Einflüssen unabhängige genetische Differenzierungs- und Charakterisierungsmethode gewählt, die Mikrosatellitenanalyse.

Um das Differenzierungspotential von jeweils 3 spezifischen Apfel- und Birnenmikrosatelliten zu testen, wurden 651 Apfel- und 180 Birnenaufsammlungen in diese Diversitätsstudie inkludiert. Durch deren Mikrosatellitenlängen konnten 248 Apfelkultivare und 86 Birnenvarietäten voneinander unterschieden werden. Es zeigte sich, dass 3 selektierte Mikrosatelliten für die Fragestellung der genetischen Differenzierung alter Kernobstsorten ausreichen, wobei das Auftreten von Populationssorten und Farbmutanten die prinzipiellen Grenzen der Mikrosatellitenanalyse als genetische Differenzierungspraxis aufzeigten. Diese auf somatische Mutationen zurückzuführenden genotypischen Varianten konnten mit Hilfe dieser Methode nicht unterschieden werden.

Durch die Einführung des neuen Sortencharakteristikums, die Allelkomposition der jeweils 3 selektierten Mikrosatelliten, wurde es notwendig, eine Referenzsortendatenbank auf genetischem Niveau zu gründen, um mit deren Hilfe die Bestimmung unbekannter bzw. mit lokalen Namensgebungen versehener Kernobstsorten zu ermöglichen. Die Apfelreferenzsortendatenbank umfasst 49 Sorten, die der Birne 6 Varietäten.

Um eine möglichst umfangreiche Referenzsortendatenbank zu erhalten, ist es notwendig, auch Kernobstvarietäten aus anderen mitteleuropäischen Streuobstbaugebieten in den Datenpool zu integrieren. Die Beprobung und Analyse von Kultivaren aus weit entfernten Gebieten ist zeit- und kostenaufwändig. Mit dem Landwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg (Südtirol) wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, das die Umrechnung der in den jeweiligen Labors aufgrund der Verwendung unterschiedlichster Analysesysteme generierten relativen Mikrosatellitenlängen zu absoluten gewährleistet. Dadurch steht dem Aufbau einer internationalen Datenbank nichts mehr im Wege.

Die Steiermark umfasst 113 Apfel- und 54 Birnenvarietäten. Diesen Varietäten konnten entsprechend ihres Vorkommens ihre ökologischen Ansprüche zugeordnet werden. Als Region mit der größten Sortenvielfalt stellte sich die Obersteiermark heraus.

Die Kernobstdiversität aus den Teilen Sloweniens umfasst 25 Apfel- und 19 Birnensorten. Überschneidungen mit dem steirischen Sortiment sind hauptsächlich historisch bedingt.

## 6. Literatur

- ABI PRISM<sup>®</sup> KURS 2002. Fragmentanalyse (310). Applied Biosystems.
- ANBAUWÜRDIGE OBSTSORTEN 1907. 52 Tafeln in zwölf farbigem Druck mit beschreibendem Text.- Druck u. Verlag Rud. Bechtold & Comp., Wiesbaden.
- BARIC S., MONSchein S., HOFER M., GRILL D. DALLA VIA J. 2008. Comparability of genotyping data obtained by different procedures – an inter-laboratory survey.-Journal of Horticultural Science & Biotechnology 83 (2): 183 – 190.
- BERNKOPF S. 1994. Geschichte des österreichischen Obstbaues.-In: GRÜNE REIHE DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT. BAND 7. Alte Obstsorten und Streuobstbau in Österreich. Bedeutung, Schutz und Erhaltung bedrohter Lebensräume. pp. 41 – 55.-austria medienservice. VM Verlags- und Medienservice Ges. mbH, Graz.
- BERNKOPF S. 2000. Bio-diversity in fruit-growing: The importance of fruit gene banks in commercial, scientific and practical terms. Paper presented at the Conference on: Perspectives for horticulture and viticulture in the alpine region in the third millenium.-Alpe-Adria Work Community. Villa Manin di Passariano – Codroipo (Udine).
- BERNKOPF S. 2005/a. Systematik und Entstehung der Kernobstsorten.-In: GRILL D. & KEPPEL H. Alte Apfel- und Birnensorten für den Streuobstbau. pp. 15 – 21.-Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- BERNKOPF S. 2005/b. Kulturgeschichte von Apfel und Birne.-In: GRILL D. & KEPPEL H. Alte Apfel- und Birnensorten für den Streuobstbau. pp. 22 – 30.-Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- BERNKOPF S., KEPPEL H. & NOVAK R. 1996. Neue alte Obstsorten. Herausgegeben vom Club Niederösterreich. 3. Auflage.-Österreichischer Agrarverlag, Wien.
- BÖTTNER J. 1923. Unsere besten Obstsorten.-Verlagsanstalt Trowitzsch & Sohn G.m.b.H, Frankfurt a. d. Oder.
- DER BROCKHAUS 1997. In fünfzehn Bänden. Zweiter Band Bav – Chi.-F. A. Brockhaus GmbH, Leipzig – Mannheim.
- BROOThAERTS W. 2003. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles.-Theoretical and Applied Genetics 106: 703 – 714.
- DELLAPORTA S. L., WOOD J. & HICKS J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II.-Plant Molecular Biology Reporter 1 (4): 19 – 21.

- DELMOTTE F., LETERME N. & SIMON J. C. 2001. Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique.-*Biotechniques* 31: 810 – 817.
- DIEL A. F. A. 1799 – 1819. Versuch einer systematischen Beschreibung in Deutschland vorhandener Kernobstsorten. Heft 1 – 21.-In der Andreäischen Buchhandlung, Frankfurt am Main.
- DIEL A. F. A. 1821 – 1832. Systematische Beschreibung der vorzüglichsten in Deutschland vorhandenen Kernobstsorten. Heft 22 – 27.-In der J.G. Cotta'schen Buchhandlung, Stuttgart und Tübingen.
- DUHAN K. 1957. Die wertvollsten Obstsorten. 1. Lieferung: Äpfel und Birnen (I).-Verlag Georg Fromme & Co., Wien.
- ELLEGREN H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution.-*Nature Reviews Genetics* 5: 435 – 445.
- ERLACH A. 1994. Ökologie des Streuobstbaues.-In: GRÜNE REIHE DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT. BAND 7. Alte Obstsorten und Streuobstbau in Österreich. Bedeutung, Schutz und Erhaltung bedrohter Lebensräume. pp. 57 – 102.-austria medienservice. VM Verlags- und Medienservice Ges. mbH, Graz.
- FAO 2008. FAO website: <http://faostat.fao.org>
- FAULAND K., HOFER M., HERBINGER K., MONSCHEIN ST., KEPPEL H. & GRILL D. 2005. Regionalspezifische Verbreitung alter Apfelsorten in der Steiermark – Ergebnisse von Erhebungen in Verbindung mit dem Geographischen Informationssystem (GIS).-*Mitteilungen Klosterneuburg* 55: 177 – 183.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ F., CLARKE J. B. & TOBUTT K. R. 2004. Preferential amplifikation of microsatellite alleles: an example in apple.-*Acta Horticulturae* 663: 87 – 89.
- FORTE A. V., IGNATOV A. N., PONOMARENKO V. V., DOROKHOV D. B. & SAVELYEV N. I. 2002. Phylogeny of the *Malus* (apple tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis.-*Russian Journal of Genetics* 38: 1150 – 1160.
- FUJIMORI S., WASHIO T., HIGO K., OHTOMO Y., MURAKAMI K., MATSUBARA K., KAWAI J., CARNINCI P., HAYASHIZAKI Y., KIKUCHI S. & TOMITA M. 2003. A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription.-*Federation of European Biochemical Societies Letters* 554: 17 – 22.
- FUSSI B. 2003. Kartierung und pomologische Beschreibung alter Apfel- und Birnensorten im Bezirk Murau.- Diplomarbeit an der Karl-Franzens-Universität Graz.

- GABER R. 1994. Obstsortenerhaltung.-In: GRÜNE REIHE DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT. BAND 7. Alte Obstsorten und Streuobstbau in Österreich. Bedeutung, Schutz und Erhaltung bedrohter Lebensräume. pp. 199 – 262.- austria medienservice. VM Verlags- und Medienservice Ges. mbH, Graz.
- GENESCAN<sup>®</sup> REFERENCE GUIDE 2000. Chemistry Reference for the ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer. Applied Biosystems.
- GIANFRANCESCHI L., SEGLIAS N., TARCHINI R., KOMJANC M. & GESSLER C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple.-Theoretical and Applied Genetics 96: 1069 – 1076.
- GOULÃO L. & OLIVEIRA C. M. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* BORKH.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers.-Euphytica 122: 81 – 89.
- GOULÃO L., CABRITA L., OLIVEIRA C. M. & LEITÃO J. M. 2001. Comparing RAPD and AFLP<sup>™</sup> analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* BORKH.) cultivars.-Euphytica 119: 259 – 270.
- GRILL D. & KEPPEL H. 2005. Alte Apfel- und Birnensorten für den Streuobstbau.- Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- GUILFORD P., PRAKASH S., ZHU J. M., RIKKERINK E., GARDINER S., BASSETT H. & FORSTER R. 1997. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification.-Theoretical and Applied Genetics 94: 249 – 254.
- HAMMER K. 2003. A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources.-Genetic Resources and Crop Evolution 50: 3 – 10.
- HARRIS S. A., ROBINSON J. P. & JUNIPER B. E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple.-Trends in Genetics 18: 426 – 430.
- HARTMANN W. 2003. Farbatlas alte Obstsorten.-Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- HEHENBERGER L. 2005. Bedeutung der Streuobstwiese für den Tourismus.-In: GRILL D. & KEPPEL H. Alte Apfel- und Birnensorten für den Streuobstbau. pp. 55 – 60.-Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- HERBINGER K., HOFER M., MONSCHEIN S., FAULAND K. & GRILL D. 2004/a. Alte Apfelsorten: Gesund und schmackhaft.-Besseres Obst 7/2004: 15 – 16.
- HERBINGER K., HOFER M., MONSCHEIN S., FAULAND K. & GRILL D. 2004/b. Alte Apfelsorten: Vielfältiges Qualitätsspektrum.-Besseres Obst 9/2004: 26 – 28.

- HLUBEK F. 1833. Beschreibung der Obstsorten in der Central-Obstbaumschule am Ständischen Musterhofe zu Grätz. Herausgegeben von der k. k. Landwirtschaftsgesellschaft in Steyermark. Erste Lieferung: Das Kernobst. I. Aepfel. 2. Auflage.-Druck und Papier von den Andreas Leykam'schen Erben, Grätz.
- HODGKIN T., ROVIGLIONI R., DE VICENTE M. C. & DUDNIK N. 2001. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources.-Acta Horticulturae 546: 107 – 118.
- HOKANSON S. C., SZEWC-MCFADDEN A. K., LAMBOY W. F. & MCFERSON J. R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection.-Theoretical and Applied Genetics 97: 671 – 683.
- HOKANSON S. C., LAMBOY W. F., SZEWC-MCFADDEN A. K. & MCFERSON J. R. 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids.-Euphytica 118: 281 – 294.
- ITOIZ R. & ROYO J. B. 2003. Isoenzymatic variability in an apple germplasm bank.-Genetic Resources and Crop Evolution 50: 391 – 400.
- IVANCIC A., TURK J., ROZMAN C. & SSKO M. 2003. Agriculture in the slovenian transitional economy: The preservation of genetic diversity of plants and ethical consequences.-Journal of Agricultural and Environmental Ethics 16: 337 – 365.
- JAHN F., LUCAS E. & OBERDIECK J. G. C. 1865. Illustriertes Handbuch der Obstkunde. Vierter Band: Äpfel.-Verlag der Dorn'schen Buchhandlung, Ravensburg.
- JANICK J., CUMMINS J. N., BROWN S. K. & HEMMAT M. 1996. Apples.-In: JANICK J. & MOORE J. N. Fruit Breeding, Volume 1: Tree and Tropical Fruits. pp. 1 – 77.-John Wiley & Sons Inc., New York.
- JOHN M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics.-Nucleic Acids Research 20(9): 2381.
- KARL J., STÖGER H., KATSCHNER A. & REITER R. 1949. Festschrift zum 60jährigen Bestande des Landes-Obst- und Weinbauvereins für Steiermark.-Landes-Obst- und Weinbauverein für Steiermark, Graz.
- KASHI Y., KING D. & SOLLER M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation.-Trends in Genetics 13(2): 74 – 78.
- KASHI Y. & SOLLER M. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites.-In: GOLDSTEIN D. B. & SCHLÖTTERER C. Microsatellites. Evolution and Applications. pp. 11 – 23.-Oxford University Press, Inc., New York.



- KENIS K., PAUWELS E., VAN HOUTVINCK N. & KEULEMANS J. 2001. The use of microsatellites to establish unique fingerprints for apple cultivars and some of their descendants.-Acta Horticulturae 546: 427 – 431.
- KENIS K. & KEULEMANS J. 2005. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus x domestica* BORKH.) based on AFLP and microsatellite markers.-Molecular Breeding 15: 205 – 219.
- KEPPEL H. 1989. Pomologische Beschreibung alter Mostapfelsorten aus der Steiermark.-Mitteilungen Klosterneuburg 39: 13 – 20.
- KEPPEL H., PIEBER K., WEISS J. & HIEBLER A. 1998. Obstbau, 2. Auflage.-Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- KEPPEL H., HOFER M., TAUSZ M. & GRILL D. 2001. Eine Genbank für Kernobstsorten in der Steiermark und eine Analyse ihrer Apfelsorten (*Malus domestica*, Rosaceae-Maloideae).-Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereins für Steiermark 131: 129 – 139.
- KEPPEL H., FUSSI B., HOFER M. & GRILL D. 2002. Alte Kernobstsorten im Bezirk Murau.-Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereins für Steiermark 132: 139 – 148.
- KOLLER B., LEHMANN A., McDERMOTT J. M. & GESSLER C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers.-Theoretical and Applied Genetics 85: 901 – 904.
- KRÜMMEL H., GROH W. FRIEDRICH G. 1964. Deutsche Obstsorten.-Deutscher Bauernverlag, Berlin.
- LANDESFACHORGANE UND OBSTBAUVEREIN FÜR MITTELSTEIERMARK IN GRAZ 1904. Steiermarks Obstbau, die Obstproduktion, der Obsthandel usw. Herausgegeben vom Steiermärkischen Landesausschuss in Graz. Zusammengestellt von den Landesfachorganen und dem Obstbauvereine für Mittelsteiermark in Graz gelegentlich der Internationalen Obstausstellung zu Düsseldorf 1904.-Verlag des Steiermärkischen Landes-Ausschusses. Deutsche Vereins-Druckerei Graz.
- LAUCHE W. 1882. Deutsche Pomologie. Äpfel.-Verlag von Paul Parey, Berlin.
- LIEBHARD R., GIANFRANCESCHI L., KOLLER B., RYDER C. D., TARCHINI R., VAN DE WEG E. & GESSLER C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* BORKH.).-Molecular Breeding 10: 217 – 241.
- LÖSCHNIG J. 1913. Die Mostbirnen. Beschreibung der in Österreich am häufigsten angepflanzten Mostbirnensorten.-Friedrich Sperl, Wien.
- LÖSCHNIG J. 1927. Oesterreichs Frühbirnensorten. Band XIII.-N.-Ö. Landes-Landwirtschaftskammer, Wien.

- LÖSCHNIG J., MÜLLER H. M. & PFEIFFER H. 1912. Empfehlenswerte Obstsorten.- Kommissionsverlag von Wilhelm Frick, k. u. k. Hofbuchhändler, Wien.
- LOTT K. 1993. Der historische Obstbau in Deutschland zwischen 1850 und 1910, Geschichte, Dokumentation. Aussagen für den aktuellen Streuobstbau. Dissertation Fachbereich Agrar- und Gartenbauwissenschaften an der Humboldt-Universität, Berlin.
- MALNOY M., REYNOIRD J. P., MOURGUES F., CHEVREAU E. & SIMONEAU P. 2001. A method for isolating total RNA from pear leaves.-*Plant Molecular Biology Reporter* 19: 69a – 69f.
- MERTES G., SCHÄFER T., SCHILD T. A., SCHMIDT G., SCHUSTER D. & VOM STEIN J. 1997. Automatische genetische Analytik.-WILEY-VCH, Weinheim.
- MONSCHEIN S. 2006. Alte Apfelsorten vom Aussterben bedroht. Neue Zukunft für Kernobst von Streuobstbeständen.-*Da Schau Her. Die Kulturzeitschrift aus Österreichs Mitte* 27: 12 – 16.
- MONSCHEIN S., GRUBE M., HERBINGER K., HOFER M., KEPPEL H. & GRILL D. 2004. Anwendung der Mikrosatellitenanalyse zur Untersuchung alter Apfelsorten (*Malus domestica* BORKH.) in der Steiermark und Teilen Sloweniens.-*Mitteilungen Klosterneuburg* 54: 122 – 128.
- MONSCHEIN S., HOFER M., HERBINGER K. UND GRILL D. 2005. Bestimmung alter Sorten.-In: GRILL D. & KEPPEL H. Alte Apfel- und Birnensorten für den Streuobstbau. pp. 71 – 79.- Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- MONSCHEIN S., GRUBE M. & GRILL D. 2006. Assessment of the genetic diversity of native apple cultivars in the south eastern ranges of the Alps with three selected microsatellite loci.- *Journal of Applied Botany and Food Quality* 80: 135 – 137.
- MORGAN J. & RICHARDS A. 1993. The book of apples.-Ebury Press, London.
- MÜLLER H. J. 2001. PCR-Optimierung.-In: PCR, Polymerasekettenreaktion. pp. 89 – 99.- Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- NACH DER ARBEIT 1938 – 1950. Illustrierte Wochenzeitung für Garten, Siedlung u. Kleintierhaltung, Obsttafeln.-Fleischmarkt 5, Wien I.
- OBERDIECK J. G. C. 1881. Deutschlands beste Obstsorten.-Verlag von Hugo Voigt, Hofbuchhandlung Sr. Königl. Hoheit des Prinzen Friedrich Karl von Preußen, Leipzig.
- OBSTBAUVEREIN FÜR MITTELSTEIEMARK 1904. Obstgrundbuch für Steiermark. Kurze Beschreibung der für Steiermark wichtigsten Apfel- und Birnensorten. Herausgegeben vom Obstbauvereine für Mittelsteiermark. 2. Auflage.-Verlag des Obstbauvereins für Mittelsteiermark, Buchdruckerei „Gutenberg“, Graz.
- ÖSTAT. 2001. Österreichisches Statistisches Jahrbuch 2001.-Statistisches Zentralamt, Wien.

- OTTO H., SCHLACHER R., FAULAND K., HOFER M. & GRILL D. 2005. Die Streuobstbestände.-In: GRILL D. & KEPPEL H. Alte Apfel- und Birnensorten für den Streuobstbau. pp. 44 – 54.- Leopold-Stocker-Verlag, Graz – Stuttgart.
- PIEBER K. 2007. Einige Hinweise zur Befruchtungsbiologie der Obstgehölze. Teil 1.-Obst-Wein-Garten 76: 4 – 6.
- PIYAMONGKOL W., BERMUDEZ M. G., HARPER J. C. & WELLS D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis.-Molecular Human Reproduction 9/7: 411 – 420.
- QIAGEN 2000. DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook. For DNA isolation from plant tissue.
- ROBINSON J. P., HARRIS S. A. & JUNIPER B. E. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* MILL. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* BORKH.-Plant Systematics and Evolution 226: 35 – 58.
- RÖSLER M. 1992. Erhaltung und Förderung von Streuobstwiesen, Modellstudie Gemeinde Boll, Schwäbische Alb.
- ROYO J. B. & ITOIZ R. 2004. Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* BORKH.) and the congruence among classifications.-Genetic Resources and Crop Evolution 51: 153 – 160.
- SACKL P. & SAMWALD O. 1997. Atlas der Brutvögel der Steiermark.-austria medien service, Graz.
- SCHLÖTTERER CH. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA.-Chromosoma 109: 365 – 371.
- SHINDE D., LAI Y., SUN F. & ARNHEIM N. 2003. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured bei PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites.-Nucleic Acids Research 31/3: 974 – 980.
- SORTENMAPPE 2000. Verfügbare Obstsorten aus Niederösterreich.-Niederösterreichische Landesregierung & Arche Noah, Schiltern.
- STATISTIK AUSTRIA 2008. Statistik Austria website: <http://www.statistik.at>.
- STEIERMÄRKISCHER LANDES-AUSSCHUSS 1904. Landes-Normal-Sortiment von Äpfeln und Birnen für Steiermark. Herausgegeben vom Steiermärkischen Landes-Ausschusse.-Deutsche Vereins-Druckerei Graz.
- STEIERMÄRKISCHES LANDESARCHIV<sup>©</sup>. FA1D, Steiermärkisches Landesarchiv, Karmeliterplatz 3, A-8010 Graz.

- UNSERE BESTEN DEUTSCHEN OBSTSORTEN 1920. Band I: Äpfel. IV. Auflage.-Rud. Bechtold & Comp., Wiesbaden.
- VENTURI S., DONDINI L., DONINI P. & SANSAVINI S. 2006. Retrotransposons characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers.-Theoretical and Applied Genetics 112: 440 – 444.
- VEREINSLEITUNG DES STEIERMÄRKISCHEN OBSTBAUVEREINES 1915. Festschrift zur Feier des 25jährigen Bestehens des Steiermärkischen Obstbauvereines zugleich Jahresbericht für 1914.-Verlag des Steiermärkischen Obstbauvereines, Graz.
- VORNAM B. & GEBHARDT K. 2000. PCR-based markers reveal genetic identity and diversity in subset collections of wild and cultivated apple.-Acta Horticulturae 530: 463 – 468.
- VOTTELER W. 1986. Verzeichnis der Apfel- und Birnensorten.-Obst- und Gartenbauverlag, München.
- WEBER J. L. & MAY P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction.-American Journal of Human Genetics 44: 388 – 396.
- WIKIPEDIA 2007/a. wikipedia website: <http://de.wikipedia.org/wiki/Karlsgarten>
- WIKIPEDIA 2007/b. wikipedia website: <http://de.wikipedia.org/wiki/Apfelsorten>
- WIKIPEDIA 2008. wikipedia website: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bestimmung>
- WILSON M. F. & BLUNDEN C. A 1983. Changes in the levels of polyphenols in three pear varieties during bud development.-Journal of Science of Food and Agriculture 34: 973 – 978.
- YAMAMOTO T., KIMURA T., SHODA M., BAN Y., HAYASHI T. & MATSUTA N. 2002/a. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* NAKAI).-Molecular Ecology Notes 2: 14 – 16.
- YAMAMOTO T., KIMURA T., SAWAMURA Y., MANABE T., KOTOBUKI K., HAYASHI T., BAN Y. & MATSUTA N. 2002/b. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear.-Euphytica 124: 129 – 137.