



# IDENTIFIZIERUNG UND ECHTHEITSKONTROLLE REGIONALER OBSTERZEUGUNG

*Anleitungen für Produzenten und anderen Stakeholders*

Projekt IDARPO: ITMS 305011X831

Kooperationsprogramm Interreg V-A SK-AT



 HBLFA Francisco Josephinum  
Wieselburg

2022

# IDENTIFIZIERUNG UND ECHTHEITSKONTROLLE REGIONALER OBSTERZEUGUNG

*Anleitungen für Produzenten und anderen Stakeholders*

## ***Autoren:***

Mgr. Katarína Ondreičková, PhD.

Dr. Josef Rathbauer

Mgr. Martina Hudcovicová, PhD.

Mgr. Lenka Klčová, PhD.

Mgr. Marcela Gubišová, PhD.

Ing. Jozef Gubiš, PhD.

**2022**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einführung .....	2
2	Genetische Analysen .....	3
2.1	Probenahme .....	5
2.2	DNA Isolierung.....	5
2.2.1	Gründlicher Aufschluss von Gewebe, Zellen und deren Bestandteilen.....	6
2.2.2	DNA Reinigung.....	7
2.2.3	Präzipitation und Konzentration der Nukleinsäure.....	8
2.3	Qualitäts- und Quantitätskontrolle der isolierten DNA.....	8
2.4	PCR-Amplifikation eines Mikrosatellitenmarkers.....	11
2.5	Nachweis von Mikrosatellitengrößen und Vergleich unbekannter Proben mit Standards .....	12
3	Isotopenanalyse.....	15
3.1	Probenahme .....	16
3.2	Probenaufbereitung .....	17
3.3	Bestimmung der leichten stabilen Isotopen .....	19
3.3.1	Definition Isotope .....	20
3.3.2	Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) – Funktion und Aufbau .....	20
3.4	Ergebnisse.....	23

# 1 Einführung

Innerhalb der Europäischen Union wird der Durchsetzung von Vorschriften zur Qualitätskontrolle von Lebensmitteln zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt. Die geografische Herkunft von Rohstoffen oder Lebensmitteln ist oft eine wichtige Information, aufgrund der Verbraucher bereit sind, höhere Preise zu zahlen. Häufig bevorzugen diese Verbraucher Lebensmittel regionaler oder nationaler Herkunft gegenüber Lebensmitteln aus anderen Ländern, was es solchen nationalen Produzenten ermöglicht, höhere Preise zu verlangen. Da die Angabe der deklarierten geografischen Herkunft zu einem höheren Gewinn führen kann, ist die Kontrolle dieser Herkunft notwendig, um zu verhindern, dass sie falsch gekennzeichnet oder gefälscht wird. Aus diesem Grund ist es notwendig, landwirtschaftliche Kulturen zu kontrollieren, sowohl durch die Identifizierung der Sorten und die Bestätigung der Echtheit der Sorten, als auch durch die Bestätigung der Herkunft ihrer Produktion in den jeweiligen deklarierten Regionen. Die genetische Analyse auf der Grundlage molekularer (genetischer) Marker, so genannter Mikrosatelliten, bei denen es sich um kurze DNA-Abschnitte handelt, die aus mehreren Wiederholungen und normalerweise aus 2–6 Basenpaaren bestehen, wird meistens zur Identifizierung von Sorten verwendet. Diese Marker sind in Zertifizierungsprogrammen sehr nützlich, um neue Varianten zu schützen. Zum anderen dient die Isotopenanalyse zur Herkunftskontrolle von Lebensmitteln, als effektives analytisches Instrument, um die Echtheit von Lebensmitteln und Getränken und die Herkunftsregion bzw. das Herkunftsgebiet zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser beiden verwendeten Methoden können miteinander kombiniert werden, um die Zunahme der Diskriminierung und/oder die Identifizierung unterschiedlicher geografischer Herkünfte und Sorten zu ermöglichen sowie die traditionellen heimischen Agrarprodukte zu schützen.

## 2 Genetische Analysen

Die genetische Identifizierung von Sorten ist eine zuverlässige Methode, um sie in vielen wirtschaftlich nutzbaren Kulturen zu unterscheiden. Darüber hinaus ist diese Methode schnell, genau und effizient, nicht nur für die Charakterisierung von Sorten, sondern auch für die Sortenzüchtung, den Registrierungsprozess, die Saatgutproduktion, den Handel, die Inspektion und letztendlich den Patentschutz. Diese Methode basiert auf dem DNA-Molekül (Desoxyribonukleinsäure), das als Träger der Erbinformation der Zelle das Wachstum, die Teilung und die Regeneration der Zelle steuert. Bei Protozoen und Vielzellern wird DNA hauptsächlich im Zellkern und zu einem geringeren Teil in den Mitochondrien gespeichert, bei Pflanzen auch in den Chloroplasten. Meist wird die DNA in der Zelle als Doppelhelix gespeichert, die relativ dünn ist, andererseits eine große Länge erreicht, die die Größe der gesamten Zelle um ein Vielfaches übersteigt. Aus diesem Grund ist die DNA in der Zelle sehr gebogen und aufgerollt. Chemisch gesehen ist die DNA ein Polymer, das aus Grundbausteinen – Nukleotiden – besteht. Sie bestehen aus Zucker (Desoxyribose), an die eine stickstoffhaltige Base (Adenin A, Thymin T, Cytosin C oder Guanin G) gebunden ist, und einem Phosphorsäurerest (Abb. 1).

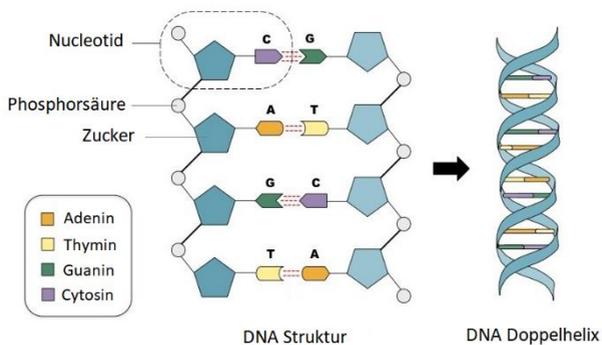


Abb. 1: Struktur eines DNA Moleküls

Molekulare oder genetische Marker auf der Basis von Mikrosatelliten werden zur Identifizierung von Sorten verwendet. Diese Mikrosatellitenmarker, auch Simple Sequence Repeats (SSR) genannt, sind DNA-Abschnitte, die sich wiederholende Nukleotidmotive enthalten, wobei die Länge des Grundmotivs 2–6 Nukleotide beträgt. Die Identifizierung von Sorten oder Individuen basiert anschließend auf der variablen Kopienzahl von Nukleotidwiederholungen, die sich zwischen Sorten unterscheiden. Durch den Vergleich der Größe eines solchen DNA-Abschnitts einer unbekanntem Sorte mit einem Standard wird die Echtheit dieser Sorte bestätigt oder verneint (Abb. 2). Durch die Verwendung einer ausreichenden Menge solcher Mikrosatellitenmarker und den Abgleich der unbekanntem Probe mit dem Standard kann die Echtheit der Sorte mit einer Genauigkeit von 99,99 % bestätigt werden.

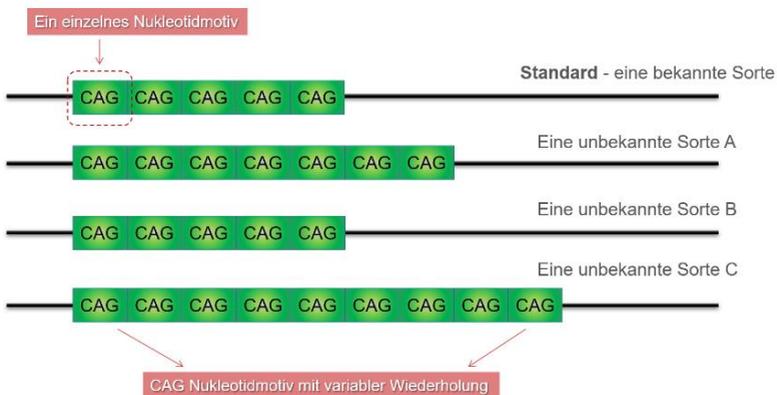


Abb. 2: Variable Kopienzahl des Nukleotidmotivs CAG (Mikrosatellit) in drei verschiedenen unbekanntem Sorten (A, B und C), wobei nur die unbekanntem Sorte B mit dem Standard abgeglichen und identifiziert werden kann.

Die genetische Analyse kann in mehrere Schritte unterteilt werden, die ihre eigenen spezifischen Regeln haben: Probenahme, DNA-Isolierung verbunden mit DNA-Qualitätskontrolle, PCR-Amplifikation des Mikrosatellitenmarkers, Fragmentierungsanalyse und Detektion der DNA-Regionsgröße bei Vorhandensein des Mikrosatelliten und schließlich Auswertung der Ergebnisse und Vergleich unbekannter Proben mit Standards.

## 2.1 Probenahme

Bei der Echtheitsbestimmung von Pflanzenmaterial werden idealerweise frische junge Blätter zur DNA-Isolierung verwendet. Dies kann jedoch nicht angewendet werden, wenn die Echtheit von frischem Obst aus einem Geschäft oder Markt verglichen wird. Bei der Verwendung frischer Blätter müssen Blätter von nur einem Baum und die jüngsten Blätter in einer Anzahl von 4-7 Stück entnommen werden. Die Blätter müssen in einen wiederverschließbaren Beutel gegeben, im Kühlschrank aufbewahrt und schnellstmöglich ins Labor transportiert werden. Bei der Verwendung von frischem Obst ist das Verfahren das gleiche, jedoch wird die DNA-Isolierung nur aus einem Stück Obst und nicht aus einer Mischung von Früchten durchgeführt. Bei der Entnahme mehrerer Proben zur Analyse ist jede Probe mit einer klaren und eindeutigen Kurzbeschreibung zu kennzeichnen.

## 2.2 DNA Isolierung

Die DNA-Isolierung ist der erste und wichtige Laborschritt bei der genetischen Analyse der Sortenechtheit. Es ist notwendig, die Ziel-DNA in ausreichender Menge und Qualität zu erhalten, ohne Beimischung von unnötigen Stoffen, den sogenannten Kontaminanten. Diese Kontaminanten können Rückstände von Proteinen, Zuckern, Fetten, etc. sein, die normalerweise in Zellen vorkommen (Abb. 3). Die DNA-Isolierung erfolgt auch in mehreren Schritten (Abb. 4).

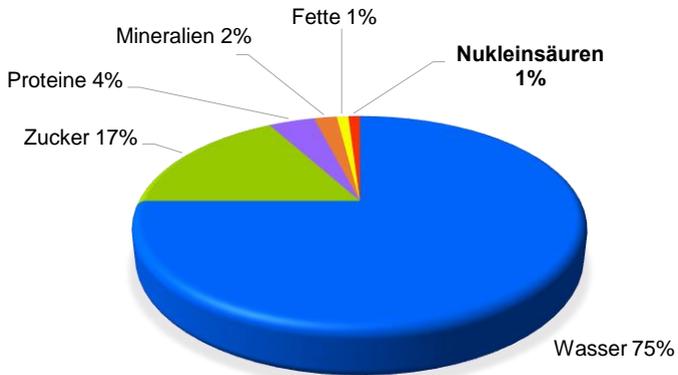


Abb. 3: Chemische Zusammensetzung und prozentueller Anteil der Hauptkomponenten einer Pflanzenzelle

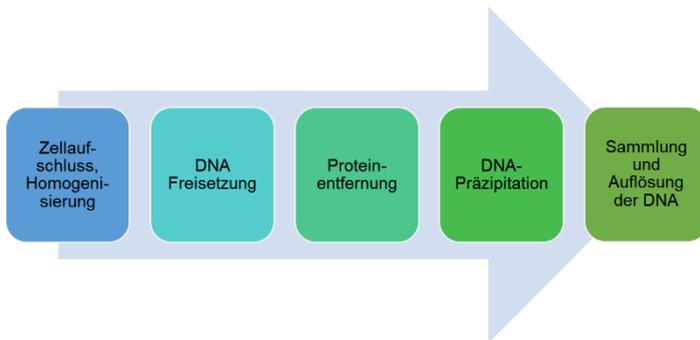


Abb. 4: Schema der DNA Isolierung von Zellen

### 2.2.1 Gründlicher Aufschluss von Gewebe, Zellen und deren Bestandteilen

Damit die DNA aus den Zellen freigesetzt werden kann, ist es notwendig, die Zellen aufzuschließen. Die Zellen höherer Organismen werden leichter und einfacher zerstört, im Gegensatz dazu ist Pflanzengewebe aufgrund des Vorhandenseins einer Zellwand

widerstandsfähiger. Die Homogenisierung des Gewebes und das Aufbrechen der Zellwände erfolgt mechanisch durch Zerkleinern oder Mahlen, Zerkleinern nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff (Abb. 5), Einwirkung von Enzymen, höherer Temperatur oder Ultraschall. Im nächsten Schritt werden die Zell- und Kernmembran mit einem Detergens (z.B. SDS) aufgeschlossen. Membranen bestehen aus Lipiden und Proteinen, während das Detergens ihre Bindungen aufricht und die Freisetzung von Nukleinsäuren in die Lösung ermöglicht. Anschließend bildet das Detergens Komplexe mit Lipiden und Proteinen, wodurch deren teilweise Ausfällung aus der Lösung verursacht wird.



Abb. 5: Homogenisierung des Gewebes in flüssigem Stickstoff

### 2.2.2 DNA Reinigung

Nachdem die Zellen aufgebrochen sind, wird ihr Inhalt ausgegossen und gemischt. Für wissenschaftliche Zwecke ist es wichtig die DNA von Proteinen zu reinigen. Proteine werden durch Fällung mit Phenol und Chloroform oder durch Aussalzen (z.B. Kaliumacetat, Natriumchlorid) entfernt. Zelluläre Enzyme (z.B. DNase-Enzym), die DNA zerstören könnten, müssen ebenfalls inaktiviert werden, z.B. durch EDTA, Natriumacetat, Hitze oder Phenol. Wenn saubere DNA ohne RNA

benötigt wird, ist es notwendig, die Entfernung der RNA in das Verfahren einzubeziehen, normalerweise durch die Wirkung des Enzyms RNase, das die RNA abbaut.

### 2.2.3 Präzipitation und Konzentration der Nukleinsäure

DNA ist in Wasser löslich und in Alkohol unlöslich, daher fällt sie nach Zugabe von Alkohol (Ethanol oder Isopropanol) zu einer Lösung mit gelöster DNA an der Grenzfläche zwischen Wasser und Alkohol aus. Der letzte Schritt besteht darin, die DNA zu trocknen und sie dann in einer kleinen Menge einer geeigneten Lösung (Pufferlösung, steriles Wasser...) aufzulösen, um eine DNA-Stammlösung mit hoher Konzentration zu erhalten. Die isolierte DNA ist sehr stabil und kann viele Jahre bei niedrigen Temperaturen (-4 bis -80°C) gelagert werden. Das spezifische Verfahren zur DNA-Isolierung und die Zusammensetzung der Lösungen hängt von der Art des Organismus, dem Zweck, für den die DNA benötigt wird, und der Methode der anschließenden Analyse ab.

### 2.3 Qualitäts- und Quantitätskontrolle der isolierten DNA

Die Kontrolle der erfolgreichen Isolierung und Bestimmung der DNA-Konzentration kann spektrophotometrisch oder fluoreszierend erfolgen. Das spektrophotometrische Verfahren basiert auf der Absorption von UV-Strahlung durch Nukleinsäuren mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm (Abb. 6A). Das Verfahren eignet sich für ausreichend saubere Proben. Die DNA-Reinheit kann auch spektrophotometrisch bestimmt werden, wenn die Extinktion der DNA-Lösung bei zwei Wellenlängen gemessen wird, insbesondere bei 260 und 280 nm. Anschließend wird das Verhältnis der bei den einzelnen Wellenlängen gemessenen Werte dieser Extinktionen berechnet und nach der Höhe ihres Wertes die Reinheit der DNA bestimmt, wobei reine DNA einen Wert von etwa 1,8 haben sollte. Die Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird für Proben mit vermeintlich niedriger

Konzentration und weniger reine Proben verwendet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wird und die Intensität des Signals auf einem Fluoreszenz-Spektrophotometer gemessen wird. Der Vorteil ist die hohe Spezifität, da sich der Farbstoff direkt an die DNA-Doppelhelix bindet (Abb. 6B).

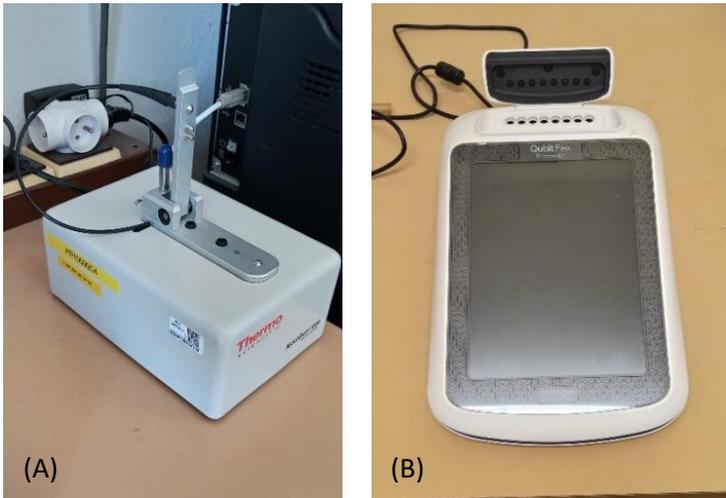


Abb. 6: Geräte zur spektrophotometrischen (A) and Fluoreszenz (B) Messung von Nukleinsäuren

Die Agarose-Elektrophorese wird sehr häufig verwendet, um die Qualität und Integrität isolierter DNA zu überprüfen. Die Elektrophorese ist eine der grundlegenden Methoden zur Trennung von Nukleinsäuren. Bei neutralem pH-Wert ist die DNA negativ geladen und bewegt sich im elektrischen Feld zur positiven Elektrode (Abb. 7). Um die Integrität isolierter DNA sichtbar zu machen, ist es am besten, Agarose als Elektrophoresemedium zu verwenden. Die Elektrophorese ermöglicht den direkten Nachweis von DNA-Fragmenten unter UV-Licht durch Färbung mit dem Interkalationsmittel Ethidiumbromid. Anschließend wird die DNA als

orangefarbener Streifen im Agarose-Gel auf einer UV-Lampe sichtbar gemacht (Abb. 8).

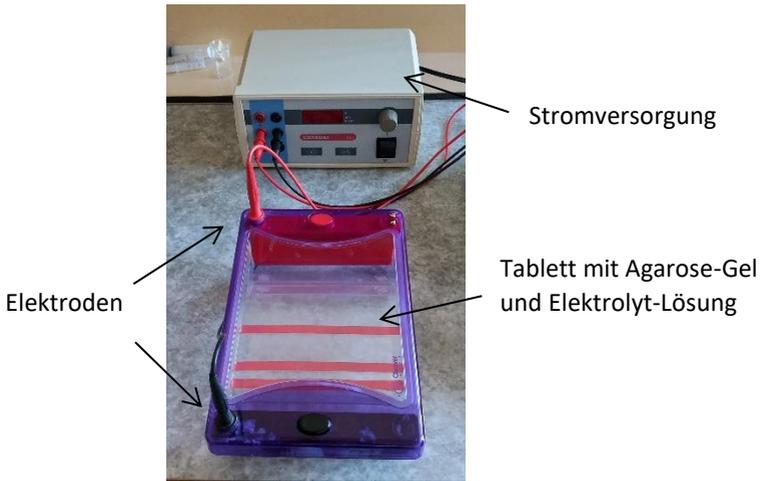


Abb. 7: Elektrophorese-Gerät für Agarose-Gels mit Stromversorgung

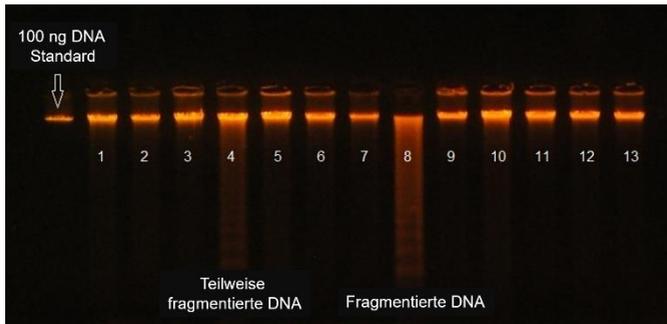


Abb. 8: Beispiel für die Visualisierung isolierter DNA in Agarose-Gel. Die Proben 1–3, 5–7 und 9–13 stellen kompakte DNA dar, die für weitere Analysen geeignet ist. Die Proben 4 und 8 stellen mehr oder weniger fragmentierte DNA dar, was bei weiteren Analysen zu Problemen führen kann.

## 2.4 PCR-Amplifikation eines Mikrosatellitenmarkers

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) ist eine Technik, die die Amplifikation eines Ziel-DNA-Abschnitts ermöglicht. Die PCR findet in Thermocycler-Geräten statt, wobei die Temperatur in den erforderlichen Zeitintervallen entsprechend dem gewählten Programm geändert wird (Abb. 9). Bei der Bestätigung der Sortenechtheit müssen mehrere Mikrosatellitenmarker (meist 8 bis 15) multipliziert werden, deren Übereinstimmung gleichzeitig bestätigt werden muss. Die Anzahl dieser Marker hängt von ihrer Trennschärfe ab.

Die Ähnlichkeit derart vervielfältigter DNA-Fragmente, die einen Mikrosatellitenmarker enthalten, kann entweder manuell oder automatisch verglichen werden. Beim manuellen Vergleich erfolgt die PCR ohne besondere Bedingungen, die DNA-Produkte werden nach der PCR elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Bei der PCR müssen keine fluoreszierenden oder anderweitig gekennzeichneten Chemikalien verwendet werden. Dieses Verfahren ist jedoch arbeitsaufwändig und wird derzeit nur minimal verwendet. Stattdessen werden sehr häufig fluoreszenzmarkierte kurze DNA-Fragmente, die sogenannten Primer, verwendet. Jede amplifizierte DNA wird fluoreszierend „markiert“ und anschließend im nächsten Schritt automatisch mittels Kapillarelektrophorese oder einem automatischen Sequenzer detektiert. Die Ausgabe erfolgt in grafischer und tabellarischer Form am Computer.



Abb. 9: Thermocycler – Gerät für die PCR Amplifikation - mehrfache Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Region

## 2.5 Nachweis von Mikrosatellitengrößen und Vergleich unbekannter Proben mit Standards

Wie oben erwähnt, kann die Größe des amplifizierten DNA-Fragments mit dem Auftreten eines Mikrosatelliten (die Größe der amplifizierten DNA hängt von der Anzahl der sich wiederholenden Mikrosatellitenmotive ab) auch manuell bestimmt und anschließend visuell auf Übereinstimmung unbekannter Proben mit einem bekannten Maßstab verglichen werden. Dieser Ansatz war in der Vergangenheit weit verbreitet, wurde aber heute aufgrund des höheren Zeit- und Laboraufwands mehr oder weniger aufgegeben. Der Output ist in diesem Fall in Form von grauen DNA-Streifen auf einem dünnen Polyacrylamidgel zu sehen, das mit Silber gefärbt werden muss. Auf einem solchen Gel können insgesamt 48 Proben analysiert werden. Ein Teil dieser 48 Proben muss für die Standards

übrig bleiben. Die Übereinstimmung in den Positionen der DNA-Banden zwischen den unbekanntem Proben und dem Standard werden manuell verglichen (Abb. 10).

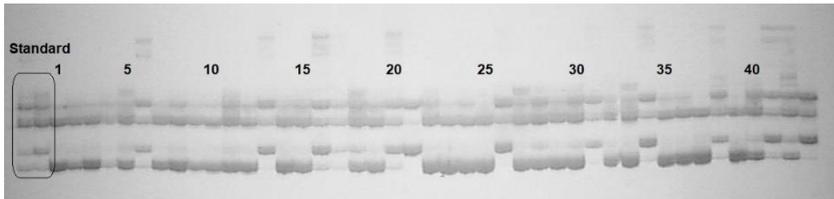


Abb. 10: Polyacrylamidgel mit unbekanntem Proben (1-43), gekennzeichnet durch Nummern – fünf Faltungen und ihr Vergleich mit Standardproben in den ersten beiden Linien im Gel (hervorgehoben mit Rahmen)

Die automatische Erkennung von Größen von DNA-Regionen mit Mikrosatelliten wird als Fragmentierungsanalyse bezeichnet und ist zeitlich viel schneller. Dabei wird die Fähigkeit des Detektors im automatischen Sequenzer genutzt, das Fluoreszenzsignal jedes amplifizierten DNA-Moleküls in der PCR zu erfassen und die Größe dieses Moleküls direkt an den Computer zu übertragen, wo mit Hilfe geeigneter Software diese DNA-Größen grafisch dargestellt werden. Anschließend wird die Übereinstimmung der DNA-Größen zwischen den Standard- und unbekanntem Proben verglichen, die in Form von Peaks bei der Größe angezeigt werden, bei der das höchste Fluoreszenzsignal aufgezeichnet wurde (Abb. 11).

Es ist auch notwendig, den homozygoten und heterozygoten Status der analysierten Sorten bzw. ihre Ploidie (Anzahl der Chromosomensätze) zu berücksichtigen. Daher kann in einer Probe nur eine DNA-Größe vorhanden sein, d.h. 1 Allel (homozygot) oder 2 oder mehr DNA-Größen (heterozygot). **Für die Identifizierung von Sorten ist jedoch eine Übereinstimmung aller DNA-Größen und aller verwendeten Mikrosatelliten unerlässlich.**

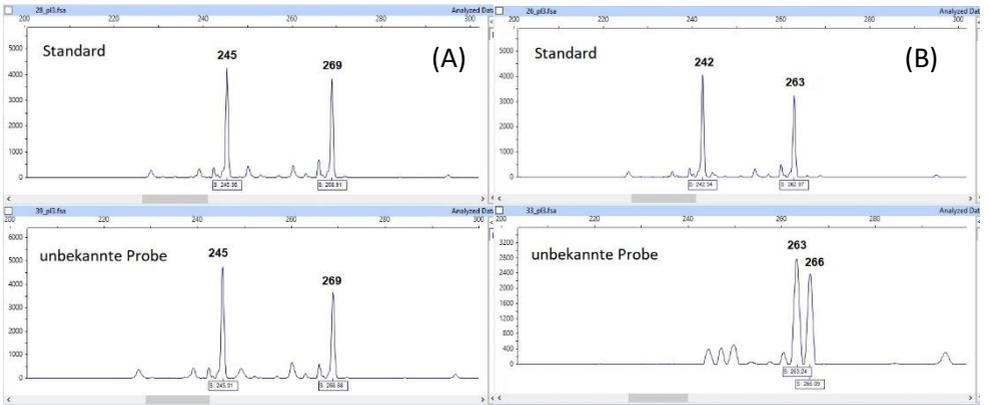


Abb. 11: Ergebnis der Fragmentierungsanalyse eines Mikrosatelliten, das eine Übereinstimmung in beiden DNA-Größen der unbekannt Probe mit dem Standard (A) und eine Nichtübereinstimmung der unbekannt Probe mit dem Standard in einer DNA-Größe (B) zeigt. In all diesen Fällen werden heterozygote und diploide Individuen gezeigt, d.h. sie haben zwei verschiedene Allele (Genformen) für diesen Mikrosatelliten.

### 3 Isotopenanalyse

Die Bestimmung der Gehalte der leichten stabilen Isotopen der Elemente C, H, N, O, S ist ein etabliertes Verfahren. Je nach Standort und Witterungsbedingungen variieren die Gehalte. Um Abweichungen oder falsche Zuordnungen der Herkunft feststellen zu können, müssen authentische Referenzproben gezogen und analysiert werden.

Im Rahmen dieses Projekts wurden Marillenproben aus Österreich, im Besonderen aus der Wachau, der Slowakei und anderen Herkunftsländern untersucht.

Im nachfolgenden Schema (Abb. 12) ist dargestellt welche Pflanzen- oder Fruchtteile für die unterschiedlichen Analysen verwendet und wie deren Aufbereitung durchgeführt wurden.

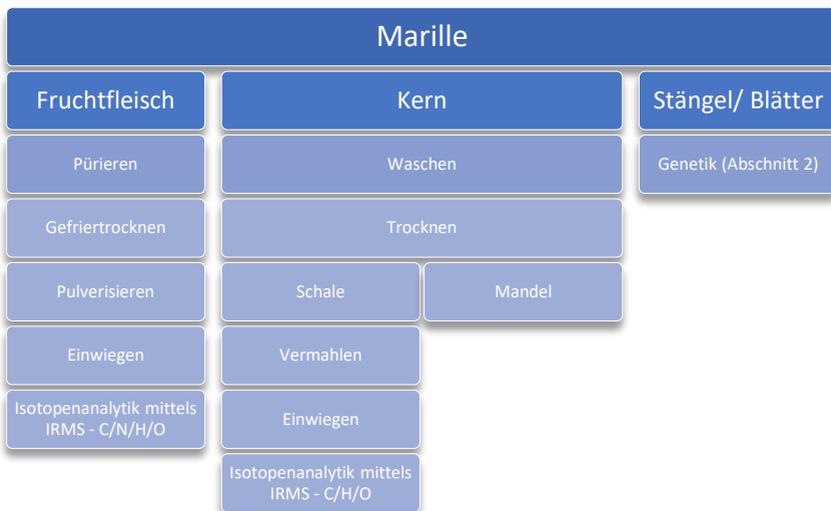


Abb. 12: Ablaufschema der Probenaufbereitung und Analyse

### 3.1 Probenahme

Die Probenahme der authentischen österreichischen Proben erfolgte durch das Amt der niederösterreichischen Landesregierung, Abteilung Lebensmittelkontrolle. Die Probenahme der slowakischen Proben erfolgte durch den slowakischen Projektpartner. Weitere Proben aus anderen Ländern wurden vom örtlichen Lebensmittelhandel bezogen.



Abb. 13: Marillenbaum bei der Probenahme

Die Probenahme, rund 1 kg Marillen, wurde dokumentiert (Datum, Probenehmer, Herkunft, Koordinaten,..). Die frischen oder tiefgekühlten Proben wurden zur weiteren Bearbeitung zur HBLFA Francisco Josephinum nach Wieselburg geliefert. In Abbildung 14 ist ein Beispiel einer tiefgekühlten Marillenprobe dargestellt.



Abb. 14: Tiefgekühlte Marillenprobe

### 3.2 Probenaufbereitung

Die Marillenproben sind im frischen oder tiefgekühlten Zustand im Labor eingetroffen. Jede Probe wurde mit einer Labornummer versehen und in das Laborbuch eingetragen. Danach erfolgte eine fotografische Dokumentation der Proben.

Im ersten Schritt der Aufbereitung wurden die Marillen in Fruchtfleisch und Kerne getrennt (Abbildung 15).



Abb. 15: Auftrennung der Marillen in Fruchtfleisch und Kerne  
Das Fruchtfleisch wurde mit einem Mixer püriert.



Abb. 16: Mixer

Das pürierte Fruchtfleisch wurde eingefroren und später gefriergetrocknet. Nach der Gefrierdrying wurde das Fruchtfleisch mit der Kugelmühle pulverisiert.

Nun ist das Fruchtfleisch fertig aufbereitet zum Einwiegen für die Isotopenanalyse.

Die Kerne wurden gewaschen, getrocknet und dann mit einer Zange oder mit dem Hammer geöffnet (Abbildung 17).



Abb. 17: Waschen und Öffnen der getrockneten Marillenkerne

Im nächsten Schritt wurden die holzige Schale und die Mandel getrennt. Die Mandel wurde verworfen. Die Schale wurde mit der Kugelmühle pulverisiert. Dieses aufbereitete Holzmehl wurde anschließend für die Isotopenanalyse in Metallkapseln eingewogen.

### 3.3 Bestimmung der leichten stabilen Isotopen

Zu den leichten stabilen Isotopen zählen die Elemente Kohlenstoff C, Wasserstoff H, Stickstoff N, Sauerstoff O und Schwefel S. Bei den untersuchten Marillenproben wurden beim Fruchtfleisch die C,H,N,O-Isotopen und beim holzigen Teil der Kerne die C,H,O-Isotopen bestimmt.

### 3.3.1 Definition Isotope

In der nachfolgenden Abbildung 18 sind die Eigenschaften von Isotopen dargestellt. Als Isotope werden Atome desselben chemischen Elements bezeichnet, die eine andere Neutronenzahl und damit auch andere Masse aufweisen. Es handelt sich stets um das gleiche Element mit gleicher Ordnungszahl, gleichen chemischen Eigenschaften und gleicher Protonenzahl.

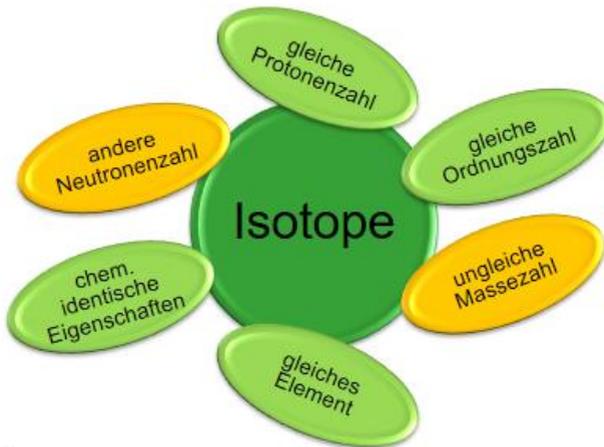


Abb. 18: Isotopen – Eigenschaften

### 3.3.2 Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) – Funktion und Aufbau

Mit einem Trägergas (Helium und  $\text{CO}_2$ ) werden die einzelnen Moleküle in das IRMS eingebracht, ionisiert und beschleunigt. Durch einen starken Magneten werden die unterschiedlich schweren Teilchen aufgetrennt und in Detektoren (cups) aufgefangen und gezählt.

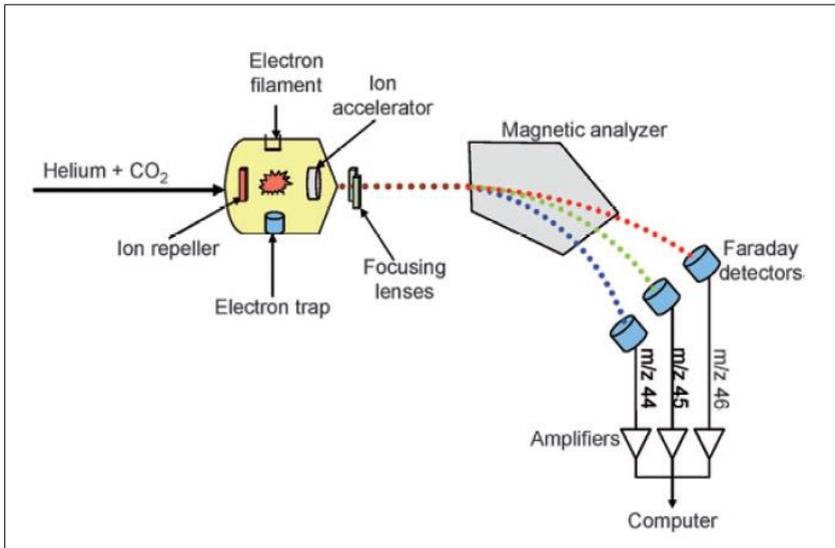
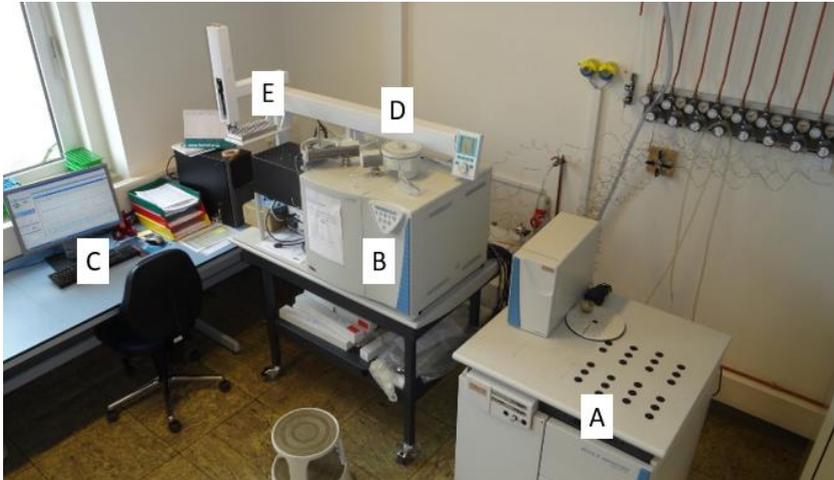


Abb. 19: Isotope ratio mass spectrometer (IRMS) – Schema

Die Proben müssen durch eine Vorbehandlung (vgl. Abschnitt 3.2) für die Isotopenanalyse analysierbar gemacht werden. Die Marillenproben (Fruchtfleisch, holziger Teil des Kerns) werden als „trockenes, fein aufgemahlenes Pulver“ in Metallkapseln gefüllt und in den Elementaranalysator eingebracht. In Abbildung 20 sind der IRMS und die Peripheriegeräte (Autosampler, Computer) dargestellt.



A= IRMS | B = Elementaranalysator | C = Eingabe und Steuerung | D = Autosampler für feste Proben | E = Autosampler für flüssige und gasförmige Proben

Abb. 20: Isotope ratio mass spectrometer (IRMS) - apparatus

Abbildung 21 zeigt einen Screen shot eines Messdiagramms. Die Auswertung erfolgt über die mitgelieferte Software.



Abb. 21: Messdiagramm der IRMS Analyse

### 3.4 Ergebnisse

Die Ergebnisse einer Isotopenmessung werden als relativer Unterschied zu einem festen Standard in Promill [ $^0/_{00}$ ] angegeben. Für Wasserstoff und Sauerstoff ist das Referenzmaterial „Standard mean ocean water“ (SMOW), für N der Luftstickstoff und für Kohlenstoff PDB (Pee Dee Belemnite).

pulp	$\delta^{15}\text{N} \text{‰ AIR}$	$\delta^{13}\text{C} \text{‰ PDB}$	$\delta\text{D} \text{‰ SMOW}$	$\delta^{18}\text{O} \text{‰ SMOW}$	kernel	$\delta^{13}\text{C} \text{‰ PDB}$	$\delta\text{D} \text{‰ SMOW}$	$\delta^{18}\text{O} \text{‰ SMOW}$
22-0423	5,38	-24,67	-8,0	28,89	22-0432	-25,20	-93,9	26,46
22-0424	0,18	-26,63	-33,1	30,75	22-0433	-26,93	-107,4	25,93
22-0425	2,37	-24,72	-6,0	30,28	22-0434	-25,10	-109,1	27,93
22-0426	3,25	-23,28	-21,4	29,21	22-0435	-22,11	-94,2	24,72
22-0427	1,65	-24,78	-22,4	29,08	22-0436	-23,22	-92,2	27,69

Abb. 22: Ergebnisse der Isotopenanalyse

Neben der tabellarischen Darstellung werden verschiedene graphische Auswertungen angewendet. In Abbildung 23 sind die Resultate des Marillenfruchtfleisches verschiedener Regionen des Jahres 2020 als zweidimensionales Diagramm (H-Isotope und C-Isotope) zu sehen.

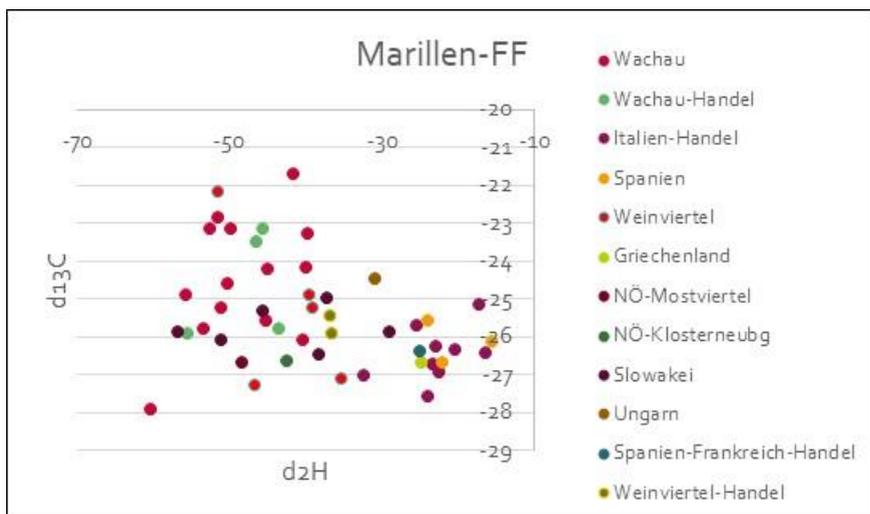


Abb. 23: Marillenfruchtfleisch 2020, H-, C-Isotopen

Die Untersuchungsergebnisse können auch als Boxplot-Diagramm dargestellt werden. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Wasserstoffisotopie des Fruchtfleisches von 3 Projektjahren je nach Herkunftsregion dargestellt.

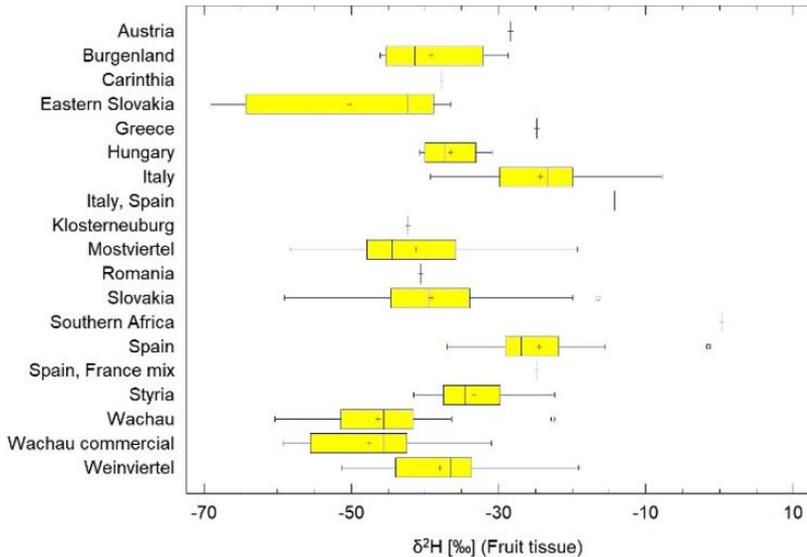


Abb. 24: Marillenfruchtfleisch (2019/20/21) - Wasserstoffisotopie

Die Ergebnisse der Proben der verschiedenen Regionen zeigen durchaus deutliche Unterschiede.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse der anderen Isotopen und der genetischen Analysen sind die Herkunftsangaben gut überprüf- und zuordenbar.

## Kontakte

### **DNA-Analysen:**

Dr. Martina Hudcovicová

NPPC – VÚRV

Bratislavská cesta 122

928 61 Piešťany

Slowakische Republik

[martina.hudcovicova@nppc.sk](mailto:martina.hudcovicova@nppc.sk)



### **Isotopenanalysen:**

Dr. Josef Rathbauer

HBLFA Francisco-Josephinum

Weinzierl 1,

3250 Wieselburg

Österreich

[josef.rathbauer@josephinum.at](mailto:josef.rathbauer@josephinum.at)

 HBLFA Francisco Josephinum  
Wieselburg

*Das Handbuch ist das Ergebnis des Projekts „Identifikácia a autentifikácia regionálnej produkcie ovocia / Identifizierung und Echtheitskontrolle regionaler Obsterzeugung“ (IDARPO, ITMS: 305011X831), das im Rahmen des Kooperationsprogramms INTERREG V-A SK-AT realisiert wurde.*

[www.sk-at-eu](http://www.sk-at-eu)

