

Artbestimmung von Schwarzpappeln (*Populus nigra*) mit Hilfe von Isoenzym- und DNS-Analysen – erste Beispiele aus Bayern

MONIKA KONNERT, ERWIN HUSSENDÖRFER UND KATRIN PELZER

Schlüsselwörter

Schwarzpappel, Artbestimmung, genetische Untersuchungen

Zusammenfassung

Die Unterscheidung von *P. nigra* von *P. deltoides* und den Hybriden *P. x euramericana* nur anhand von morphologischen Merkmalen ist schwierig und ungenau. Deshalb werden zunehmend biochemisch-genetische Methoden wie die Isoenzymanalyse und molekulargenetische Untersuchungen der cpDNS dafür eingesetzt. Diese Methoden werden kurz erläutert. Vor allem die *trnF-trnL*-Region der Chloroplasten-DNS eignet sich zur Artbestimmung von *P. nigra*. Erste Beispiele zur Identifizierung von Schwarzpappeln aus Bayern werden angeführt.

Schwarzpappel/Hybridpappeln – Probleme bei der Zuordnung

Seit dem 17. Jahrhundert werden in Europa Hybridpappelsorten angebaut. Sie sind wegen ihrer guten Masseleitung und der besseren Qualität des Stammholzes geschätzt. Die am weitesten verbreiteten Hybride sind Kreuzungen zwischen der Europäischen Schwarzpappel (*Populus nigra*) und der Kanadischen Schwarzpappel (*Populus deltoides*). Sie werden unter dem Sammelnamen *P. x euramericana* (Dode) Guinier geführt. Weil sich die beiden Arten *P. nigra* und *P. deltoides* leicht kreuzen lassen, war es problemlos, eine Vielzahl solcher Hybride zu züchten. Gepflanzte Hybridpappeln kreuzen sich aber auch mit einheimischen Schwarzpappeln. Dies führte zu einer weiteren genetischen Kontamination der einheimischen Schwarzpappelvorkommen. HEINZE (1998) betont, dass es auch im Hinblick auf die Züchtung neuer Pappelsorten wichtig ist, die genetische Vielfalt der heimischen Schwarzpappel zu erhalten.

Hybride stehen in vielen morphologischen Merkmalen zwischen ihren Elternarten und erschweren so eine sichere Zuordnung besonders am Altbaum. Auch die Nachkommen aus natürli-

chem Pollenflug zwischen Schwarzpappeln und Hybridpappeln sind morphologisch nicht mehr eindeutig einer Gruppe zuzuordnen, da in den meisten Merkmalen fließende Übergänge entstehen. So berichten z. B. FRANKE et al. (1997), dass bei einer Inventur der Schwarzpappel in Baden-Württemberg 60 % der Exemplare keine Wasserreiser zeigten, obwohl dies laut Literatur durchaus typisch für diese Baumart sein sollte.

Möglichkeiten zur sicheren Unterscheidung der Arten ergeben sich bei Anwendung biochemisch-genetischer (Isoenzymanalyse) und molekulargenetischer (DNS-Analyse) Methoden. Die einzelnen Gene, die die Hybrid-Nachkommen von den Eltern erben, bleiben in den Zellen unverändert nebeneinander bestehen bzw. werden über die Generationen auf Grund der Vererbungsregeln nach MENDEL weitergegeben. Gelingt es, Gene anhand entsprechender Marker (Genmarker) sichtbar zu machen, und kennt man die Genausstattung einer Art, so ist die Artbestimmung über genetische Verfahren möglich. Bei Generhaltungsmaßnahmen werden meist „artverdächtige“ Individuen auf Grund ihrer Morphologie erfasst, sicher bestimmt wird die Art dann über eine genetische Untersuchung.

Genetische Untersuchungen zur Unterscheidung von Schwarzpappeln und ihrer Hybride

Isoenzymanalyse

Die Isoenzymanalyse ist ein im Bereich der Forstgenetik gängiges Laborverfahren zur Bestimmung genetischer Strukturen auf der Basis von

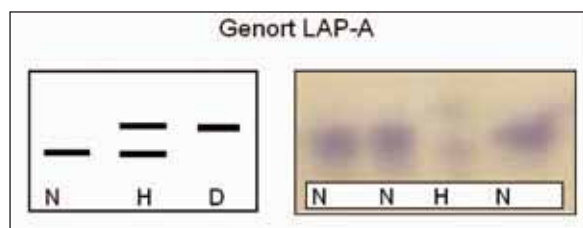


Abb. 1: Schematische Darstellung des bei Isoenzymanalyse erhältlichen Bandenmusters und Zymogramms nach Auftrennung der Isoenzyme am Genort LAP-A

Proteinen mit enzymatischer Funktion im Stoffwechsel. Isoenzyme sind stark genetisch fixierte, stabile und von der Umwelt unabhängige Merkmale. Sie können deshalb als Marker für Isoenzym-Genorte dienen. Die Methode ist relativ kostengünstig, der technische Aufwand vergleichsweise gering. Als Untersuchungsmaterial dienen Knospen in Winterruhe. Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass sich *P. nigra* und *P. deltoides* an bestimmten Isoenzym-Genorten eindeutig unterscheiden und dass ihre Hybride, *P. x euramericana*, die Genvarianten beider Arten besitzen. Arteigene und damit diskriminierende Genvarianten wurden an den Genorten AAT-A, AAT-B, LAP-A, PGM-A und PGI-B (JANSEN 1997; HUSSENDÖRFER 1998; FRANKE 2000; GEBHARDT 2004) (Abb. 1) erkannt.

DNS-Analysen

Diese Genorte erlauben nach heutigem Kenntnisstand die Unterscheidung von *P. nigra*, *P. deltoides* sowie *P. x euramericana* zumindest in der F1-Generation. Bei Rückkreuzungen der F1-Hybride mit *P. nigra* wird in der F2-Generation bereits die Bestimmung ungewiss (6,25 % der Individuen tragen nur die Gene von *P. nigra*) und ab der F3-Generation unmöglich.

Die DNS-Analyse ist ein Laborverfahren zur Identifizierung und Erfassung von Unterschieden in der

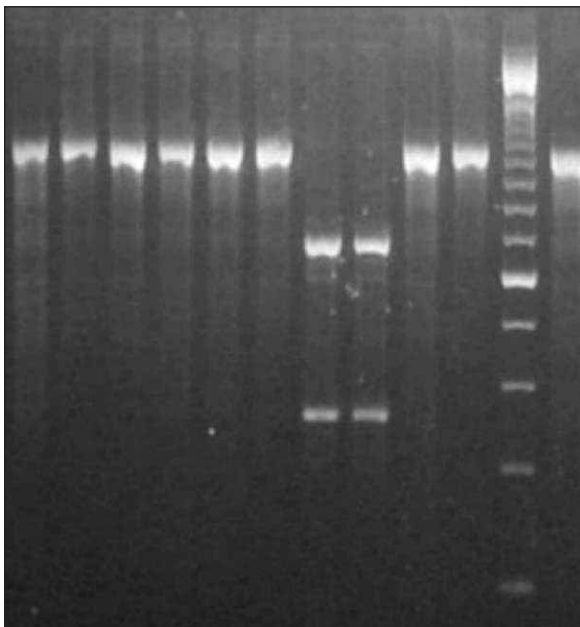


Abb. 2: Am DNS-Abschnitt *trnF-trnL* analysiert mit *Rsa-I* zeigen die Schwarzpappeln (Linien 1-6, 9, 10 und 12) aus dem Agarosegel nur ein Band, während die Hybridpappeln (Linien 7, 8) zwei Bänder zeigen. Linie 11 = DNA-Leiter-Standard



Abb. 3: Alte Schwarzpappel mit bereits abgebrochener Krone (Foto: U. Conrad)

Basensequenz der DNS. DNS findet sich bei den Pflanzen im Zellkern (nukleare DNS) und in den Organellen - den Chloroplasten (cpDNS) und Mitochondrien (mt-DNS). Die Organellen-DNS bleibt oft über viele Generationen unverändert (phylogenetisch konserviert) und wird nur über einen Elternteil vererbt. Bei der Pappel geschieht dies mütterlicherseits, d. h. über den Sameneltern (MEJNARTOWICZ 1991). Nach heutigem Kenntnisstand sind Kreuzungen zwischen *P. nigra* und *P. deltoides* nur mit *P. deltoides* als Mutter erfolgreich und nicht umgekehrt. Die beiden Schwarzpappeln unterscheiden sich an bestimmten Abschnitten des Chloroplastengenoms; diese Unterschiede können über Sonden (primer) sichtbar gemacht werden und damit kann zwischen *P. nigra* einerseits und *P. deltoides* zusammen mit *P. x euramericana* andererseits unterschieden werden (VORNAM und FRANKE 1997).

Ein Bereich, der für eine solche Unterscheidung herangezogen werden kann, ist die *trnF-trnL*-Region der Chloroplasten-DNS. Dazu wird dieser Bereich mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und mit dem Restriktionsenzym *Rsa I* geschnitten. Die Fragmente werden auf einem zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt. *P. nigra*

zeigt keine Schnittstelle, d.h. auch nach dem Verdau ist auf dem Agarosegel nur eine Linie zu sehen. *P. deltoides* und *P. x euramericana* dagegen besitzen eine Schnittstelle, wobei zwei Fragmente mit einer Größe von 700 und 300 Bp (Basenpaaren) entstehen. D.h. in diesem Fall haben wir zwei Banden auf dem Agarosegel (Abb. 2).

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung bietet die Chloroplastenregion „ycf9-P + rps14-Doyle“. Nach Vervielfältigung durch PCR und Verdau mit Rsa I entstehen diesmal sowohl bei *P. nigra* als auch bei *P. x euroamericana* jeweils zwei Banden. Die Länge der DNS-Abschnitte und damit die Position der Banden auf dem Gel ist aber unterschiedlich, weil sich die Schnittstellen unterscheiden. Die Differenz tritt nicht so deutlich hervor wie bei der Region trnF-trnL. Ähnliches gilt für den Abschnitt trnS-trnM, wobei diesmal mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Bam HI geschnitten werden muß (HEINZE 1998).

Allerdings stellt sich auch hier für die F2-Generation das ungeklärte Problem, ob sich *P. nigra* erfolgreich von *P. x euroamericana* bestäuben lässt. Diese Nachkommen hätten dann die cpDNS von *P. nigra* und würden als reine Schwarzpappeln eingestuft.

Erste Beispiele zur Identifizierung von Schwarzpappeln aus Bayern

Für die Erhaltung des genetischen Potentials der autochthonen Schwarzpappel ist die Erfassung und Kartierung autochthoner Restvorkommen, die Begutachtung der Vitalität und des natürlichen Verjüngungspotenzials sowie eine sichere Bestimmung der Artzugehörigkeit der erste Schritt. In einigen Bundesländern gibt es bereits für die Schwarzpappel umfassende Erhebungen zu diesen Aspekten (z. B. JANSSEN und WALTER 1997; SCHULZE und VORNAM 1997; WEISGERBER und JANSSEN 1998; JOACHIM 2000). In Baden-Württemberg z. B. wurden bisher über 1.150 Schwarzpappeln erfasst, identifiziert und kartiert (FRANKE et al. 1997).

In Bayern gibt es noch keine systematische Erfassung und Artbestimmung für *P. nigra*. Vor kurzem wurde eine erste Arbeit zu diesem Thema für die Schwarzpappeln der Isarauen im Bereich des Bayerischen Forstamtes Freising abgeschlossen (PELZER 2004). Insgesamt wurden 105 Schwarzpappeln kartiert (Abb. 3). Über die Analyse der cpDNS wurde festgestellt, dass es sich in allen Fällen um reine



Abb. 4: Fundorte von *Populus nigra* in den Isarauen

P. nigra handelt, obwohl die äußeren Merkmale nicht immer eindeutig waren. Allerdings war der Gesundheitszustand der meisten Bäume sehr schlecht, so dass nur für vier Bäume die Empfehlung „Erhaltungszuchtbaum“ ausgesprochen wurde.

Auf Anfrage der Naturschutzbehörden oder privater Interessenten wurden am ASP im Dienstleistungsverfahren in den letzten zwei Jahren für 17 Schwarzpappeln vom Ammersee, sechs weiteren Pappeln aus der Isarau bei Freising, 26 Schwarzpappeln aus Kitzingen und 12 Schwarzpappeln aus Neuburg an der Donau Artbestimmungen durchgeführt. Ob und wie diese Bäume gekennzeichnet und kartiert wurden, ist dem ASP nicht bekannt. Mittels Isoenzym- und/oder DNS-Analysen wurden 80 % dieser Bäume als *P. nigra* identifiziert.

Angesichts der Gefährdung dieser Baumart und der nationalen und internationalen Bemühungen zu ihrem Schutz ist auch in Bayern eine detaillierte Inventur der Schwarzpappel dringend notwendig.

Literatur

FRANKE, A. (2000): Schwarzpappeln (*Populus nigra* L.) in Baden-Württemberg. Überprüfung der Artreinheit von Reliktvorkommen mit Hilfe biochemisch-genetischer Methoden. Mitteilungen des Vereins für Forstliche Standortskunde und Forstpflanzenzüchtung 40, S. 77-78

FRANKE, A.; JAESCHKE, H.-G.; SEYD, C. (1997): Erfassung letzter Schwarzpappel-Vorkommen (*Populus nigra* L.) im baden-württembergischen Teil der Oberrheinischen Tiefebene. Die Holzzucht 51, S. 5-15

GEBHARDT, K. (2004): Ex-situ-Erhaltung genetischer Diversität der Schwarzpappel (*Populus nigra* L.). In: KONNERT, M.; FREYER, K. (Hrsg.): Ergebnisse forstgenetischer Feldversuche und Laborstudien und ihre Umsetzung in die Praxis. Tagungsbericht Forum Genetik-Wald-Forstwirtschaft, 20.-22. September 2004, Teisendorf, S. 245-254

HEINZE, B. (1998): Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridklonen. FBVA Berichte 105, 44 S.

HUSSENDÖRFER, E. (1998): Isoenzymanalysen an Pappelklonen zur Bestimmung ihrer Artzugehörigkeit. Interner Forschungsbericht der FVA Freiburg, unveröffentlicht

JANSSEN, A. (1997): Unterscheidung der beiden Schwarzpappelarten *Populus nigra* L. und *P. deltoides* Marsh. sowie ihrer Arthybride *P. x euramericana* (Dode) Guinier mit Hilfe von Isoenzymmustern. Die Holzzucht 51, S. 17-23

JANSSEN, A.; WALTER, P. (1997): Die Schwarzpappel in Hessen. AFZ/DerWald 18, S. 968-969

JOACHIM, H.-F. (Hrsg.) (2000): Die Schwarzpappel (*Populus nigra* L.) in Brandenburg. Eberswalder Forstliche Schriftenreihe, Bd. XI

MEJNARTOWICZ, M. (1991): Inheritance of chloroplast DNA in *Populus*. Theor. Appl. Genet. 82, S. 447-480

PELZER, K. (2004): Die Erfassung und Kartierung der Schwarzpappel in den Isarauen im Bereich des Bayerischen Forstamtes Freising. Diplomarbeit Fachhochschule Weihenstephan, 83 S.

SCHULZE, L.; VORNAM, B. (1997): Generhaltungsarbeit für die reinrassige Schwarzpappel. AFZ/DerWald 18, S. 966-967

VORNAM, B.; FRANKE, A. (1997): DNA-Analysen von Pappelproben zur Bestimmung ihrer Artzugehörigkeit. Holzzucht 51, S. 15-17

WEISGERBER, H.; JANSSEN, A. (Hrsg.): Die Schwarzpappel - Probleme und Möglichkeiten bei der Erhaltung einer gefährdeten heimischen Baumart. Forschungsberichte Hessische Landesanstalt für Forsteinrichtung, Waldforschung und Waldökologie Bd. 24, 183 S.

Key words

P. nigra, genetic investigations, species discrimination

Summary

The distinction between *Populus nigra*, *P. deltoides* and their hybrids *P. x euramericana* based only on morphological traits is difficult and unprecise. Therefore biochemical-genetic methods (isozyme analysis) and molecular genetic methods of cpDNA are increasingly used for discrimination. These methods are shortly reviewed. Especially the trnF-trnL-region from the chloroplast genome is suitable for species distinction in *P. nigra*. First examples for inventories of *P. nigra* in Bavaria are given.