

# 5 Genetische Untersuchungen an Schwarzpappeln aus Bayern

Eva Cremer und Monika Konnert

Im Rahmen der bayerischen Schwarzpappelkartierung wurden auch genetische Analysen mittels verschiedener DNS-Marker durchgeführt. Ziel war:

- die sichere Abgrenzung von Schwarz- und Hybridpappeln
- die Bestimmung der genetischen Diversität und die Überprüfung klonaler Strukturen innerhalb ausgesuchter Schwarzpappelbestände sowie
- die Bestimmung der genetischen Differenzierung zwischen verschiedenen Schwarzpappelvorkommen (z. B. an unterschiedlichen Flusssystemen).

## 5.1 Artunterscheidung bei der Pappel

Für die Erhaltung des genetischen Potentials der autochthonen Schwarzpappel ist eine sichere Bestimmung der Artzugehörigkeit der erste Schritt. Dabei hat sich die morphologische Artansprache nicht immer als eindeutig bzw. einfach erwiesen. Über eine DNS-Analyse ist dagegen eine Abgrenzung von Schwarz- (*Populus nigra*) und Hybridpappel (*Populus canadensis*, gekreuzt aus *P. nigra* und *P. deltoides*) eindeutig möglich. Die DNS-Analyse ist ein Laborverfahren zur Identifizierung von Unterschieden in der Basensequenz der Erbsubstanz (DNS). DNS findet sich bei den Pflanzen im Zellkern (nukleare DNS) und in den Organellen, den Chloroplasten (cpDNS). Die Organellen-DNS bleibt oft über viele Generationen unverändert und wird nur über einen Elternteil vererbt, bei der Pappel über die Mutter. Die beiden Pappelarten unterscheiden sich an bestimmten Abschnitten des Chloroplasten-Genoms. Eine genetische Analyse des Chloroplastengenoms kann die Unterschiede zwischen *P. nigra* einerseits und *P. deltoides* zusammen mit *P. canadensis* andererseits verdeutlichen (Vornam und Franke 1997). Dabei weisen Chloroplasten-Marker den weiblichen Beitrag von *P. deltoides* nach (Heinze 1998 b; Holderegger et al. 2005).



Abbildung 69: Artunterscheidung mittels Chloroplasten-DNS-Marker; Schwarzpappeln zeigen jeweils eine Bande (Proben 1, 2, 3, 5, 6); Hybridpappeln dagegen zwei Banden (Proben 4, 7, 8, 9).

Ein DNS-Bereich, der für die Artunterscheidung herangezogen werden kann, ist die *trnF-trnL*-Region der Chloroplasten-DNS. Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird dieser Bereich vervielfältigt und mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Die DNS-Fragmente werden anschließend in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei zeigen Proben von *P. nigra* ein DNS-Fragment bzw. eine Bande (d. h. keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym); Proben von *P. deltoides* sowie *P. canadensis* zeigen dagegen zwei DNS-Fragmente bzw. Banden und besitzen damit eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym (Abbildung 69).

Im Rahmen der Kartierung der bayerischen Schwarzpappelvorkommen wurden insgesamt 2.281 Pappelproben auf die Artzugehörigkeit mit Chloroplasten-DNS-Markern analysiert. Davon wurden 317 (14 Prozent) eindeutig als Hybridpappeln (*P. canadensis*) und 1.964 als Schwarzpappeln (*P. nigra*) identifiziert. Generell hat sich gezeigt, dass die Fehlerquote bei der morphologischen Ansprache, zumindest bei Altbäumen, mit einem geübten Auge relativ gering ist. Beispielsweise wurde von den jeweils 100 Proben der beiden zusätzlich untersuchten Schwarzpappelvorkommen jeweils nur eine Hybridpappel mittels genetischer Marker gefunden.

## 5.2 Genetische Analysen in ausgewählten Schwarzpappelvorkommen

Neben der genetischen Analyse zur Artbestimmung der Pappeln für die Schwarzpappelkartierung in Bayern wurden zwei Schwarzpappelbestände bei Kraiburg am Inn (101 Pappeln (siehe Abbildung 70) und bei Bad Birnbach an der Rott (97 Pappeln) in einer Vollaufnahme sowie zwei Regionen mit Schwarzpappeln am Main (48 Proben) und am Inn (35 Proben) mittels nuklearer DNS-Marker genauer analysiert. Dabei wurde für jede Pappelprobe ein genetischer Fingerabdruck anhand von sieben hoch variablen Kern-Mikrosatelliten-Markern erstellt: WPMS05 und WPMS09 – beschrieben in van der Schoot et al. (2000); WPMS14, WPMS18, WPMS20 – beschrieben in Smulders et al. (2001) sowie die Marker PMGC14 und PMGC2163 – ausgewählt aus dem International Populus Genome Consortium (IPGC) ([http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr\\_resouce.htm](http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resouce.htm)). Alle sieben Marker sind nicht gekoppelt, d.h. sie liegen nicht nahe aneinander auf einem Chromosom und variieren deshalb unabhängig voneinander.

Ausgehend von den für die Einzelbäume bestimmten Multilocus-Genotypen wurden folgende Parameter berechnet, die die genetische Variation jeweils innerhalb der Pappelvorkommen beschreiben:

- *Genetische Vielfalt* als durchschnittliche Anzahl an Allelen pro Mikrosatellitenort ( $A$ )
- *Genetische Diversität* als mittlere effektive Anzahl von Allelen je Mikrosatellitenort ( $n_e$ )
- *Heterozygotiegrad* als beobachteter prozentualer Anteil heterozygoter (mischerbiger) Individuen ( $H_o$ ) und unter Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarteter prozentualer Anteil heterozygoter Individuen ( $H_e$ )
- *Fixierungskoeffizient*  $F$  als Verhältnis zwischen  $H_o$  und  $H_e$ ; der  $F$ -Wert kann auf Inzuchteffekte hinweisen.

Außerdem können vier der sieben Mikrosatellitenorte (WPMS09, WPMS18, PMGC14, PMGC2163) als „diagnostische Marker“ eingesetzt werden, die artspezifische Allele (genetische Typen) zeigen. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen Schwarz- und Hybridpappel auch anhand der verwendeten Kern-Mikrosatelliten-Marker und damit die Abschätzung von Genfluss zwischen den Arten (Introgression) (Fossati et al. 2003; Khasa et al. 2005). Von den insgesamt 278 mit DNS-Mikrosatelliten untersuchten Pappeln zeigten sich auf Grund artspezifischer Allele 276 als reine Schwarzpappeln und nur zwei als Hybridpappeln.



Abbildung 70: Verteilung der Bäume auf der Fläche Kraiburg (Schwarzpappelvorkommen am Inn bei Ebing zwischen Kraiburg und Mühldorf; der Bestand umfasst 164 Schwarzpappeln und Naturverjüngung.) (Luftbild: Bayerische Vermessungsverwaltung)

**5.2.1 Genetische Strukturen und Diversität in den vier Vorkommen**

Die Analyse mittels der sieben Kern-Mikrosatelliten-Marker zeigte ein hohes Differenzierungspotential zwischen den Pappelindividuen. Beispielsweise wurden bei den 97 Schwarzpappeln im Vorkommen Bad Birnbach an der Rott 94 verschiedene Multilocus-Genotypen nachgewiesen. Die 101 Pappeln des Vorkommens Kraiburg am Inn enthielten 85 verschiedene Multilocus-Genotypen.

Alle vier analysierten Schwarzpappelvorkommen betrachtet, reichte die Anzahl der Allele von sieben Allelen an dem Mikrosatellitenort WPMS20 bis zu 23 verschiedenen Allelen an dem Mikrosatellitenort PMGC2163. Der mittlere Wert über alle Genorte lag zwischen 9,3 Allelen in dem Mainvorkommen und elf Allelen in der Fläche Kraiburg (Tabelle 1). Bei den eingesetzten Mikrosatelliten-Markern handelt es sich um hochvariable DNS-Marker, die ein hohes Differenzierungspotential zwischen Individuen zulassen.

Insgesamt unterscheiden sich die Werte der genetischen Vielfalt und Diversität in den vier Vorkommen nur geringfügig (Tabelle 6 und Abbildung 71). Nur im Vorkommen Bad Birnbach ist die Diversität mit  $n_e = 4,3$  und die Heterozygotie ( $H_e = 0,66$ ) etwas geringer als in den drei anderen Vorkommen. Im Vergleich zu anderen Pappelvorkommen aus Deutschland, die mit denselben Markern analysiert wurden, liegen diese Werte in einem vergleichbaren Rahmen (Rathmacher et al. 2009:  $H_e = 0,58$  bis  $0,80$ ).

Die Werte des Fixierungskoeffizienten  $F$  lassen Schlussfolgerungen auf mögliche Inzuchteffekte innerhalb von Populationen zu. Die Interpretation dieser Werte ist nur für die beiden Populationen Kraiburg am Inn bzw. Bad Birnbach an der Rott sinnvoll, da es sich nur hier um wirkliche Populationen handelt. Bei den anderen beiden Vorkommen stehen die einzelnen Bäume nicht alle in Paarungskontakt. Der mittlere  $F$ -Wert liegt für das Vorkommen Kraiburg am Inn um Null (Tabelle 6). Die Abweichungen des beobachteten Heterozygotieanteils von dem unter Gleichgewichtsbedingun-

gen erwarteten Fixierungsindex ( $F = 0$ ) sind minimal. Demzufolge können Inzuchteffekte für das Vorkommen Kraiburg ausgeschlossen werden. Für das Vorkommen Bad Birnbach an der Rott liegt der mittlere  $F$ -Wert etwas höher und lässt damit auf einen Homozygotenüberschuss schließen. Bei Betrachtung der Einzellocus-Werte fällt allerdings der Mikrosatellitenort WPMS18 ins Auge mit  $F = 0,8$ . Der Homozygotenüberschuss ist nur auf *einen* Locus zurückzuführen; die sechs anderen Loci zeigen ebenfalls Werte um Null. Deshalb können auch für dieses Vorkommen Inzuchteffekte ausgeschlossen und ein intaktes Paarungssystem angenommen werden.

**5.2.2 Räumlich-genetische (klonale) Strukturen innerhalb der Vorkommen**

Die verwendeten genetischen DNS-Marker sind so variabel, dass identische genetische Fingerabdrücke auf Verwandtschaft bzw. auf klonale Strukturen hinweisen. Teilweise zeigen nur wenige Meter voneinander entfernt stehende Pappeln innerhalb einer Population vollkommen identische Fingerabdrücke (denselben Genotyp über alle sieben Mikrosatellitenorte). Daher kann man von Klonen sprechen, die aus vegetativer Vermehrung entstanden sind (z.B. Stockausschlag,

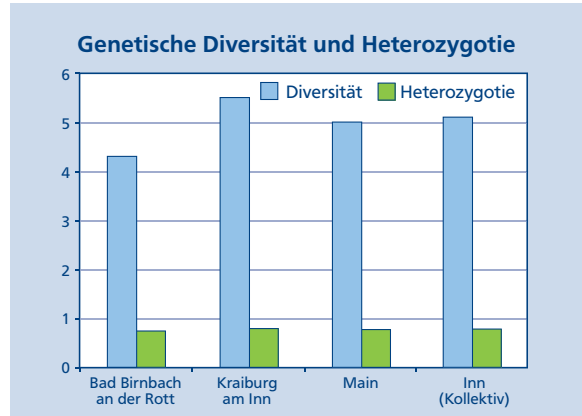


Abbildung 71: Genetische Diversität ( $n_e$ ) und beobachtete Heterozygotie ( $H_e$ ) in den vier bayerischen Schwarzpappelvorkommen an Inn, Main und Rott

Tabelle 6: Genetische Populationsparameter für die vier analysierten Schwarzpappelvorkommen; A: durchschnittliche Anzahl an Allelen pro Locus;  $n_e$ : effektive Anzahl an Allelen (genetische Diversität),  $H_b$ : beobachtete Heterozygotie;  $H_e$ : erwartete Heterozygotie;  $F$ : Fixierungsindex (Inzuchtkoeffizient)

	A	$n_e$	$H_b$ [%]	$H_e$ [%]	F
<b>Inn (Kraiburg)</b>	11,0	5,5	0,80	0,80	-0,001
<b>Rott (Bad Birnbach)</b>	10,1	4,3	0,66	0,74	0,115
<b>Main</b>	9,3	5,0	0,71	0,77	Nicht berechnet
<b>Inn (verteilt)*</b>	10,1	5,1	0,74	0,78	Nicht berechnet

\* keine richtige Population

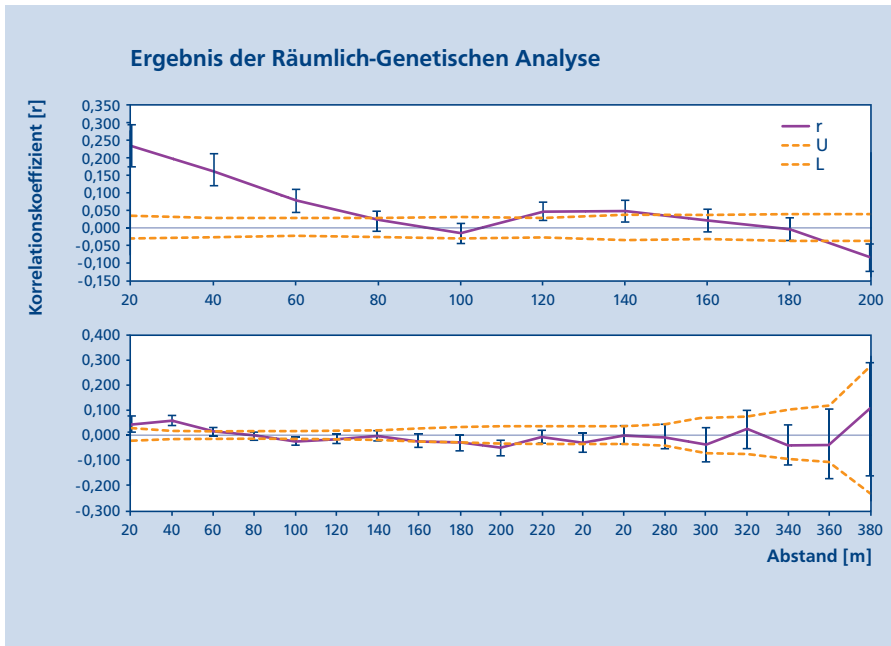


Abbildung 72 a: Ergebnis der räumlich-genetischen Analysen für das Schwarzpappelvorkommen Kraiburg am Inn; r = Korrelationskoeffizient; U und L: obere und untere Grenze des Vertrauensintervalls

Abbildung 72 b: Ergebnis der räumlich-genetischen Analysen für das Schwarzpappelvorkommen Rott; r = Korrelationskoeffizient; U und L: obere und untere Grenze des Vertrauensintervalls

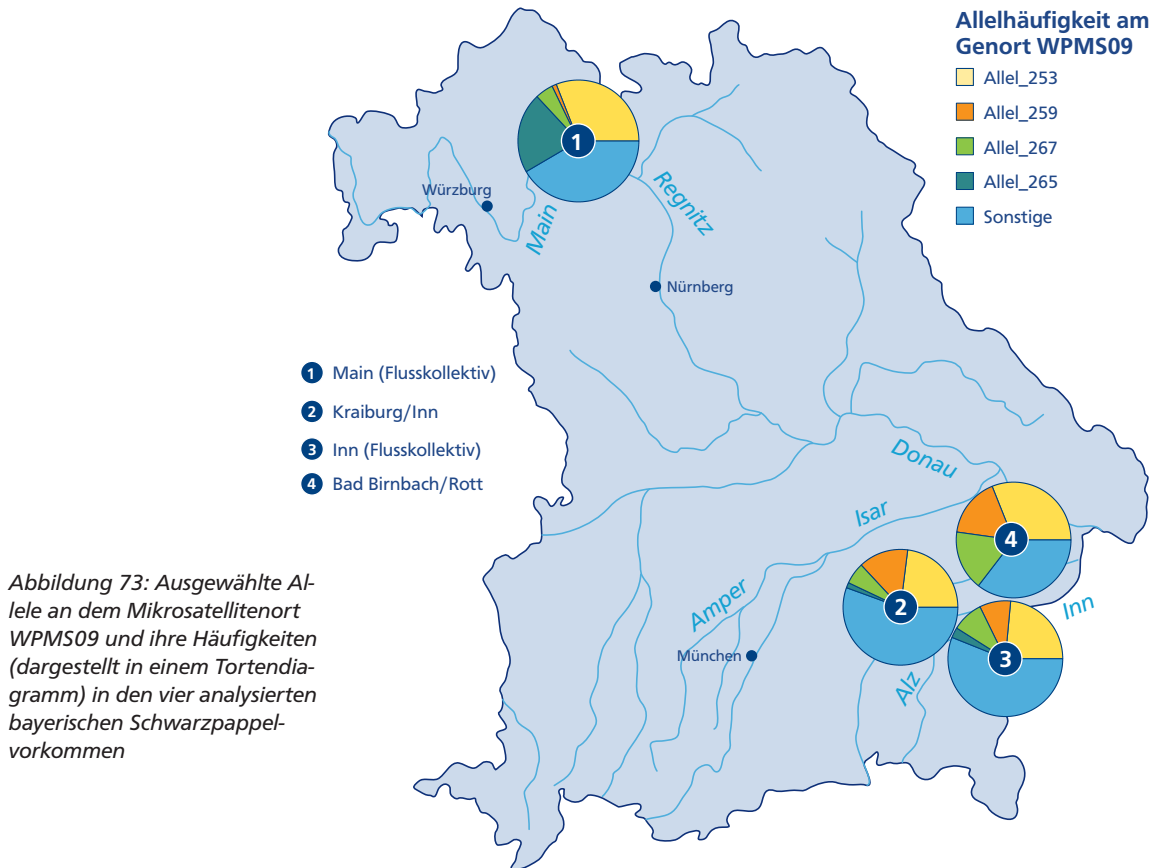
Wurzelbrut, Bewurzelung von Astabsprüngen). Auf Grund der genetischen Ergebnisse wurden verschiedene Klongruppen innerhalb der beiden Schwarzpappelpopulationen Kraiburg und Bad Birnbach herausgefunden mit unterschiedlicher Anzahl von Ramets, die bis zu zehn Individuen erreichten. In der Population Kraiburg zeigten beispielsweise dreimal zwei Individuen (Nr. 5 und 15, 35 und 36, 29 und 37), einmal drei Individuen (Nr. 45, 48, 49) und einmal zehn Individuen (Nr. 60–68, 70) exakt denselben genetischen Fingerabdruck. Sie standen in unmittelbarer Nachbarschaft. Entsprechend zeigt sich auch anhand der Analyse der räumlich-genetischen Strukturen ein deutlicher Zusammenhang zwischen genetischer und räumlicher Nähe.

Abbildung 72 a lässt eine signifikante Korrelation zwischen dem räumlichen und dem genetischen Abstand im Schwarzpappelbestand Kraiburg am Inn bis zu einer Distanzklasse von 60 Metern erkennen. Der Korrelationskoeffizient (violette Linie) bricht nach oben hin aus dem Vertrauensintervall (orange Linien) aus. Dies bedeutet, räumlich dichter beieinander stehende Pappeln sind sich genetisch ähnlicher. Dies ist statistisch signifikant bis zu einer Entfernung von 60 Metern. Dieses Ergebnis spiegelt noch einmal das Vorhandensein der klonalen Strukturen wider, bei denen räumliche Nähe und genetische Ähnlichkeit eng zusammenhängen. Auch in dem Bestand Bad Birnbach ist ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Pappeln in den ersten 60 Metern nachzuweisen – auch

	Inn (Kraiburg)	Rott (Bad Birnbach)	Main
Rott (Bad Birnbach)	0,28		
Main	0,27	0,22	
Inn (verteilt)	0,09	0,28	0,23

Tabelle 7: Genetischer Abstand nach Nei zwischen den vier bayerischen Schwarzpappelvorkommen an Inn, Main und Rott

wenn der Effekt hier nicht so stark ausgeprägt ist wie in der Population Kraiburg (Abbildung 72 b). Auch in anderen Studien mit genetischen Markern wurden klonale Strukturen innerhalb von Schwarzpappelbeständen nachgewiesen (Rathmacher et al. 2009; Kätzel et al. 2007). Das spricht eindeutig für die Bedeutung vegetativer Vermehrung bei dieser Baumart.



**5.2.3 Genetische Differenzierung zwischen den Schwarzpappel-Vorkommen**

Die genetischen Analysen sollten auch die Frage beantworten, ob bzw. wie stark sich Schwarzpappelvorkommen an den unterschiedlichen Flusssystemen innerhalb von Bayern genetisch unterscheiden. Zur Quantifizierung der genetischen Unterschiede zwischen den Vorkommen wurde zuerst der paarweise *genetische Abstand* nach Nei berechnet. Die in Tabelle 7 eingetragenen Werte liegen zwischen 0,09 und 0,28. Es ist klar zu erkennen, dass der Abstandswert zwischen den Populationen innerhalb desselben Flusssystems (zwischen den am Inn gelegenen Vorkommen) deutlich geringer ist als zwischen Vorkommen an unterschiedlichen Flusssystemen. Abstandswerte über 0,20 sind als hoch einzustufen und weisen auf klare genetische Unterschiede zwischen den Vorkommen hin. Hervorzuheben ist, dass dabei die geographische Entfernung keine Rolle spielt. Der Abstand zwischen den Vorkommen Bad Birnbach und Kraiburg, die etwa 70 Kilometer (Luftlinie) entfernt sind, ist nicht geringer als der Abstand zwischen den circa 350 Kilometer (Luftlinie) voneinander entfernten Vorkommen am Main und am Inn.

**Prozentanteile der molekularen Varianz**

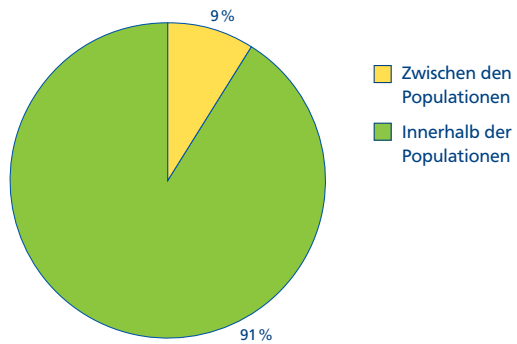


Abbildung 74: Ergebnis der Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) basierend auf den Daten der sieben Mikrosatelliten-Marker; sie beschreibt den Anteil der gesamten genetischen Variation innerhalb und zwischen den Populationen bzw. Vorkommen.



Interessant ist, dass in den vier Schwarzpappelvorkommen an unterschiedlichen Flusssystemen „private Allele“ gefunden wurden. Das sind Genvarianten, die in bestimmten Populationen auftreten und in anderen fehlen oder äußerst selten sind. Als Beispiel sind in Abbildung 73 die Häufigkeiten der Allele am Genort WPMS09 dargestellt. Das Allel WPMS\_265 z. B. erreicht am Main Häufigkeiten von über 20 Prozent und fehlt in den Vorkommen in Südbayern. Das Allel WPMS\_259 erreicht hingegen in Südbayern Häufigkeiten von über zehn Prozent und fehlt am Main.

Das Vorhandensein „privater“, regionalspezifischer Allele in Kombination mit unterschiedlichen Häufigkeiten der vorhandenen Allele in den einzelnen Vorkommen ist der Grund für die vergleichsweise großen genetischen Abstände, die wir zwischen den drei Flusssystemen Main, Inn und Rott finden.

Über statistische Verfahren der „Molekularen Varianzanalyse“ (AMOVA) kann die genetische Variation eingeteilt werden in den Anteil der Differenzierung zwischen den Individuen innerhalb einer Population und den Anteil der Differenzierung, die auf Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen zurückgeht. Die Grafik in Abbildung 74 zeigt, dass die genetische Variation zwischen den Schwarzpappelvorkommen bei neun Prozent liegt und innerhalb der Vorkommen bei 91 Prozent. Eine genetische Differenzierung von neun Prozent ist dabei über eine maximale räumliche Entfernung von circa 350 Kilometern als vergleichsweise hoch einzustufen.

### 5.3 Schlussbetrachtung

Molekulargenetische Methoden ermöglichen die eindeutige Abgrenzung der Schwarzpappel gegenüber der Hybridpappel. Obwohl die Fehlerquote bei der okularen Arteinschätzung vergleichsweise gering ist, bieten nur genetische Analysen die letzte Sicherheit. Bei den bayerischen Vorkommen bestätigten sie den sehr hohen Anteil an Schwarzpappeln.

Sowohl zwischen den Individuen eines Vorkommens als auch zwischen den Vorkommen bestehen große genetische Unterschiede. Innerhalb der Vorkommen gab es aber auch Hinweise auf klonale Strukturen und damit auf vegetative Vermehrungsvorgänge. Die genetischen Unterschiede innerhalb eines Flusssystems sind aber deutlich geringer als die zwischen unterschiedlichen Flusssystemen. Ein Zusammenhang zwischen geographischer Entfernung und genetischem Abstand wurde nicht gefunden.

Die vorliegenden Ergebnisse können bei der Planung von Erhaltungsmaßnahmen verwendet werden. Man sollte nur Stecklinge von Bäumen gewinnen, die mehr als 60 Meter voneinander entfernt sind, um zu vermeiden, dass es sich um Klone handelt. Außerdem sollten von mehreren Flusssystemen Stecklinge gewonnen werden, um eine möglichst große genetische Vielfalt zu erhalten. Gleichzeitig sollten die Abkömmlinge von den einzelnen Flusssystemen getrennt gehalten werden, um, falls gewünscht, auf für die Region spezifisches Material zurückgreifen zu können.



Abbildung 75: Im Vordergrund Schwarzpappel, dahinter Pappelhybride (nur männliche Bäume) (Foto: G. Huber)