

forstarchiv 83, 19-25
(2012)

DOI 10.4432/0300-
4112-83-19

© DLV GmbH

ISSN 0300-4112

Korrespondenzadresse:
joerg.kleinschmit@
nw-fva.de

Eingegangen:
17.08.2011

Angenommen:
09.11.2011

Gefährdung von Wildapfelsamenplantagen durch Genfluss

Risk of gene flow in wild apple seed orchards

JÖRG R.G. KLEINSCHMIT¹, BERNHARD HOSIUS² und LUDGER LEINEMANN³

¹ Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung Waldgenressourcen, Professor-Oelkers-Str. 6, 34346 Hann. Münden, Deutschland

² ISOGEN, Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland

³ Büsgen-Institut, Abteilung Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Georg-August-Universität, Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland

Kurzfassung

Malus sylvestris ist eine gefährdete Art, für die Erhaltungsmaßnahmen notwendig sind. Die wichtigste Voraussetzung, um Maßnahmen zur Erhaltung des genetischen Potenzials zu ermöglichen, ist die Unterscheidung von *M. sylvestris* und den zahlreichen Kulturformen von *M. domestica*. Dieses Problem ist von besonderer Relevanz bei der Anlage von Erhaltungs-Samenplantagen. Da morphologische Merkmale aufgrund ihrer Genotyp-Umwelt-Interaktion oft unsicher sind, wurde ein Satz von sechs kernkodierten SSR-Genmarkern verwendet, um die Auflösung zwischen *M. sylvestris* und verschiedenen Kulturformen (*M. domestica*) zu analysieren. Die Ergebnisse belegen eine hohe genetische Differenzierung zwischen den beiden Gruppen mit einem genetischen Abstand nach Nei (1972) von 83,5 %. Die Zuordnung einzelner Individuen mit der Software *Structure* 2.2 resultiert in hohen „Zugehörigkeits-Koeffizienten“. Die Reihenuntersuchungen mithilfe dieser Marker an 963 Genotypen deuten darauf hin, dass 15 % der Genotypen auf Wildapfelsamenplantagen als kulturnah einzustufen sind und damit eine unerwünschte Pollenquelle darstellen. Die Schätzung des Genflusses in eine Wildapfelsamenplantage zeigt einen Mindest-Polleneintrag von 56 %. Daher wird die Plantage in Zukunft während der Blüte isoliert werden.

Schlüsselwörter: *Malus sylvestris*, *Malus domestica*, Artunterscheidung, Mikrosatellitenmarker, Genressource, Erhaltung

Abstract

Malus sylvestris is an endangered species and conservation measures are necessary. The main precondition to make conservation of *M. sylvestris* feasible is the differentiation between the wild types of *M. sylvestris* and the numerous cultivated forms of *M. domestica*. This problem is of particular relevance for the establishment of conservation seed orchards. Since morphological traits are often unsecure, due to genotype environment interaction, a set of six nuclear SSR-markers was applied to analyse the resolution between *M. sylvestris* and different cultivated apple trees. The results support a strong genetic differentiation between the two groups with a genetic distance of 83.5%. The assignment of single individuals with the software *Structure* resulted in high "membership coefficients". Genotyping 963 *in situ* selected putative *M. sylvestris* resulted in an estimate of 15% misclassified genotypes, which represent an undesirable pollen source. The gene flow estimates into a seed orchard give values of 56% minimum of pollen contamination. Thus future seed production will be done in a seed orchard where flowering takes place under containment.

Key words: *Malus sylvestris*, *Malus domestica*, species discrimination, microsatellites, genetic resource, conservation

Einleitung

Der Wildapfel (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) gehört zur Familie der *Rosaceae* und ist über fast ganz Europa und Südwestasien verbreitet (Erlbeck et al. 2002). Der Wildapfel ist die einzige heimische Art der Gattung *Malus* in Westeuropa. Er kommt meist in wärmeren und tieferen Lagen vor, typischerweise in eichendominierten Wäldern oder anderen lichten Laubmischwäldern auf gut nährstoffversorgten Standorten. Unter den heute praktizierten Verfahren der Waldbewirtschaftung ist der Wildapfel konkurrenzschwach, er kann heute zu den seltenen und gefährdeten Holzgewächsen gezählt werden (z. B. Garve 2004).

Aus genetischer Sicht verringert die Abnahme geeigneter Habitats und die damit einhergehende Fragmentierung der Vorkommen die

effektiven Populationsgrößen und fördert Drift- und Inzuchteffekte, die zu einer Reduktion der genetischen Variation und herabgesetzter Fitness führen können. Zudem besteht die Gefahr, dass durch Hybridisierung zwischen Wildformen und ihren domestizierten Verwandten die Fitness der Wildform reduziert wird (Lynch 1991, Rhymer und Simberloff 1996). Auch für den Wildapfel besteht die Gefahr, dass durch die Hybridisierung mit den sehr viel häufigeren Kultursorten (*Malus domestica* Borkh.) arttypische und anpassungsrelevante genetische Variation unwiederbringlich verloren geht (Larsen et al. 2008). Zusammengenommen gefährden diese Faktoren den Fortbestand dieser bereits seltenen Art. Aus diesem Grund wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Anstrengungen unternommen, den Wildapfel als Art zu erhalten. Dabei wurden in den verschiedenen Bundesländern Vorkommen des Wildapfels als Ausgangsmaterial für *Ex-situ*-Maßnahmen kartiert. Im Bereich der Nordwestdeutschen

Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA) wurden 18 Bestände (> 20 Individuen) mit insgesamt 1,85 ha und über 1.600 kleinere Objekte mit mehr als 2.000 Individuen erfasst. Entsprechendes Material wurde bereits in Erhaltungs-Samenplantagen ausgepflanzt (Bund-Länder-Arbeitsgruppe Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht 2006; <http://blag-fgr.genres.de/index.php?id=270>) und es werden weitere konzipiert. Die NW-FVA betreut insgesamt zehn Klonarchive und Samenplantagen, welche 528 Genotypen umfassen.

Ein grundlegendes Problem für Generhaltungsmaßnahmen ist die genaue Abgrenzung zwischen Wild- und Kulturformen des Apfels. Obwohl die Mehrzahl von Studien zur Hybridisierung zwischen Wild- und Kulturformen auf morphologischen Merkmalen basiert, kann ein Hybrid nicht notwendigerweise allein auf der Grundlage phänotypischer Merkmale identifiziert werden (Kleinschmit 2000). Identische Merkmale von Kulturformen und verwandten Wildformen können ebenso Ergebnis phänotypischer Plastizität, konvergenter Evolution oder einfach gemeinsamer Abstammung sein (Linder et al. 1998). So treten beim Apfel in der Natur häufig phänotypisch intermediäre Formen auf, und es besteht die Hypothese, dass infolge häufiger Hybridisierungsvorgänge die Wildform weitestgehend durch einen Hybridschwarm ersetzt wurde, der zu einem erheblichen Anteil genetische Informationen des Kulturapfels beinhaltet (Allendorf et al. 2001). Auch können Individuen eines Hybridschwarms, die den überwiegenden Anteil von einem der elterlichen Taxa erhalten haben, morphologisch oft nicht von eben diesem unterschieden werden.

Für die Unterscheidung von Wild- und Kulturformen haben blatt- und fruchtmorphologische Merkmale größere Bedeutung (Remmy und Gruber 1993). Insbesondere die Fruchtgröße von weniger als 3,5 cm Durchmesser und die meist fehlende oder sehr unbedeutende Behaarung der Blattunterseite werden zur Charakterisierung des Wildapfels herangezogen (Wagner 1996, 1998). Aber auch hier sind Übergangsformen nicht auszuschließen und im Zweifelsfall nicht zuzuordnen.

Im Vergleich zu morphologischen Merkmalen bieten genetische Marker wesentliche Vorteile für die Untersuchung entsprechender Sachverhalte, da diese umweltunabhängig sind und es wenig wahrscheinlich ist, dass sich aufgrund konvergenter Evolution Ähnlichkeiten an einzelnen Loci ausprägen. In der Vergangenheit wurden häufig Isoenzym-Polymorphismen genutzt, um eine Unterscheidung von Wild- und Kulturformen vorzunehmen (Wagner und Weeden 2000). Darüber hinaus eröffnen neue Verfahren der DNA-Analyse die Möglichkeit der Kombination einer nahezu unbegrenzten Anzahl genetischer Merkmale, um eine möglichst genaue Unterscheidung von Wild- und Kulturformen zu gewährleisten. Insbesondere genetische „Fingerabdruck“-Methoden wie die Untersuchung von SSR (*Simple Sequence Repeats*) und AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) kommen hier infrage (Coart et al. 2003). Mit diesen Methoden ist es insbesondere möglich, die Verbreitung von effektiven Pollen zwischen Wild- und Kulturformen zu untersuchen. Dies ist unter anderem sinnvoll, wenn untersucht werden soll, ob Generhaltungsplantagen des Wildapfels tatsächlich genetisch isoliert sind oder doch einem erheblichen Einfluss von Pollen des Kulturapfels unterliegen. Im letzteren Fall wäre das Saatgut einer Plantage nur beschränkt für Generhaltungszwecke verwendbar.

Andere genetische Marker, deren Ziel-DNA auf dem Chloroplasten-Genom liegt, beschäftigen sich mit phylogenetischen Fragestellungen. Entgegen der bisherigen Annahme, dass *M. sylvestris* auf die ostasiatische Art *M. sieversii* (Ledeb.) zurückzuführen ist, legen diese Untersuchungen eine deutlich engere Verwandtschaft zwischen *M. sylvestris* und *M. domestica* nahe. So konnte gezeigt werden, dass beide Arten acht häufige Haplotypen gemeinsam haben (Coart et al. 2006). Auch dies kann als Hinweis verstanden werden, dass Hybridisierung zwischen den Arten über Generationen eine deutlichere Trennung der maternalen Linien verhindert hat.

Aufbauend auf diesem aktuellen Stand der Forschung, werden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen behandelt:

- Eignen sich Kern-Mikrosatellitengenmarker zur Unterscheidung von Wild- und Kulturapfel?
- Wie groß ist der Anteil von morphologischen Wildformen, welche mit genetischen Markern als kulturnah eingestuft werden?
- Ist die Pollenwolke innerhalb einer Wildapfelsamenplantage homogen?
- Wie groß ist der Anteil von Fremdpolleneintrag in Wildapfelsamenplantagen?

Material und Methoden

Die Optimierung der DNA-Marker wurde an Eltern und Nachkommen (Samen) von neun Einzelbaumabsaaten (N = 91) der hessischen Plantage Obermeier vorgenommen. Diese Plantage repräsentiert 20 vermeintliche Wildapfelgenotypen. Als Vergleichskollektiv des Kulturapfels dienten 21 Kultur- bzw. Streuobstsorten (Tabelle 1).

Aufbauend auf der Methodenoptimierung, fand eine Reihenuntersuchung an 963 Individuen aus der Erfassung forstlicher Genressourcen in den Ländern Niedersachsen und Schleswig-Holstein statt. Diese Individuen waren wegen ihrer Morphologie als Wildäpfel klassifiziert worden, wobei die Phänotypenansprache in unterschiedlichen phänologischen Stadien stattgefunden hat. 333 Individuen davon sind bereits durch Pfropfungen auf Samenplantagen gesichert. Als Vergleichskollektiv des Kulturapfels dienten 32 Kultur- bzw. Streuobstsorten.

Eine detaillierte Genflussschätzung in eine Wildapfelsamenplantage wurde an sechs Halbgeschwisterfamilien (N = 300) der Modellsamenplantage im Versuchskamp der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt in Vaake, Hessen, vorgenommen. Diese Plantage repräsentiert 58 Wildapfelgenotypen.

Labormethodik

Die Isolation der DNA erfolgte nach Standardverfahren unter Zuhilfenahme des Extraktionskits DNeasy der Firma Qiagen (Hilden). Für die Amplifikation der Ziel-DNA wurden vorrangig Primer ausgewählt, die in Coart et al. (2003) verwendet wurden. Dabei handelt es sich um die Primer CH01H10, CH02B12, CH02C6, CH02D12, CH01E12, CH01F02, CH01H01 (Gianfranceschi et al. 1998), 02b1, 05g8, 23g4 (Guilford et al. 1997) und GD96 und GD162 (Hokanson et al. 1998).

Für die PCR wurden folgende Mengen eingesetzt: 1,5 µl H₂O, 7,5 µl HotstarMasterMix (Qiagen, Hilden), 2,0 µl primer F (5 pmol), 2,0 µl primer R (5 pmol), 2,0 µl DNA.

Die PCR-Protokolle aus der Literatur wurden mithilfe eines Gradienten überprüft und gegebenenfalls abgeändert. Im Hinblick auf die automatisierte Auswertung wurden für die PCR farbmarkierte (Hex, Fam) Primer eingesetzt. Im Folgenden werden die verwendeten PCR-Protokolle aufgeführt, die Annealing-Temperatur (TA) steht dabei jeweils in Klammern nach der Primerbezeichnung. Für die Primer CH01H10 (60 °C), CH02C06 (55 °C), CH01F02 (66 °C) und 05g8 (55 °C) wurde folgendes PCR-Programm genutzt: 94 °C 15 min, (94 °C 30 s, TA 1 min, 72 °C 1 min) x 35 Zyklen, 72 °C 10 min, 16 °C ∞.

Für die Primer GD96 (61 °C) und GD162 (57 °C): 95 °C 15 min, (94 °C 1 min, TA 1 min, 72 °C 2 min) x 35 Zyklen, 72 °C 10 min, 16 °C ∞. Für die anderen Primer wurde ein „Touchdown“-Programm verwendet, das vor der eigentlichen Amplifikation einige Zyklen mit relativ hohen Annealing-Temperaturen durchläuft, um eine möglichst spezifische Amplifikation zu erreichen: 94 °C 15 min, (94 °C 30 s, TA = 65 °C für den ersten Zyklus 1 min, 72 °C 1 min) x 4 Zy-

Tabelle 1. Bezeichnung der Proben. Die Wildäpfel sind auf der linken und die Kultur- bzw. Streuobstsorten auf der rechten Seite aufgeführt. Die Nummern entsprechen den Proben-Nummern in der vorliegenden Untersuchung.

Designation of the samples. Samples of the wild type (*Malus sylvestris*) are on the left hand and cultivated forms (*M. domestica*) on the right hand side. The samples are labelled by consecutive numbers.

Wildobstproben aus der Plantage		Kultur- und Streuobstsorten aus dem Handel	
1 A00143 Res11 12	14 A00126 Kn223 145	28 Elstar	41 Bisterfelder Renette
2 A00127 KNW224 227	15 Res11 239	29 Roter James Greve	42 Jamba
3 A00144 Res13 35	16 Res11 199	30 Gravensteiner	43 Kassler Renette
4 A00150 Res16 60	17A01201 Gg10 143	31 Roter Berlepsch	44 Danziger Kant
5 A00130 Nh130 179	18 A00141 Res10 237	32 Golden Delicious	45 Prinz Albrecht v. Preußen
6 A00139 Res7 250	19 A00143 Res11 216	33 Cox Orange	46 Gelber Richard
7A01198 Gg1 45	20 A00140 Res8 292	34 Roter Boskop	47 Jakob Fischer
8 A00143 Res11 94	21 A00101 Dil530 186	35 Gold Parmäne	48 Roter Eiser
9 A01199 Gg2 173	22 A00138 Res6 168	36 Ingrid Marie	
10 A00148 Res15 44	23 A00137 Res5 189	37 Prinzenapfel	
11 A00127 67	24 A01200 Gg5 175	38 Graue Renette	
12 A001199 120	25 A001344 Res13 11		
13 A00145 Res14 42	26 A00127 64		
	27A01199 120 U		

klen (die TA wird dabei pro Zyklus um 1 °C reduziert), (94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 Zyklen, 72 °C 10 min, 16 °C ∞.

Für die Untersuchung der Nachkommen wurde eine Multiplex-PCR mit dem Qiagen Multiplex PCR Kit durchgeführt. Die Analyse der Fragmentlängen erfolgte in einem ABI 3100.

Datenanalyse

Nach der Fragmentlängen-Analyse wurden alle Ergebnisse auf Konsistenz und Wiederholbarkeit überprüft. Weiterhin beurteilt wurden das Auftreten von Stotterbänden, von unspezifischen Amplifikationsprodukten sowie die Stärke der Signale und das Auftreten von Nullallelen. Nullallele führen zu einer Überschätzung des Anteils homozygoter Genotypen im Vergleich zu einer zufallsparenden Population. Der F-Wert (Wright 1965) misst eben diesen Überschuss homozygoter Genotypen. Ein hoher positiver F-Wert kann ein Hinweis auf Nullallele sein. Entsprechend wurden daher F-Werte für die Kollektive *M. sylvestris* – getrennt für Eltern und Nachkommen – sowie für *M. domestica* berechnet. Die Vererbungsanalyse wurde qualitativ durchgeführt. Es wurde überprüft, ob alle Nachkommen Genotypen aufweisen, die einer Abstammung vom betreffenden Elter nicht widersprechen. Da die Nachkommenschaften nur klein waren, wurde auf einen quantitativen Test verzichtet.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse erfolgte eine Auswahl von sechs Primerpaaren, die in der Summe ihrer Eigenschaften für Reihenuntersuchungen besonders gut geeignet sind.

Die Berechnung genetischer Strukturen und genetischer Variationsparameter erfolgte mit dem Programm GenAEx 6 (Peakall und Smouse 2006). Mit diesem Programm wurden auch Analysen der Zuordnung von Einzelindividuen zu einer der beiden Arten durchgeführt (*population assignment*). Die Analysen, die im Fall der Software GenAEx 6 unter Zuhilfenahme einer *A-priori*-Aufteilung der Kollektive nach morphologischen Kriterien erfolgten (Paetkau et al. 1995, Paetkau et al. 2004), wird ergänzt durch Analysen mit dem Programm *Structure* Version 2.2 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>, Pritchard et al. 2000), das für die Zuordnung keine *A-priori*-Information über die Zugehörigkeit von Individuen zu den

beteiligten Arten benötigt. Mit diesem Programm wurde für jedes Individuum ein sogenannter „membership-coefficient“ berechnet, der die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Zuordnung wie hier zu *M. sylvestris* und *M. domestica* angibt.

Die Pollenwolken wurden anhand des allelischen Beitrags der Polleneltern mit der Programmierumgebung „R“ (R Development Core Team 2007) berechnet. Die Homogenität der Pollenwolken wurde mithilfe des Chi²-Testes berechnet.

Der minimale Fremdpolleneintrag in die Samenplantage wurde nach dem Ausschlussprinzip mit einem Programm in „R“ (R Development Core Team 2007) ermittelt. Hierzu wurde geprüft, ob die auf der Plantage vertretenen Genotypen in der Lage waren, einen allelischen Multilocusbeitrag zu liefern, welcher zusammen mit dem allelischen Multilocusbeitrag des Sameneltern zum Genotyp des Samens führt. Die Pollenbeiträge, welche nicht von der Samenplantage stammen können, repräsentieren das Minimum der möglichen Pollenkontamination.

Ergebnisse

Primerauswahl im Hinblick auf die Anwendung in Reihenuntersuchungen

Die beschriebenen Methoden der Amplifikation der PCR und der Fragmentlängenanalyse führten insgesamt zu guten Ergebnissen. Die Fragmentlängen der Primer lagen in dem nach der Literatur (Guilford et al. 1997, Gianfranceschi et al. 1998, Hokanson et al. 1998) erwarteten Bereich. In der Multiplex-PCR, die für die Untersuchung der Nachkommen angewendet wurde, konnten eine Tendenz zu mehr Nebenfragmenten (Stotterbänden) sowie eine geringfügige Zunahme unspezifischer Amplifikationsprodukte beobachtet werden. Insgesamt waren die Ergebnisse konsistent zu den Ergebnissen auf der Basis individuell eingestellter PCR-Programme.

Der Vergleich von Sameneltern (♀) und Nachkommen erfolgte qualitativ, indem geprüft wurde, ob jeder Same mindestens ein DNS-Fragment vom betreffenden Sameneltern aufweist. Es zeigte

Tabelle 2. Die F-Werte (Wright 1965) an den sechs ausgewählten Genorten berechnet für die Stichproben von Wildapfel (Eltern und Nachkommen) und Kultur- bzw. Streuobstsorten.

F-values (Wright 1965) for the 6 analyzed gene loci calculated for the samples of *Malus sylvestris* (parents and progenies) and *M. domestica*.

Genort	<i>M. sylvestris</i>	<i>M. domestica</i>	<i>M. sylvestris</i> - Nachkommen
GD96	0,094	-0,057	-0,088
23g4	0,289	0,032	-0,041
ch02d12	-0,129	-0,052	0,097
GD162	-0,132	0,012	-0,099
ch01h01	0,093	-0,036	-0,056
ch01h10	0,009	-0,356	0,012

sich, dass die Nachkommen in der Regel Genotypen aufwiesen, die eine Abstammung vom entsprechenden Elter nicht widerlegen. Von insgesamt 96 untersuchten Nachkommen wurden lediglich vier nicht einem der entsprechenden Eltern zugeordnet. Dies war für einen Nachkommen an mehreren Genorten gleichzeitig der Fall, somit ist davon auszugehen, dass dieser versehentlich eingemischt wurde. Für die übrigen drei Samen konnten an einzelnen Genorten keine eindeutigen DNS-Fragmente bestimmt werden, dies kann unter anderem in einer geringen Qualität der Ausgangs-DNS begründet

sein.

Von den insgesamt 12 untersuchten Primerpaaren wurden für die weiteren Analysen zunächst sechs Primerpaare (GD96, 23g4, ch02d12, GD162, ch01h01 und ch01h10) ausgewählt.

Die F-Werte an den sechs ausgewählten Genorten sind in Tabelle 2 dargestellt. Von sechs Genmarkern zeigt allein 23g4 bei *M. sylvestris* und *M. domestica* höher positive F-Werte, in dem Kollektiv der Nachkommen aber einen geringfügig negativen Wert. Die Ergebnisse geben keinen Hinweis auf den Einfluss eventuell vorliegender Nullallele. Bei der Berechnung wurden die im Folgenden dargestellten Ergebnisse der Artzuordnung bereits berücksichtigt, indem Individuen mit unterschiedlicher morphologischer und genetischer Zuordnung ausgeschlossen wurden.

Zuordnung einzelner Individuen zu Wild- und Kulturformen des Apfels

Im Hinblick auf die Zuordnung von einzelnen Individuen zu einer der beiden Arten *M. sylvestris* oder *M. domestica* werden zunächst die Allelfrequenzen in den beiden Kollektiven dargestellt. Grundsätzlich gilt, dass die Wahrscheinlichkeit einer eindeutigen Zuordnung zunimmt, je deutlicher die Frequenzunterschiede für einzelne Allele zwischen den Arten sind (Leinemann 1996, 1998). Eine vollständige und eindeutige Zuordnung auf der Basis eines Markers ist nur erreichbar bei genetisch vollständig unterschiedlichen Häufigkeitsverteilungen, indem kein Allel der einen Art in der anderen auftritt. In Tabelle 3 sind für *M. sylvestris* und *M. domestica* die beobachteten

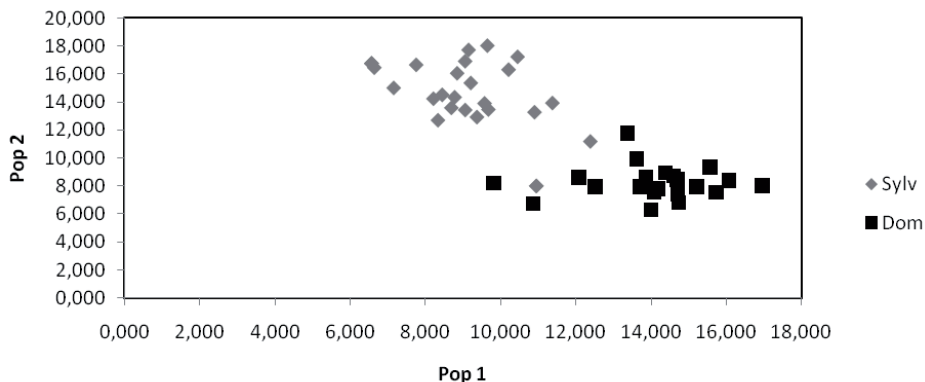
Tabelle 3. Die Allelhäufigkeiten an den sechs untersuchten Mikrosatelliten-Genorten GD96, 23g4, ch02d12, GD162, ch01h01 und ch01h10 für *Malus sylvestris* (Sylv) und *M. domestica* (Dom). Die Allele sind charakterisiert durch die detektierte Fragmentlänge in Basenpaaren (bp). Individuen mit Widerspruch zwischen morphologischer und genetischer Klassifizierung (siehe folgende Ergebnisse) wurden von der Berechnung der Allelfrequenzen ausgeschlossen.

Allel frequencies of 6 investigated microsatellite gene loci GD96, 23g4, ch02d12, GD162, ch01h01 und ch01h10 of *M. sylvestris* (Sylv) and *M. domestica* (Dom). Alleles are characterized according to the length in base pairs (bp) of the DNA-fragments detected. Individuals with contradicting classification according to morphology and genetic makeup (see following results) were excluded from the calculation of allele frequencies.

	Genort																	
	23g4			GD96			ch02d12			GD162			ch01h01			ch01h10		
Allele (bp)	Sylv	Dom	Allele (bp)	Sylv	Dom	Allele (bp)	Sylv	Dom	Allele (bp)	Sylv	Dom	Allele (bp)	Sylv	Dom	Allele (bp)	Sylv	Dom	
76	0,021	0,000	151	0,063	0,188	175	0,065	0,000	212	0,000	0,021	100	0,043	0,000	85	0,063	0,000	
81	0,042	0,333	164	0,000	0,104	177	0,000	0,104	214	0,104	0,354	104	0,000	0,021	89	0,000	0,292	
83	0,000	0,021	170	0,104	0,021	179	0,022	0,000	222	0,000	0,042	112	0,021	0,104	96	0,042	0,478	
85	0,000	0,083	172	0,063	0,208	181	0,130	0,125	223	0,000	0,042	114	0,065	0,208	101	0,000	0,063	
86	0,000	0,021	174	0,063	0,063	183	0,130	0,167	225	0,000	0,083	116	0,043	0,146	102	0,271	0,021	
87	0,417	0,000	176	0,146	0,083	191	0,392	0,042	228	0,042	0,000	118	0,087	0,188	104	0,021	0,000	
89	0,083	0,000	178	0,103	0,063	195	0,087	0,103	229	0,021	0,000	120	0,197	0,082	108	0,021	0,125	
91	0,332	0,041	180	0,000	0,125	197	0,065	0,000	231	0,042	0,188	122	0,087	0,000	110	0,146	0,000	
93	0,021	0,000	182	0,333	0,103	199	0,022	0,438	233	0,415	0,124	126	0,065	0,021	114	0,021	0,000	
95	0,021	0,000	184	0,062	0,000	201	0,022	0,000	235	0,271	0,021	128	0,218	0,042	116	0,166	0,000	
99	0,000	0,042	190	0,042	0,000	204	0,000	0,021	237	0,000	0,104	130	0,152	0,188	126	0,021	0,000	
101	0,000	0,063	196	0,021	0,042	208	0,043	0,000	239	0,021	0,000	132	0,021	0,000	132	0,000	0,021	
103	0,000	0,021				210	0,022	0,000	241	0,021	0,000				134	0,021	0,000	
107	0,000	0,229							249	0,042	0,021				136	0,165	0,000	
109	0,000	0,021							255	0,021	0,000				138	0,021	0,000	
113	0,042	0,125													140	0,021	0,000	
114	0,021	0,000																

Abbildung 1. Zuordnung von Einzelbäumen zu den Gruppen Sylv (grau = *Malus sylvestris*) und Dom (schwarz = *M. domestica*) auf der Grundlage von sechs SSR-Genorten. Die x- und die y-Achse geben die positiven Log-likelihood Werte an.

Assignment of single trees to the groups of Sylv (grey = *M. sylvestris*) and Dom (black = *M. domestica*) based on 6 SSR-genloci. The x- and y-axis show positive log-likelihood values.



Allelhäufigkeiten an den einzelnen Genorten dargestellt.

Tabelle 3 zeigt, dass an keinem der untersuchten Genorte eine vollständige Differenzierung der beiden Arten vorliegt. Bezüglich der hier untersuchten Kollektive sind aber an einigen Genorten genetische Varianten zu beobachten, die nur in einer der beiden Arten auftreten oder große Frequenzunterschiede offenbaren. Dazu gehören z. B. die Allele der Fragmentlängen 87 und 107 am Genort 23g4, die Allele 177 und 199 am Genort ch02d12 und die Allele 89, 116, 136 am Genort ch01h10. Dass die beiden Artengruppen dieser Studie insgesamt große genetische Unterschiede aufweisen, belegt ein genetischer Abstand von 0,835 (Nei 1972).

Zuordnung von Individuen des Wildapfels zu *M. sylvestris* und *M. domestica*

Aufgrund der charakteristischen genetischen Strukturen in den beiden Arten wurde eine Zuordnung von einzelnen Genotypen (*population assignment*) zu den beiden Arten mit der Software GenALEX 6.0 durchgeführt. Dabei wird für jeden Genotyp die Wahrscheinlichkeit berechnet, aus einer der beiden *a priori* definierten Gruppen zu stam-

men.

Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 1 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Auflösung der beiden Artengruppen sehr gut gelingt. Lediglich zwei Probepunkte (grau = *M. sylvestris*) fallen in den Bereich des *M.-domestica*-Kollektivs (schwarz). Dass es sich bei den betreffenden Proben um durchgewachsene Unterlagen handelt, bestätigt die Effizienz der angewendeten Methoden.

In der Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Zuordnung mit der Software *Structure* wiedergegeben ($k = 2$). Zu erkennen ist, dass die Ergebnisse beider Verfahren weitestgehend übereinstimmen, indem jeweils eine deutliche Unterscheidung von Wildapfel und Kulturapfel beobachtet werden kann. Ohne *A-priori*-Information über die Artzugehörigkeit der einzelnen Individuen werden zwei Gruppen gebildet; dabei ist der Anteil arttypischer genetischer Information (*estimated membership coefficient*) für den Wildapfel (grau) und für den Kulturapfel (schwarz) dargestellt. Die Proben sind in der Abbildung 2 entsprechend der fortlaufenden Nummerierung geordnet. Für drei Proben aus dem ursprünglichen Kollektiv des Wildapfels ist zu erkennen, dass sie für den Kulturapfel typische Multilocus-Geno-

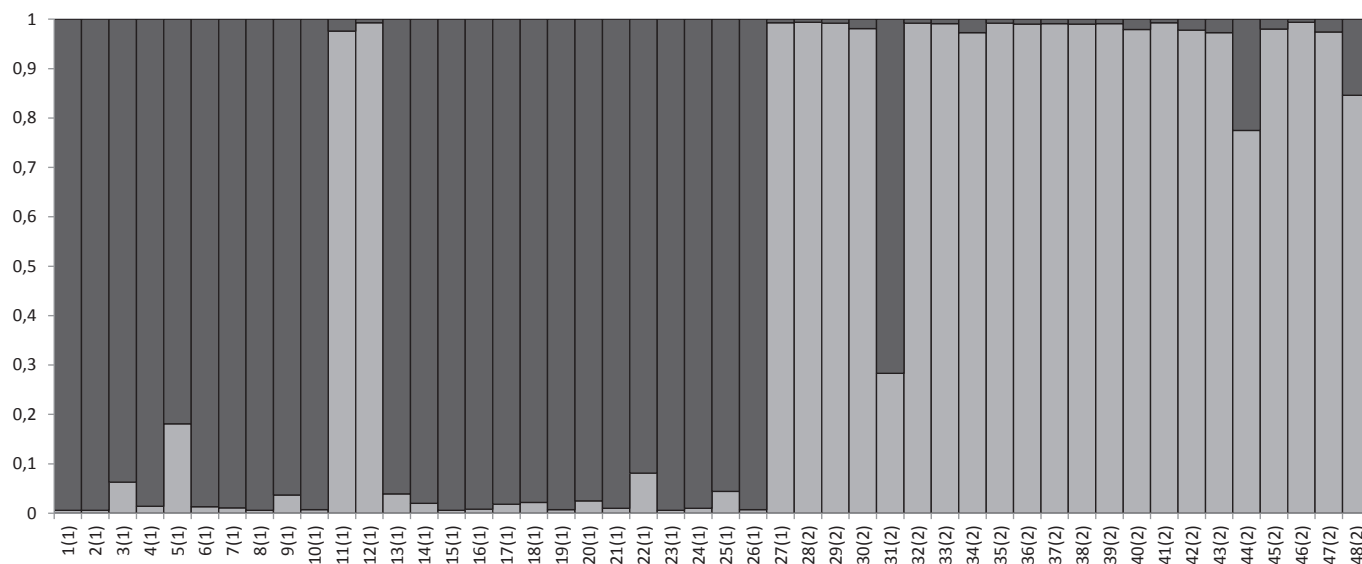


Abbildung 2. Individuelle Zuordnung einzelner Bäume zu den Arten *Malus sylvestris* und *M. domestica*. Die Balken geben den Zugehörigkeitsgrad eines Baumes zu einer der Arten wieder. Dunkelgrau steht für *M. sylvestris* und hellgrau für *M. domestica*.

Individual assignment of single trees to the species of *M. sylvestris* and *M. domestica*. The membership coefficient of each individual tree is reflected by the coloured bars. Dark gray for *M. sylvestris* and light gray for *M. domestica*.

Tabelle 4. Geschätzter minimaler Polleneintrag in die Wildapfelsamenplantage Vaake, Hessen je Halbgeschwisterfamilie (Zeile) und im Mittel über die sechs Halbgeschwisterfamilien. N: Anzahl; pot.: potenziell; SPL: Samenplantage.

Minimum estimate of pollen contamination into the *M. sylvestris* seed orchard Vaake, Hesse, for each half sib family and as average across families. N: number; pot.: potential; SPL: seed orchard.

Samenelter (Kennung)	Untersuchte Samen (N)	Anzahl Samen mit pot. Pollenelter in SPL (N)	Maximaler Anteil Pollenelter in SPL (%)	Minimaler Polleneintrag (%)
138_1	50	18	36	64
138_2	50	22	44	56
138_3	50	26	52	48
139_2	50	27	54	46
213_2	50	17	34	66
614_2	50	21	42	58
	300	131	44	56

typen besitzen. Das sind die Proben Nr. 11, 12 und 27, bei denen es sich tatsächlich um durchgewachsene Unterlagen der eigentlichen Pfropfreiser handelt. Die Proben 12 und 27, bei denen es sich um Material desselben Klons handelt, besitzen mit jeweils 0,006 nur geringste Wahrscheinlichkeiten für eine Zugehörigkeit zum Wildapfel. Das Gleiche gilt für die Probe 11, mit einem Wert von 0,035. In der Gruppe der Kulturäpfel ist eine Probe deutlich differenziert, dabei handelt es sich um die Probe 31 (Roter Berlepsch), die lediglich einen Zugehörigkeits-Koeffizienten zur Gruppe der Kulturäpfel von 0,334 besitzt.

Reihenuntersuchung von Generhaltungsobjekten

Im Rahmen der Reihenuntersuchung wurden 963 Individuen mit den beschriebenen Markern genotypisiert. Die Zuordnung zu Wild- und Kulturformen erfolgte mit dem Program GenAlEx 6.0. Es wurden 816 Wildtypen und 147 Kulturformen identifiziert. 15 % der bei der ersten Auswahl in der Natur phänotypisch als Wildäpfel eingeschätzten Individuen sind von der genetischen Ausstattung an den sechs Kern-Mikrosatelliten-Genmarkern als kulturnah einzustufen.

Schätzung von Genfluss in der Wildapfelsamenplantage Vaake

Für sechs Halbgeschwisterfamilien (N = 300 Samen) der Samenplantage Vaake wurde der Anteil potenzieller Polleneltern in der Samenplantage nach dem Ausschlussprinzip unter Berücksichtigung des potenziellen Allelbeitrages des Samenelters geschätzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Im Mittel über die sechs Familien haben mindestens 56 % der Nachkommen einen Pollenelter, der nicht auf der Plantage steht. Die Pollenwolken benachbarter Ramets eines Klons (Nr. 138) sind dabei auf dem 1 %-Niveau signifikant verschieden. Auch die Pollenwolken verschiedener Klone unterscheiden sich signifikant ($\text{Chi}^2 < 0,001$) voneinander.

Diskussion

Als Genmarker kombinieren nukleare Mikrosatelliten eine Reihe von vorteilhaften Eigenschaften, da sie in der Regel hochvariabel sind und ihre Ausprägung kodominant erfolgt. Unter anderem werden nukleare Mikrosatelliten für die Sortenidentifizierung auch beim Apfel (Hokanson et al. 1998, 2001) genutzt. Jedoch erfordert die Anwendung von Mikrosatelliten ein hohes Maß an labortechnischem Aufwand, auch über die Entwicklung der eigentlichen Marker hinaus. Probleme können dann auftreten, wenn nicht präzise festgelegte Untersuchungsstandards Verwendung finden. Im Zweifelsfall

können Probleme in der Größenbestimmung einzelner Fragmente sowie im Zusammenhang mit labortechnischen Artefakten auftreten (Weising et al. 2005). Darüber hinaus stellen häufig Nullallele ein Problem dar, da ihr Auftreten eine eindeutige Bestimmung des Genotyps verhindert. Allerdings ist dies weniger ein Problem für die Sortenidentifizierung denn für die Untersuchung von Hybridisierung und Genfluss. In der vorliegenden Untersuchung wurden von ursprünglich 12 untersuchten SSR-Genmarkern sechs ausgewählt. Grundlage der Auswahl waren Eigenschaften, die für eine eindeutige Bestimmung des individuellen Genotyps von Bedeutung sind, wie Wiederholbarkeit und Konsistenz der Ergebnisse sowie ein geringer Einfluss von Artefakten. Beides wurde auch im Vergleich von Eltern und Nachkommen im Rahmen einer qualitativen Vererbungsanalyse geprüft. Die Berechnung des Fixierungsindex für die Kollektive *M. sylvestris* (Eltern und Nachkommen) sowie für *M. domestica* ergab keine Hinweise auf einen Einfluss von Nullallelen an den einzelnen Genorten. Die Anwendung der Genmarker im Bereich der Artunterscheidung kann als erfolgreich beurteilt werden. Unabhängig voneinander wurden zwei Verfahren der Datenanalyse verwendet, um die Trennschärfe des Markersets zu beurteilen. Beide Verfahren kommen zu gleichen Ergebnissen und trennen die beiden Arten deutlich. Überzeugend ist dabei das Ergebnis der Analysen mit dem Programm *Structure*, das ohne *A-priori*-Annahmen bezüglich der Aufteilung der Individuen auf zwei Gruppen auskommt. Insbesondere gelingt die eindeutige Identifizierung und Zuordnung durchgewachsener Unterlagen von *M. domestica*, auf die Reiser von *M. sylvestris* gepfropft waren. Allerdings weist auch eine Kultursorte genetische Charakteristika auf, die auf eine relative Nähe zum Wildapfel hindeuten könnte. Dabei handelt es sich um die Sorte Roter Berlepsch, die unter anderem für die geringe Größe ihrer Früchte bekannt ist. Möglicherweise ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass heute nicht ausschließlich die reinen Arten vorkommen, sondern dass tatsächlich Hybridisierungsvorgänge in der Vergangenheit und aktuell einen Einfluss auf den Genpool beider Arten haben. Wie die Untersuchung von Coart et al. (2006) belegt, sind Wild- und Kulturapfel genetisch ähnlicher als bisher angenommen. Nach wie vor scheinen aber charakteristische genetische Merkmalsunterschiede erhalten zu sein. Im Hinblick auf die Erhaltung des Wildapfels können gezielte Maßnahmen der Generhaltung nur dann effizient gestaltet werden, wenn es gelingt, Wildapfel und Kultursorten möglichst genau zu unterscheiden. Wenn also, wie die Reihenuntersuchung nahelegt, bei der morphologischen Ansprache zu 15 % kulturnahe Genotypen auf Samenplantagen vertreten sind, dann kommt es schon innerhalb der zum Zwecke der Erhaltung angelegten Samenplantagen zu einer Vermischung des Genpools von Wild- und Kulturformen (Genfluss innerhalb von Samenplantagen). Die Reihenuntersuchungen haben zudem die Wichtigkeit des Vergleichs mehrerer Merkmale gezeigt.

So konnte gezeigt werden, dass Individuen, die bisher morphologisch nicht als kulturnah aufgefallen waren, nach der Gruppierung anhand des Markergenotyps bei genauerer Untersuchung der Morphologie doch einige Hinweise auf Kulturnähe zeigten. Gegebenenfalls müsste auch das Markerset erweitert werden, wobei eine Kombination mit den bereits etablierten Isoenzymgenmarkern (Wagner und Weeden 2000) als nächster Schritt sinnvoll scheint.

Neben dem Genfluss innerhalb von Samenplantagen aufgrund der Einmischung von bisher nicht erkannten kulturnahen Genotypen konnte ein erheblicher Fremdpolleneintrag in den Nachkommenschaften zweier Samenplantagen nachgewiesen werden. Der Mindestanteil von 56 % Fremdpollen auf der Samenplantage Vaake deutet auf eine hohe Effektivität der Pollenvektoren hin. Für Insekten konnten Kamm et al. (2009) diese Effektivität bei Speierling (*Sorbus domestica* L.) auch über weite Entfernungen nachweisen. Es scheint daher auch nicht ratsam, die wenigen verbleibenden natürlichen Vorkommen zu beernten. Damit es zukünftig auf der Samenplantage zu einer Bestäubung nur zwischen *M. sylvestris*-Genotypen kommen kann, wird daher die Plantage Vaake, Hessen, in Zukunft während der Blütezeit mit einem für bestäubende Insekten dichten Netz isoliert. Auf diese Weise soll der Fremdpolleneintrag verhindert werden. Durch die Zusammensetzung der Samenplantage und ihre Bewirtschaftung kann so zukünftig genetisch vielfältiges, herkunftsgesichertes und auf Wildnähe geprüftes Vermehrungsgut von *M. sylvestris* unter dem Warenzeichen nwplus® für die Waldbesitzer zur Verfügung gestellt werden.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Hans-Jürgen Arndt, Dagmar Leisten und Carola Schmidt für die Probenahmen und die morphologische Charakterisierung der Wildäpfel, Ulrike Seifert und Olga Artes für die technische Unterstützung im Labor, Dr. Aki Höltnen für die Reihenuntersuchungen und Dr. Schönfelder für die Programmierung in R. Zwei anonymen Gutachtern sei gedankt für ihre Anregungen und Verbesserungsvorschläge.

Literatur

- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 613-622
- Bund-Länder-Arbeitsgruppe Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht 2006. Tätigkeitsbericht. Berichtszeitraum 01.01.2001-31.12.2004. <http://blag-documents.genres.de/berichte/ber-0104/index.htm> (12.12.2011)
- Coart E., Vekemans X., Smulders M.J.M., Wagner I., van Huylbroeck J., van Bockstaele E., Roldán-Ruiz I. 2003. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by AFLP and microsatellite markers: consequences for conservation. *Molecular Ecology* 12, 845-857
- Coart E., Van Glabeke S., De Loose M., Larsen A.S., Roldán-Ruiz I. 2006. Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology* 15, 2171-2181
- Erlbeck R., Hasede I.E., Stinglwagner, G.K.F. 2002. Das Kosmos Wald und Forst Lexikon. Franckh-Kosmos, Stuttgart
- Garve E. 2004. Rote Liste und Florenzliste der Farn- und Blütenpflanzen in Niedersachsen und Bremen. 5. Fassung, Stand 1.3.2004. Informationsdienst Naturschutz Niedersachsen 1/04
- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *TAG* 96, 1069-1076
- 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. *TAG* 94, 249-254
- Hokanson S.C., Szevc-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. *TAG* 97, 671-683
- Hokanson S.C., Lamboy W.F., Szevc-McFadden A.K., McFerson J.R. 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118, 281-294
- Kamm U., Rotach P., Gugerli F., Siroky M., Edwards P., Holderegger R. 2009. Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. *Heredity* 103, 476-482
- Kleinschmit J. 2000. Grenzen der In-situ-Erhaltung. *For. Snow Landsc. Res.* 75, 51-56
- Larsen A.S., Jensen M., Kjær E.D. 2008. Crossability between wild (*Malus sylvestris*) and cultivated (*M. x domestica*) apples. *Silvae Genetica* 57, 127-130
- Leinemann L. 1996. Genetic differentiation of damaged and healthy Douglas-fir stands in Rheinland-Pfalz with respect to their origin. *Silvae Genetica* 45, 250-256
- Leinemann L. 1998. Genetische Untersuchungen an Rassen der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) am Beispiel gesunder und geschädigter Bestände. *Göttinger Forstgenetische Berichte* 23
- Linder C.R., Taha I., Seiler G.S., Snow A.A., Rieseberg L.H. 1998. Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *TAG* 96, 339-347
- Lynch, M. 1991. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding. *Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges.* 82, 87-108
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106, 283-392
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347-354
- Paetkau D., Slade R., Burdens M., Estoup A. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13, 55-65
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959
- Remy K., Gruber F. 1993. Untersuchungen zur Verbreitung und Morphologie des Wild-Apfels (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges.* 81, 71-94
- R Development Core Team 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Rhymer J., Simberloff D. 1996. Extinction by hybridisation and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 83-109
- Wagner I. 1996. Zusammenstellung morphologischer Merkmale und ihrer Ausprägungen zur Unterscheidung von Wild- und Kulturformen des Apfel- (*Malus*) und des Birnbaumes (*Pyrus*). *Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges.* 82, 87-108
- Wagner I. 1998. Artenschutz bei Wildapfel – Die Blattbehaarung von 116 Apfelklonen auf zwei Samenplantagen. *Forst und Holz* 53, 40-43
- Wagner I., Weeden N.F. 2000. Isozymes in *Malus sylvestris*, *Malus domestica* and in related *Malus* species. *Acta Horticulturae* 538, 51-56
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. DNA Fingerprinting in plants – principles, methods, and applications. Second edition. CRC-Press, Boca Raton
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol.* 19, 395-420