

Reim, Stefanie

Julius Kühn-Institut, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden

Erhaltung von *Malus sylvestris* unter *In-situ*-Bedingungen im Osterzgebirge

In situ Management of *Malus sylvestris* in the Ore Mountains

Zusammenfassung

Ziel des Projekts ist die langfristige Erhaltung und Nutzung der einzigen, in Deutschland heimischen Wildapfelart *Malus sylvestris* (L.) Mill. an seinem natürlichen Standort (*,in-situ'*). Das Osterzgebirge ist eines der wenigen Gebiete in denen der Wildapfel noch in größerer Zahl vorkommt. Dennoch ist *Malus sylvestris* in seiner Existenz gefährdet. Vor allem durch die Intensivlandwirtschaft werden die Wildapfelbestände dezimiert. Zudem kommt es oftmals zu einer Hybridisierung mit dem Kulturapfel, so dass neben ‚echten‘ Wildapfelbäumen auch ‚Hybride‘ verbreitet sind.

Im Rahmen dieses Projektes wurden die vorhandenen Wildapfelbäume zunächst durch umfangreiche Kartierungsarbeiten im Osterzgebirge mittels GPS erfasst. Weiterhin wurde eine Reihe von morphologischen Merkmalen bonitiert, die zur Charakterisierung des Wildapfels beitragen sollen. Ausgewählte Bäume wurden zusätzlich genetisch analysiert, um eine eindeutige Einstufung in ‚echte‘ oder ‚Hybride‘ vorzunehmen.

Stichwörter: Wildapfel, *Malus sylvestris*, *in-situ*-Erhaltung, biologische Vielfalt

Abstract

The aim of the project is the long-term preservation and utilisation of the only indigenous wild apple species (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) of Germany in its natural environment (*'in situ'*). The East Ore Mountains are one of the few areas with a bigger population of the crab apple. Nevertheless, the existence of *Malus sylvestris* is endangered. Particularly the intensive agriculture decimates the crab apple population more and more. Furthermore, often hybridisation occurs with the domesticated apple, therefore ‚hybrids‘ are widespread in addition to the ‚pure‘ wild apple trees.

The crab apple trees in the East Ore Mountains were mapped with GPS using the Gauß-Krueger coordinates. Evaluation descriptors with a scoring scale were defined to differentiate ‚crab apple‘ or ‚hybrid‘. In addition genetic investigations were carried out with selected trees to classify the trees unambiguously as ‚pure‘ or ‚hybrid‘.

Keywords: crab apple, *Malus sylvestris*, *in situ*-preservation, biodiversity

Einleitung

Der europäische Wildapfel *Malus sylvestris* (L.) Mill. ist von Vorderasien bis Europa verbreitet. In Europa kommt er im Norden bis Großbritannien, Mittelnorwegen und Mittelschweden vor. Im Osten reicht die Verbreitung bis zur Wolga und im Westen bis zur Iberischen Halbinsel. Im Süden ist *Malus sylvestris* bis zum Mittelmeer verbreitet. Obwohl das Verbreitungsgebiet relativ groß erscheint, kommt *Malus sylvestris* nur sehr zerstreut und vorwiegend in Einzelexemplaren vor. Innerhalb seines Verbreitungsareals wächst *Malus sylvestris* vorzugsweise im Bereich der Nässegrenze, wie Flussauen oder Auenwäldern. Auch bevorzugt der Wildapfel als lichtliebendes Gehölz Standorte in lichten Wäldern, Steinrücken, Hecken und Gebüsch. Geeignete Standorte für den Wildapfel gehen durch menschliche Einflussnahme, wie der Intensivierung der Landwirtschaft und Forstwirtschaft immer mehr verloren. Sind die Wildapfelvorkommen auf wenige Einzelindividuen oder Kleinstgruppen beschränkt, kommt es zu einer genetischen Verarmung und das Aussterberisiko dieser isolierten Populationen steigt (Rosenthal 2003). Zusätzlich ist durch die Reduzierung geeigneter Kreuzungspartner die Wahrscheinlichkeit einer Hybridisierung mit dem Kulturapfel erhöht, so dass bei einer natürlichen Regeneration mit einer Introgression des Kulturapfels gerechnet werden muss (Kleinschmidt und Stephan 1997; Tabel et al. 2000). Größere *Malus sylvestris* Populationen finden sich in Deutschland nur noch selten. Nennenswerte Vorkommen gibt es beispielsweise im Biosphärenreservat ‚Mittlere Elbe‘ und dem Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin, aber auch im Osterzgebirge.

Das Osterzgebirge wurde erst spät besiedelt und aufgrund der ungünstigen klimatischen Bedingungen wurde erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts der Kulturapfel auf Streuobstwiesen angebaut. Daher ist davon auszugehen, dass eine Hybridisierung zwischen *Malus sylvestris* und dem Kulturapfel nur in einem geringen Maße stattgefunden hat. Weiterhin bietet die räumliche Struktur mit dem stetigen Wechsel zwischen Offenland, Wald und Steinrücken beste Standortbedingungen für den Wildapfel.

Ziel dieser Arbeit ist, die Erhaltung und nachhaltige Nutzung des Wildapfels *Malus sylvestris* im Osterzgebirge zu sichern. Gleichzeitig hat das Projekt Modellcharakter für das Management des Wildapfel und soll auf andere Gebiete Deutschlands und andere Wildobstarten übertragbar sein.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: 795 vorhandene Wildapfelbäume wurden mittels GPS im Projektgebiet erfasst und ihre Gauß-Krüger Koordinaten in einer Karte aufgezeichnet. Für die genetischen Analysen wurden 220 Wildapfel-Akzessionen aus dem Osterzgebirge anhand der Boniturdaten zur Morphologie des Blattes und der Blüte sowie der Fruchtgröße ausgewählt. Zum Vergleich der genetischen und morphologischen Merkmale wurden 10 alte

sächsische Apfelsorten und die Sorten ‚Pinova‘ und ‚Elstar‘ in die Analyse einbezogen. Weiterhin wurden sechs Apfelgenotypen in den Untersuchungen berücksichtigt, die vom European Cooperative Programme for Plant Genetic Resource (ECPGR) als Standards festgelegt wurden. Es handelt sich dabei um die Apfelsorten ‚Delicious‘, ‚Fiesta‘, ‚Prima‘, ‚Worcester Permain‘, die Unterlagensorte ‚Malling 9‘ und die zwei Wildapfel-Genotypen ‚*Malus floribunda* 821‘ und ‚*Malus robusta* 5‘ (Govan et al. unveröffentlicht).

Morphologische Merkmale: Für die Charakterisierung des Wildapfels wurde ein Boniturbogen mit insgesamt 30 Einzelmerkmalen erarbeitet. Dabei wurden unter anderem Merkmale zum Standort, zum Habitus, zur Morphologie des Blattes und der Blüte sowie zu Fruchteigenschaften festgehalten. Alle Bonituren erfolgten *in-situ*.

Probennahme und DNA Isolierung: Die Sammlung der Blattproben erfolgte unter Verwendung von Silicakügelchen modifiziert nach einem Protokoll von (Slotta et al. 2008). Die getrockneten Blattproben wurden anschließend für 3 Minuten mit einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Haan) bei 25 Schlägen/Sekunde zermahlen. Die DNA Isolierung wurde nach einem Protokoll des Plant DNeasy mini Kits (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt und anschließend auf 10 ng/µl verdünnt.

SSR-Analyse: Für die SSR-Analyse wurden 12 verschiedene SSR-Marker verwendet, die vom ECPGR als Standardmarker festgelegt wurden: CH01h10, CH04C07, CH01h01, Hi2c07, CH01f03b, GD147, CH02d08, CH04e05, CH02c11, CH01f02, CH02c09, GD12. Die PCR wurde unter Verwendung des ‚Type-it Microsatellite PCR Kits‘ der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend des Protokolls durchgeführt. Die Auftrennung und Analyse der SSR-Fragmente erfolgte mittels Beckman Coulter CEQ 8800 (Fa. Beckman Coulter, Krefeld).

Datenanalyse: Die genetischen und morphologischen Daten wurden in eine binäre Matrix umgewandelt, wobei 0 und 1 die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein des Merkmals kennzeichnen. Unter Verwendung des DICE-Koeffizienten wurde mittels Softwareprogramms NTSYS 2.0 eine Prognose der Ähnlichkeit zwischen den Akzessionen vorgenommen. Die Ähnlichkeitsmatrix wurde mit der Clusteranalyse-Methode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) verrechnet und ein Dendrogramm erstellt.

Ergebnisse

Morphologische Merkmalerfassung: Insgesamt wurden 220 Akzessionen aus dem Osterzgebirge anhand ihrer morphologischen Merkmale charakterisiert. Als die wichtigsten Merkmale für die Klassifizierung des echten Wildapfels gelten die fehlende Behaarung an Blättern und Blüten sowie Fruchtgrößen unter 35 mm und die fehlende Deckfarbe der Früchte. Ein Großteil der untersuchten Akzessionen zeigten weder eine Behaarung an den Blättern (73 % der Akzessionen) noch eine Behaarung an der Blüte (84 % der Akzessionen). Bei 84 % der untersuchten Akzessionen waren die Früchte kleiner als 35 mm und 90 % der Akzessionen zeigten keine Deckfarbe oder nur einen roten Hauch als Deckfarbe. Als Ergebnis der morphologischen Bonitur wurden 114 Akzessionen als ‚echte‘ Wildapfelbäume eingeordnet. Da die Boniturnote mindestens eines der oben beschriebenen Merkmale auf einen Kultureinfluss hindeutete wurden 106 Akzessionen als ‚Hybrid‘ eingestuft.

Genetische Merkmalerfassung: Für eine eindeutige Gruppierung in ‚echt‘ oder ‚Hybrid‘ wurden die 220 Akzessionen mit 12 SSR-Markern untersucht. Alle Akzessionen zeigten ein auswertbares Ergebnis und mit jedem SSR-Marker wurde je Akzession mindestens ein Fragment detektiert. Die Anzahl der unterschiedlichen Allele variierte je SSR-Marker zwischen 13 und 23, die Allelfrequenzen lagen bei mindestens 0,0021 und maximal 0,8761. Insgesamt wurden mit den 12 SSR-Markern 191 verschiedene SSR-Allele detektiert.

Clusteranalyse: Auf Basis der 191 detektierten Allele und der morphologischen Daten wurde eine binäre Matrix erstellt und mit Hilfe des Softwareprogramms NTSYS 2.0 verrechnet. Das resultierende Dendrogramm zeigt die verwandtschaftlichen Beziehungen der 238 Akzessionen zueinander. Dabei konnte der Stammbaum in vier Hauptcluster gegliedert werden. In der ersten Gruppe sind die Wildapfelarten *Malus floribunda* 821 und *Malus robusta* 5 vertreten. In der zweiten Gruppe sind alle Kulturapfelsorten, wie beispielsweise ‚Elstar‘ oder ‚Pinova‘ vorhanden. Die dritte Gruppe zeigte einen gemeinsamen Ursprung mit der Gruppe der Kulturapfelsorten, so dass alle Akzessionen in dieser Gruppe als Hybride eingestuft wurden. Insgesamt waren 57 Akzessionen aus dem Osterzgebirge dieser Gruppe zu zuordnen. Bei der vierten Gruppe handelt es sich um das Cluster mit den ‚echten‘ *Malus sylvestris* Akzessionen. In diese Gruppe wurden 154 von insgesamt 220 Akzessionen aus dem Osterzgebirge eingeordnet. Bei den verbleibenden 9 Akzessionen war die Eingliederung in ein Cluster des Dendrogramms nicht eindeutig, so dass eine klare Einteilung in ‚Hybrid‘ oder ‚echt‘ nicht möglich war.

Diskussion

Von den insgesamt 30 aufgenommenen Merkmalen erfolgte die Artzuordnung anhand einiger ausgewählter Merkmale. In der Literatur gelten vor allem die Blatt- und Blütenbehaarung sowie die Fruchtgröße und Fruchtdeckfarbe als sehr gute Deskriptoren zur Differenzierung von *Malus sylvestris* und *Malus x domestica* (Wagner 1996). Anhand dieser ausgewählten Merkmale wurde zunächst eine augenscheinliche Einstufung der ausgewählten Akzessionen vorgenommen. Bei der Blattbehaarung wird eine mittlere bis starke Behaarung an Blattunterseite und Blattstiel als deutliches Indiz für einen Einfluss des Kulturapfels angesehen (Wagner 1996). Dasselbe gilt für die Behaarung der Blüte. Bei der Fruchtgröße wird eine maximale Fruchtgröße von 3,5 mm als Grenze zum Kulturapfel angesehen (Fellenberg 2001; Jacques et al. 2009; Remmy und Gruber 1993; Tabel et al.

2000; Wagner 1996). Ein großer Nachteil der Klassifizierung anhand von morphologischen Merkmalen ist, dass sie einer mehr oder weniger starken Variation unterliegen, so dass eine falsche Einordnung nicht immer auszuschließen ist (Remmy und Gruber 1993). Die zusätzliche Überprüfung mit molekularen Markern ist zwar arbeits- und kostenaufwändig, schließt aber umweltbedingte Schwankungen bei der Einstufung in echte und hybridisierte Wildapfel-Formen aus. Weiterhin können die einzelnen morphologischen Merkmale hinsichtlich ihrer Aussagekraft für die Klassifizierung der Wildapfel-Akzessionen überprüft werden (Coart et al. 2003; Jacques et al. 2009; Larsen et al. 2006). Beispielsweise zeigten Vergleiche mit molekularen Markern, dass der Grad der Blattbehaarung nicht immer ein eindeutiges Zeichen für den Wildapfel ist (Coart et al. 2003; Jacques et al. 2009).

Von den 220, in dieser Arbeit analysierten, Akzessionen wurden nach Verrechnung der genetischen und morphologischen Daten 57 Individuen als Hybrid und 154 als ‚echt‘ eingestuft. Diese Einstufung war abweichend von der augenscheinlichen Beurteilung, die anhand der morphologischen Merkmale durchgeführt wurde, wobei 106 Individuen als Hybrid und 114 als ‚echte‘ *Malus sylvestris* Akzessionen eingruppiert wurden. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Larsen et al. (2006), nach der genetischen Analyse wurde ein Großteil der augenscheinlichen Hybriden in die Gruppe der echten Individuen eingeordnet. Diese unterschiedliche Festlegung kann mit einer höheren bisher unbekanntem phänotypischen Variation innerhalb der Art *Malus sylvestris* begründet werden. Zusätzlich vermuten Larsen et al. (2006), dass die morphologischen Merkmale nicht miteinander gekoppelt sind und einem einfachen Erbgang folgen. Auch in einer Reihe weiterer Arbeiten wurde beobachtet, dass die morphologischen Merkmale nicht immer mit den genetischen Daten korrespondieren (Coart et al. 2003; Jacques et al. 2009; Rieseberg und Ellstrand 1993; Watano et al. 2004).

Literatur

- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M. J., Wagner, I., Van, B. E., Van, H. J. und Roldan-Ruiz, I., 2003: Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **12**, 845-857.
- Fellenberg, U., 2001: Beurteilung von Wildobst- Voraussetzung für geeignetes Vermehrungsgut zur Erhaltung von Waldgenressourcen. *Forst und Holz* **56**, 50-54.
- Jacques, D., Van der mijnsbrugge, K., Lemaire, S., Antofie, A. und Lateur, M., 2009: Natural distribution and variability of wild apple (*Malus sylvestris*) in Belgium. *Belgian Journal of Botany* **142**, 39-49.
- Kleinschmidt, J. und Stephan, R., 1997: Wild fruit trees. EUFORGEN Noble Hardwoods, Network, Reports, 51-59.
- Larsen, A., Asmussen, C., Coart, E., Orlík, D. und Kjær, E., 2006: Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple. *Journal of Tree Genetics and Genomes*, **2**, 86-97.
- Remmy, K. und Gruber, F., 1993: Untersuchung zur Verbreitung und Morphologie des Wild-Apfel (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Mitteilung Deutsche Dendrologische Gesellschaft* **81**, 71-94.
- Rieseberg, L. H. und Ellstrand, N. C., 1993: What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 213-241.
- Rosenthal, G., 2003: Bedeutung evolutionsbiologischer Prozesse für Landschaftsplanung und Naturschutz. *Natur und Landschaft*, **78**, 497-506.
- Slota, T. A. B., Brady, L. und Chao, S., 2008: High throughput tissue preparation for large-scale genotyping experiments. *Molecular Ecology Resources* **8**, 83-87.
- Tabel, U., Maurer, W. D. und Remmy, K., 2000: Wildapfel und Wildbirne. Taxation der "Wildformnähe" in Klonsamenplantagen. *AFZ/ Der Wald* **16**.
- Wagner, I., 1996: Zusammenstellung morphologischer Merkmale und ihrer Ausprägung zur Unterscheidung von Wild- und Kulturformen des Apfels (*Malus*) und des Birnbaumes (*Pyrus*). *Mitteilung Deutsche Dendrologische Gesellschaft*, **82**, 87-108.
- Watano, Y., Kanai, I. und Tani, N., 2004: Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *Pentaphylla* (*Pinaceae*) revealed by molecular hybrid index analysis. *American Journal of Botany*, **91**, 65-72.

Bisutti, Isabella Linda

Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

Einfluss der Fermentation auf gefriergetrocknete Zellen des antagonistischen Bakteriums *Pseudomonas fluorescens*, Stamm Pf153

Influence of the different fermentation parameters on freeze-dried cells the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153

Zusammenfassung

Pseudomonas fluorescens ist ein effektiver Antagonist zur Kontrolle verschiedener Pflanzenkrankheiten. Um dieses als wirksames Pflanzenschutz- oder Pflanzenstärkungsmittel zu entwickeln, müssen sowohl Produktion, Formulierung als auch Anwendungstechnik optimiert werden. Die Gefrier Trocknung ist eine wichtige Konservierungsmethode für Mikroorganismen. Stamm Pf153 wurde als Modellorganismus verwendet, um den Einfluss der Fermentation auf das Überleben und die Wirksamkeit von *P. fluorescens* nach Gefrier Trocknung zu