

Einblicke in genetische Variationsmuster bei der Gattung *Sorbus* in Thüringen

(Mit 2 Abbildungen und 3 Tabellen)

L. LEINEMANN¹⁾✉, K. KAHLERT²⁾, W. ARENHÖVEL²⁾, W. VOTH³⁾ und B. HOSIUS⁴⁾

(Angenommen September 2010)

SCHLAGWÖRTER – KEY WORDS

Sorbus latifolia aggr.; *Sorbus heilingensis*; cpDNA; Isoenzyme; Apomixis.

Sorbus latifolia aggr.; *Sorbus heilingensis*; cpDNA; isozymes; apomixis; genetic variation.

1. EINLEITUNG

Die Gattung *Sorbus* ist, hinsichtlich der Fortpflanzungsverhältnisse sowie der taxonomischen Gliederung ihrer Arten samt ihrer Entstehungsgeschichte, sehr komplex. Ursache hierfür mag sein, dass sich Teile der Gattung in einem aktiven Stadium der Artbildung befinden, wobei das Zentrum in Mitteleuropa liegt (MEYER *et al.*, 2005). In Europa umfasst die Gattung *Sorbus* fünf diploide Ausgangsarten: *Sorbus aria* (Echte Mehlbeere), *Sorbus aucuparia* (Vogelbeere), *Sorbus torminalis* (Elsbeere), *Sorbus chamaemespilus* (Zwergmehlbeere) und *Sorbus domestica* (Speierling). In Deutschland sind alle diese Arten relativ selten und bedürfen in der Regel einer achtsamen waldbaulichen Behandlung (s.a. SCHRÖTTER, 1992, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass Hybridisierungsvorgänge zwischen diesen Ausgangsarten wesentlich zur Bildung einer Reihe von neuen Arten beigetragen haben. Dabei werden häufig auch phänotypisch intermediäre Typen gebildet. In der Regel kommen diese Arten in geringen Häufigkeiten endemisch vor (NELSON-JONES *et al.*, 2002; CHESTER *et al.*, 2007).

In Deutschland sind insbesondere in Thüringen botanisch charakterisierte Vorkommen endemischer *Sorbus*-Arten der *Sorbus-latifolia*-aggr.-Gruppe zu finden (DÜLL, 1961; KUTZELNIGG, 1995; REUTHER, 1995, 1997; FINK, 2006). Von den Arten der *Sorbus-latifolia*-aggr.-Gruppe (Breitblättrige Mehlbeere bzw. Hybriden) wird angenommen, dass sie aus Hybridisierungsprozessen der diploiden Ausgangsarten *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis* hervorgegangen sind. Oft fungiert dabei *Sorbus aria* als Samenelter und *Sorbus torminalis* als Pollenelter (PRICE and RITCH, 2007; ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001a). Ergebnisse solcher Hybridisierungsvorgänge sind häufig polyploide Arten. Innerhalb der Gruppe wechselt der Ploidiegrad zwischen diploiden, triploiden und tetraploiden Typen (CHESTER *et al.*, 2007). Bezüglich der aus Hybridisierung hervorgegangenen polyploiden Arten wird vermutet, dass sie nur eingeschränkt oder kaum zur sexuellen Vermehrung fähig und daher weitestgehend auf vegetative Vermehrung durch Apomixis angewiesen sind (NELSON-JONES *et al.*, 2002). Einerseits kann dies dazu beitragen, dass die betreffenden Arten ihre Identität bewahren, da sie vor der Inkorporation genetischer Variation aus anderen Arten geschützt werden. Andererseits wird ihnen aber auch eine Möglich-

keit genommen, sich an wechselnde Umwelten durch die Neukombination von Genen anzupassen. Dieser Umstand kann gerade für endemische Arten mit wenigen Individuen von Bedeutung sein.

In Ergänzung zu morphologischen Studien haben sich in den letzten Jahren insbesondere cpDNS-Marker als wertvolles Werkzeug in der Taxonomie etabliert (ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001b; DEMASURE *et al.*, 1995; WEISING und GARDNER, 1999). In der vorliegenden Untersuchung wurden universelle cpDNS-Primer (WEISING und GARDNER, 1999) zur Charakterisierung genetischer Variation von 12 *Sorbus*-Arten und insgesamt 141 Individuen verwendet. Neben den beiden Ausgangsarten (*Sorbus aria* und *Sorbus torminalis*) der Bastard-Mehlbeeren Gruppe (*Sorbus latifolia* aggr.) wurden auch Proben von zwei taxonomisch distanzierten Arten (*Sorbus pinnatifida* und *Sorbus intermedia*) untersucht. Mit dieser Pilotstudie soll untersucht werden:

1. Ob die einzelnen Arten bezüglich ihrer cpDNA unterschieden bzw. den Ausgangsarten zugeordnet werden können.

2. Ob und in welchem Ausmaß Apomixis, d.h. die Bildung genetisch identischer Nachkommen aus Samengewebe anhand von Einzelbaumnachkommen von *Sorbus heilingensis* mit Hilfe von Isoenzym-Genmarkern nachgewiesen werden kann.

2. MATERIAL

2.1 Chloroplasten-Analysen

Die Verteilung der Vorkommen in Thüringen ist in der folgenden Karte (Abb. 1) dargestellt.

Der weitaus größte Teil der 141 untersuchten Proben wurde im September 2009 in Thüringen gesammelt (Zweigproben teilweise mit Früchten); 24 Proben stammen aus Mecklenburg-Vorpommern (s. Tabelle 1).

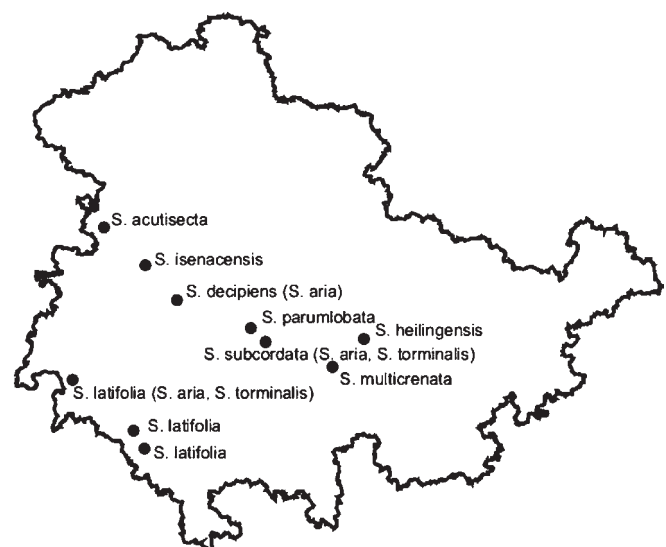


Abb. 1

Geographische Verteilung der untersuchten *Sorbus*arten in Thüringen.

Geographic Distribution of the *Sorbus* species analysed in Thuringia.

¹⁾ Abteilung Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Buisgeninstitut, Georg-August Universität Göttingen, Buisgenweg 2, D-37077 Göttingen.

²⁾ Thüringer Landesanstalt für Wald, Jagd und Fischerei, Jägerstraße 1, D-99687 Gotha.

³⁾ Landesforst Mecklenburg-Vorpommern, Betriebsteil Forstplanung/Versuchswesen/Informationssysteme, Forstliches Versuchswesen – Sachgebiet Genressourcen, Zeppelinstraße 3, D-19061 Schwerin.

⁴⁾ ISOGEN, An der Abteilung Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Buisgenweg 2, D-37077 Göttingen.

✉ Korrespondierender Autor: LUDGER LEINEMANN.
E-Mail: lleinem@gwdg.de

Tab. 1

Übersicht der untersuchten Arten, Anzahl untersuchter Proben
und deren Ursprungsort (Forstbezirk).

Overview of the analysed species, number of samples investigated
and their place of origin (Forest district).

Name	Anzahl Proben	Herkunft (Forstbezirk)
Ausgangsarten		
<i>Sorbus aria</i> (L.) Crant Echte Mehlbeere	9	Arnstadt, Kaltennordheim, Finsterbergen
<i>Sorbus torminalis</i> (L.) Crantz Elsbeere	10	Arnstadt, Kaltennordheim
	19	Gut Klepelshagen, Nemerower Holz, Kamp Golchen
Bastard-Mehlbeeren		
<i>Sorbus acutisecta</i> R. Reuther et O. Schwarz, Spitzwinkelige Bastard-Mehlbeere,	5	Hainich-Werratal, Arnstadt
<i>Sorbus decipiens</i> (Bechst.) Irmisch ex Petz. & Kirchn. Täuschende Bastard-Mehlbeere	18	Finsterbergen
<i>Sorbus heilingensis</i> (Düll) Heilinger Bastard-Mehlbeere	20	Paulinzella
<i>Sorbus isenacensis</i> R. Reuther Eisenacher Mehlbeere	4	Hainich-Werratal
<i>Sorbus latifolia</i> (Lam.) Pers. s. str. Breitblättrige Bastard-Mehlbeere ¹	19	Schwarza, Kaltennordheim
<i>Sorbus multicrorenata</i> Bornm. ex Düll Vielkerbige Bastard-Mehlbeere	10	Paulinzella
<i>Sorbus parumlobata</i> Irmisch ex Düll Schwachgelappte Bastard-Mehlbeere	3	Arnstadt
<i>Sorbus subcordata</i> , Bornm. ex Düll, Arnstädter Bastard-Mehlbeere	16	Arnstadt
Weitere Arten		
<i>Sorbus intermedia</i> (Ehrh.) Pers., Schwedische Mehlbeere	7	Finsterbergen(Thür.), Weberin (MV)
<i>Sorbus pinnatifida</i> (Sm.) Düll, Bot. Bastard Eberesche	1	Arnstadt

¹ Noch nicht botanisch beschriebene Vorkommen in den Thüringer Forstämtern Schwarza und Kaltennordheim, die aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften der *Sorbus-latifolia*-Gruppe zugeordnet werden konnten.

Von 10 Altbäumen von *Sorbus heilingensis* wurden Knospenproben sowie Einzelbaumnachkommenschaften mit insgesamt 68 Nachkommen untersucht.

3. METHODEN

3.1 cpDNA-Analysen

Die Isolation der DNA erfolgte nach Standardverfahren unter Verwendung des Extraktionskits DNeasy der Fa. Qiagen (Qiagen, Hilden). Für die Untersuchungen zur Phylogenie der verschiedenen Arten wurden universelle SSR-Primer (ccmp) zur Analyse des Chloroplasten-Genoms verwendet (WEISING und GARDNER, 1999). Die Fragmentanalyse erfolgte mit Hilfe farbmarkierter Primer auf einem Sequenzierer (ABI3100). Die genetische Variation der Chloroplasten (cpDNA) wird bei Angiospermen in der Regel maternal vererbt. Damit wird die cpDNA des Samenelterns ohne Rekombination über die Eizelle an die Nachkommen weitergegeben. Durch die Charakterisierung dieser sogenannten Haplotypen ist es möglich, maternale Linien auch bei der Entstehung von Arten zu verfolgen. Die Anwendung dieser Methoden kann damit Aufschluss darüber geben, ob Verwandtschaftsverhältnisse mütterlicherseits zwischen den untersuchten Arten bestehen und in welcher Richtung die Hybridisierung bei den einzelnen Arten erfolgte. Aufgrund der rein maternalen Weitergabe der Chloroplasten sind Hybridisierungs-

ereignisse nicht direkt nachweisbar. In einer Voruntersuchung von insgesamt 24 Proben der Arten *S. torminalis*, *S. aria*, *S. heilingensis*, *S. multicrorenata* und *S. decipiens* wurden 10 ccmp Primer getestet. Davon zeigten zwei (ccmp 3 und ccmp 4) Variation.

In den weiteren Analysen wurden daher die ccmp-Primer 3 und 4 verwendet, um alle 141 bereitgestellten Proben zu untersuchen. Die darauf bezogene genetische Variation wurde zu eindeutig charakterisierten individuellen Haplotypen zusammengefasst, deren Häufigkeit in den Arten berechnet wurde. Auf dieser Grundlage wurde der genetische Abstand d0 (GREGORIUS, 1974) berechnet und eine Gruppierungsanalyse nach dem UPGMA-Algorithmus (SNEATH and SOKAL, 1973) durchgeführt. Dabei werden Arten zu Gruppen zusammengefasst, die genetisch relativ ähnlich sind.

3.2 Isoenzym-Analysen

Die Elektrophorese wurde mit auf die *Sorbus*-Arten angepassten Standardmethoden (WENDEL and WEEDEN, 1989) durchgeführt. Soweit eine Vererbungsanalyse für Isoenzym polymorphismen von Arten vorliegt, können diese sehr gut als von beiden Elternteilen vererbte genetische Marker verwendet werden. Für die Vielzahl der hier untersuchten Arten steht eine Vererbungsanalyse allerdings noch aus. Darüber hinaus handelt es sich häufig um polyploide Arten, für die eine Vererbungsanalyse sehr komplex sein kann (s. a.

LEINEMANN, 2000). Auf eine Auswertung der Isoenzym-Analysen mit dem Ziel einer eindeutigen Genotypisierung zur Bestimmung genetischer Strukturen von allen zur Verfügung stehenden Arten wurde daher hier verzichtet. In der vorliegenden Untersuchung wurden Isoenzym-Analysen angewendet, um die Hypothese der Agamospermie (Apomixis) bei Bastard-Mehlbeeren (u.a. NELSON-JONES *et al.*, 2002) für die Art *Sorbus heilingensis* näher zu untersuchen. Es wurden folgende Enzyme bzw. Enzymzonen untersucht (die E.C. Ref.-Nrn. sind in Klammern angegeben): 6-Pgdh-A (1.1.1.44), Pgm-B, Pgm-C (2.7.51), Adh-A (1.1.1.1), Pgi-B, Pgi-C (5.3.1.9), Mnr-A (1.6.99.2) und Aat-A (2.6.1.1).

Auch bei nicht erfolgter Vererbungsanalyse kann davon ausgegangen werden, dass aus Agamospermie hervorgegangene Nachkommen eines Samenelters zu diesem identische Zymogramme ausprägen. Ist dies nur für einen putativen Isoenzym-Genort nicht gegeben, so kann die Vermutung einer rein asexuellen Vermehrung durch Apomixis für diesen Nachkommen verworfen werden. Für die Analysen wurden die Proben der Nachkommen immer direkt neben dem Samenelter auf dem Störkelgel aufgetragen. Wenn aus einer Frucht mehr als ein Samen gewonnen werden konnte, so wurden auch diese nebeneinander aufgetragen. Von 10 Einzelbäumen wurden insgesamt 68 Nachkommen untersucht. Nachkommen, die über alle untersuchten Enzymsysteme identische Zymogramme zeigten, wurden als Nachkommen durch Apomixis gewertet. Nachkommen, die nicht vollständig identische Zymogramme mit dem Samenelter zeigten, wurden als Nachkommen aus generativer Vermehrung gezählt.

4. ERGEBNISSE

Am cpDNA-Genort ccmp3 wurden 3 Fragmente mit den Längen (bp) von 97, 99 und 100 beobachtet, wobei das Fragment der Länge 97 (bp) nur einmal bei *Sorbus latifolia* vorkommt. Der cpDNA-Genort ccmp4 war mit 8 unterschiedlichen Fragmenten (118, 119, 120, 121, 122, 125, 126 und 133) variabler. Einige der Fragmente

kommen nur selten bzw. einmal vor. Das Fragment 119 tritt nur in einer Probe von *Sorbus aria*, das Fragment 120 nur einmal in der Probe von *Sorbus pinnatifida* auf. Das Fragment 121 tritt ausschließlich bei allen Individuen von *Sorbus intermedia* sowohl in Mecklenburg-Vorpommern als auch in Thüringen auf. Das Fragment 122 wurde nur einmal bei *Sorbus latifolia* identifiziert, während das Fragment 126 nur bei zwei Proben von *Sorbus decipiens* und einer Probe von *Sorbus torminalis* beobachtet wurde. Fragment 133 kam einmal bei *Sorbus torminalis* in Thüringen vor.

Insgesamt resultieren aus der Kombination von 3 (ccmp3) und 8 (ccmp4) Varianten 24 mögliche Kombinationen von Haplotypen; davon wurden jedoch nur zehn Haplotypen beobachtet. Die Haplotypen sind in *Tabelle 2* dargestellt. In der folgenden *Tabelle 3* sind

Tab. 2

Beobachtete Fragmentlängen (in Basenpaaren (bp)) an den Chloroplasten-Genorten ccmp3 und ccmp4 sowie die Bezeichnung der Haplotypen.

Observed fragment length (in base pairs (bp)) of the chloroplast gene loci ccmp3 and ccmp4 and their corresponding haplotypes.

Genort		Haplotyp
ccmp3	ccmp4	
97	122	S-5
99	118	S-9
99	119	S-10
99	120	S-11
99	121	S-12
99	125	S-14
99	126	S-15
99	133	S-16
100	125	S-22
100	126	S-23

Tab. 3

Relative Häufigkeiten der einzelnen Haplotypen in den Arten. Neben den Artnamen ist die absolute Anzahl untersuchter Proben aufgeführt.

Relative haplotype frequencies of the species. Numbers of samples investigated are shown on the right hand side of the species names.

	Haplotypen									
	5	9	10	11	12	14	15	16	22	23
Ausgangsarten										
<i>Sorbus aria</i> (10)	0,00	0,70	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Sorbus torminalis</i> (9) Thür.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,11	0,11	0,11
<i>Sorbus torminalis</i> (19) MV.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,74	0,26	0,00	0,00	0,00
Bastard-Mehlbeeren										
<i>Sorbus acutisecta</i> (5)	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00
<i>Sorbus decipiens</i> (18)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,06	0,00	0,35	0,06
<i>Sorbus heilingensis</i> (20)	0,00	0,65	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Sorbus isenacensis</i> (4)	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Sorbus latifolia</i> (19)	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,58	0,00
<i>Sorbus multicrenata</i> (10)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Sorbus parumlobata</i> (3)	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00
<i>Sorbus subcordata</i> (16)	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,59	0,00	0,00	0,35	0,00
Weitere Arten										
<i>Sorbus intermedia</i> (7)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Sorbus pinnatifida</i> (1)	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

die relativen Häufigkeiten der Haplotypen in den einzelnen Arten dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass in einzelnen Fällen nur wenige oder sogar nur eine Probe (*Sorbus pinnatifida*) einer Art untersucht wurde. Wesentlich für die Charakterisierung der Latifolia-Gruppe ist zunächst die Betrachtung der potenziellen Ausgangsarten *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis*. Hier zeigt sich, dass beide Arten nur geringe Ähnlichkeiten aufweisen. So ist bei *Sorbus aria* S-9 der häufigste Haplotyp mit 70% und bei *Sorbus torminalis* der Haplotyp S-14 mit 67% in Thüringen und 74% in Mecklenburg-Vorpommern. Während *Sorbus aria* den Haplotyp S-14 auch zu 10% aufweist, wurde der Haplotyp S-9 bei *Sorbus torminalis* nicht gefunden. Neben den beiden Haplotypen S-9 und S-14 ist ein dritter Haplotyp S-22 häufiger zu beobachten. Dieser kommt bei *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis* vor, jedoch nur mit Häufigkeiten von etwa 10%, während er bei einigen der hier untersuchten Arten wie *Sorbus acutisecta* und *Sorbus latifolia* mit ca. 60% vorkommt. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den genetischen Strukturen der cpDNS-Haplotypen der hier untersuchten Arten stark ausgeprägt und liegen im Durchschnitt bei einem genetischen Abstand von 0,6.

Bei *Sorbus latifolia* wurden große lokale Unterschiede beobachtet. So weisen alle 7 Proben aus dem Revier Neubrunn in Schwarza, den Haplotyp S-14 auf, während die meisten anderen Proben den Haplotyp S-22 zeigen. Möglicherweise sind für dieses Ergebnis Verwandtschaftsverhältnisse zwischen benachbarten Bäumen innerhalb der Kleinstvorkommen ursächlich, indem diese Bäume nur von wenigen, möglicherweise einzelnen, Elternindividuen abstammen. Dies führt dann zu einer geringen Variation innerhalb und einer deutlichen Differenzierung zwischen den Kleinstvorkommen. Bei *Sorbus torminalis* liegt eine geographische Differenzierung bezüglich seltener Haplotypen zwischen Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern vor. In Mecklenburg-Vorpommern tritt

neben dem Haplotyp S-14 nur ein zweiter Haplotyp S-15 auf, während in Thüringen die Haplotypen S-16, S-22 und S-23 jeweils einmal beobachtet wurden. Für die Gruppe der Bastard-Mehlbeeren zeigt sich, dass mit Ausnahme eines Baumes von *Sorbus latifolia* keine dieser Arten Haplotypen aufweist, die nicht auch bei den Ausgangsarten zu finden sind. Werden neben den typischen Haplotypen S-9 bei *Sorbus aria* und S-14 bei *Sorbus torminalis* auch die seltenen Haplotypen betrachtet, weist keine der Bastard-Mehlbeeren ausschließlich Haplotypen auf, die nur einer der Ausgangsarten zugeordnet werden könnten.

Die Gruppierungsanalyse der Haplotyphäufigkeiten in den einzelnen Arten und Sippen gibt Ähnlichkeiten zwischen diesen wieder, die wesentlich durch das Vorkommen der häufigen Haplotypen S-9, S-14 und S-22 geprägt sind.

In der Gruppierungsanalyse bilden sich zwei Hauptgruppen (s. *Abbildung 2*). Die erste Gruppe besteht aus Arten, die häufig den Haplotyp S-9 aufweisen, dies sind: *Sorbus acutisecta*, *Sorbus heilingensis* und *Sorbus parumlobata*. Die Arten der zweiten Gruppe zeigen oft den Haplotyp S-14 in größerer Häufigkeit.

Hier finden sich Sippen wie *Sorbus decipiens*, *Sorbus isenacensis*, *Sorbus subcordata* und *Sorbus multicrenata*. Letztere besitzt ausschließlich den Haplotyp S-14. Eine Abstammung von *Sorbus torminalis* in der mütterlichen Linie ist damit wahrscheinlich. Die beiden Arten *Sorbus intermedia* und *Sorbus pinnatifida* weisen einmalige Haplotypen auf und zeigen jede für sich die größten genetischen Unterschiede zu den beiden Hauptgruppen.

4.1 Isoenzym-Analysen zur Untersuchung von Apomixis bei *Sorbus heilingensis*

Die Analysen zeigten komplexe Zymogramme, die auf Polyploidie bei *Sorbus heilingensis* hinweisen könnten. Zwischen den Pro-

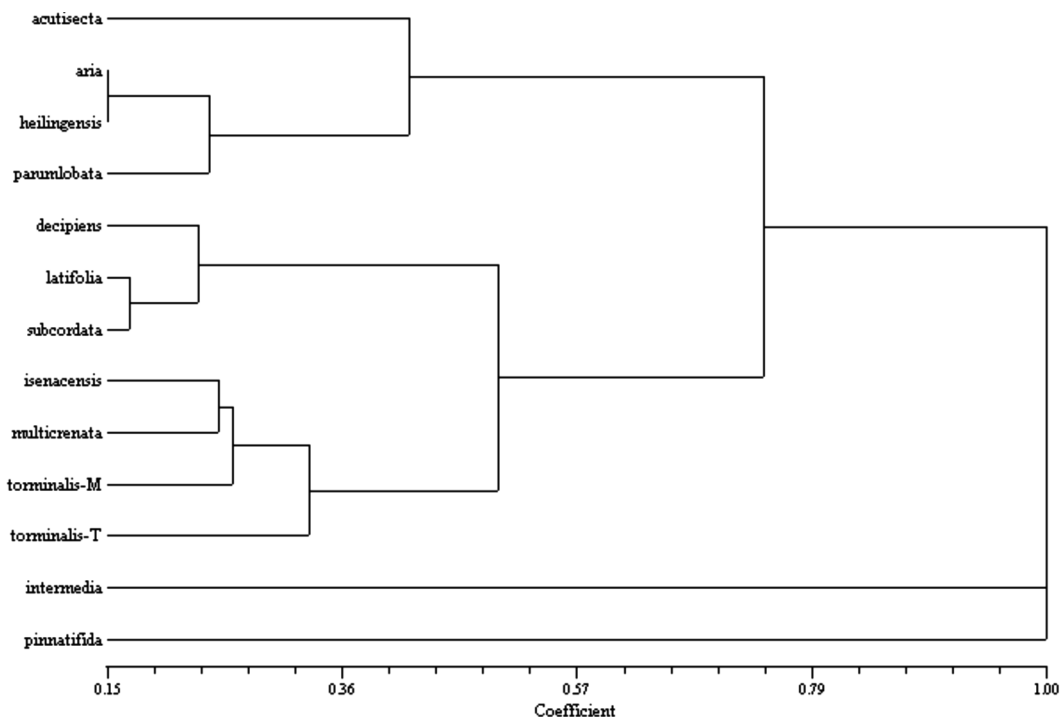


Abb. 2

Gruppierungsanalyse (UPGMA) auf Grundlage der genetischen Abstände zwischen den relativen Häufigkeiten der Haplotypen in den Arten.

Clusteranalysis (UPGMA) based on the genetic distance (GREGORIUS, 1974) between the haplotype frequencies of the species.

ben (Knospen und Samen) gab es große Unterschiede bezüglich der Qualität, daher konnten nicht alle Enzymsysteme für alle Proben in gleicher Weise dargestellt werden.

Von den insgesamt 68 untersuchten Nachkommen konnten nur 3 Nachkommen (4%) beobachtet werden, die im Vergleich zum Samenelter vollständig identische Zymogramme zeigten. Diese können daher aus Apomixis hervorgegangen sein. Vom Samenelter unterschiedliche Zymogramme zeigten 65 Nachkommen. Somit scheint *Sorbus heilingensis* einen überaus hohen Anteil an generativer Vermehrung zu realisieren. In 5 Fällen konnten zwei oder drei Samen aus einer Frucht extrahiert werden. In keinem der Fälle zeigten diese Samen identische Zymogramme.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde der Komplex der Bastard-Mehlbeere in Thüringen erstmals mit Hilfe von Chloroplasten-Genmarkern untersucht. Sowohl für die Ausgangsarten *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis* als auch für die anderen Arten wurden nur Stichproben bzw. Kleinstvorkommen untersucht, auf deren Grundlage lediglich eine erste Charakterisierung dieser Arten bezüglich der Variation der cpDNA erfolgen kann. Im Hinblick auf die Untersuchungsziele sind aber dennoch erste interessante Aussagen abzuleiten. Die Muster der genetischen Variation der cp-DNA der verschiedenen *Sorbus*-Arten unterstützen die Hypothese, dass es sich hier um Hybriden zwischen *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis* handelt, da mit Ausnahme eines Baumes von *Sorbus latifolia* keine der Bastard-Mehlbeeren genetische Variation besitzt, die nicht auch in einer der beiden Ausgangsarten zu finden ist. Hingegen sind die Haplotypen der nicht verwandten Arten *Sorbus intermedia* und *Sorbus pinnatifida* vollständig differenziert. Dies spricht dafür, dass mit dem verwendeten Markersset einerseits Arten vollständig differenzierbar sind, andererseits aber auch Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb eines Hybridkomplexes dargestellt werden können. Für die potenziellen Ausgangsarten des untersuchten Hybridkomplexes deutet sich eine starke Differenzierung bezüglich der „artypischen“ Haplotypen an. Dabei handelt es sich um den für *Sorbus aria* typischen Haplotyp S-9 und den *Sorbus torminalis* Haplotyp S-14. Bei *Sorbus torminalis* war dieser Haplotyp in Thüringen, aber auch in Mecklenburg-Vorpommern mit etwa 70% dominierend. Neben diesen beiden Haplotypen ist noch der Haplotyp S-22 häufig. Bei *Sorbus latifolia* ist dieser Haplotyp mit 58% dominierend, gefolgt von S-14 mit 37%, während der für *Sorbus aria* typische Haplotyp S-9 nicht beobachtet wird. Dies spricht dafür, dass *Sorbus latifolia* nur mit geringer Wahrscheinlichkeit aus einer Kreuzung zwischen *Sorbus aria* als Mutter und *Sorbus torminalis* als Vater hervorgegangen ist. Ähnlich verhält es sich bei *Sorbus multicrenata* und *Sorbus subcordata*. Neben diesen drei Arten gruppieren aber auch *Sorbus decipiens* und *Sorbus isenacensis* zusammen mit *Sorbus torminalis*, während nur drei Arten (*Sorbus parumlobata*, *Sorbus heilingensis* und *Sorbus acutisecta*) mit *Sorbus aria* gruppieren und hier eine größere genetische Ähnlichkeit zum potenziellen weiblichen Elter vermutet werden darf. Besonders ausgeprägt ist dies bei *Sorbus heilingensis*, während *Sorbus parumlobata* und *Sorbus acutisecta* neben dem Haplotypen S-9 auch den Haplotypen S-22 aufweisen, der bei *Sorbus aria* nur einmal beobachtet wurde. Tendenziell widersprechen diese Ergebnisse der gängigen Hypothese einer asymmetrischen Hybridisierung zwischen *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis*, bei der überwiegend *Sorbus aria* als Mutter auftreten soll (PRICE and RICHARD, 2007; ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001a). Hingegen zeigen cp-DNA-Analysen von CHESTER *et al.* (2007), dass Vertreter der *Sorbus-latifolia*-Gruppe ausschließlich von *Sorbus torminalis* als Samenelter abstammen. Dies legt den Schluss nahe, dass Arten aus der Gruppe der *Sorbus-latifolia*-Hybriden durch Kreuzungen in beide Richtungen entstehen können.

Neben den beiden Haplotypen S-9 und S-14 tritt auch S-22 häufig auf. Da der Haplotyp S-22 nur selten in den beiden potenziellen Ausgangsarten *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis* gefunden wurde, stellt sich die Frage nach der Beteiligung einer dritten Ursprungsart dieses untersuchten Hybridkomplexes. Hier ist möglicherweise eine Ausdehnung der Untersuchung auch auf weitere Arten vielversprechend, ebenso wie die Erweiterung des Markersets auf Kerngenmarker (ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001b), die es erlauben würden, auch den paternalen Beitrag in diesem Hybridkomplex zu untersuchen.

5.1 Apomixis

Die Untersuchung der Hypothese vorwiegender Apomixis bei Hybriden der *Latifolia*-Gruppe erfolgte mit Isoenzym-Phänotypen, indem identische Muster zwischen dem Samenelter und den betreffenden Samen als Hinweis auf asexuelle Reproduktion gewertet wurden. Mit lediglich 4% wurde der Anteil der Apomixis jedoch sehr gering eingeschätzt. Somit scheint *Sorbus heilingensis* entgegen den Erwartungen (s. a. ROBERTSON *et al.*, 2010) in sehr ausgeprägter Weise Nachkommen durch generative Reproduktion zu erzeugen. Dies scheint auch für andere *Sorbus*-Arten zu gelten. Diese Hypothese unterstützt der von BIEDENKOPF *et al.* (2007) ebenfalls auf der Basis von Isoenzym-Analysen durchgeführte genetische Vergleich von *Sorbus torminalis*-Altbäumen und ihren Nachkommenschaften.

Die Nutzung von Isoenzymen ohne Vererbungsanalyse und die nicht auszuschließende Polyploidie dieser Art machen es möglich, dass Artefakte die Auswertung beeinflussen haben können. Ein deutlicher Einfluss auf das vorliegende Ergebnis wäre dann zu erwarten, wenn identische Isoenzymgenotypen als unterschiedliche Isoenzymphenotypen interpretiert worden wären. Obwohl die untersuchten Proben keine Hinweise darauf gaben, könnte ein solches Ergebnis z.B. infolge gewebespezifischer Aktivität auftreten. Im Rahmen weiterer Analysen auch durch Verwendung kernkodierter Mikrosatelliten sollten daher die Untersuchungen zur Apomixis anhand von Eltern-Nachkommenschafts-Analysen fortgeführt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptziel der vorliegenden Studie bestand in der genetischen Charakterisierung von Hybriden der *Sorbus-latifolia*-Gruppe in Thüringen mit Hilfe von universellen cpDNA-Markern (ccmp). Untersucht wurden insgesamt 141 Proben von insgesamt 12 Arten bzw. Sippen, darunter auch die potenziellen Ausgangsarten *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis*. Neben den acht potenziellen und botanisch charakterisierten Hybriden (*Sorbus acutisecta*, *Sorbus decipiens*, *Sorbus heilingensis*, *Sorbus isenacensis*, *Sorbus latifolia*, *Sorbus multicrenata*, *Sorbus parumlobata*, *Sorbus subcordata*) wurden auch die Arten *Sorbus pinnatifida* und *Sorbus intermedia* einbezogen. Für eine der Sippen (*Sorbus heilingensis*) wurde geprüft, in welchem Umfang diese Art zur asexuellen Regeneration (Apomixis) neigt. Mit Isoenzym-Genmarkern wurden insgesamt 10 Samenbäume und 68 Nachkommen charakterisiert.

Insgesamt wurden bei der Untersuchung 10 verschiedene Haplotypen beobachtet. Zwei der Haplotypen S-9 und S-14 waren charakteristisch für *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis* mit Häufigkeiten von jeweils ca. 70%. Andere Haplotypen kamen bei den Ausgangsarten nur selten vor. Mit Ausnahme eines *Sorbus-latifolia*-Hybriden zeigten alle Bastard-Mehlbeeren ausschließlich Haplotypen, die auch bei den Ausgangsarten zu finden waren. Darüber hinaus wurde ein Haplotyp S-22 beobachtet, der in einzelnen Hybrid-Arten Häufigkeiten über 50% erreichte, in den Ausgangsarten jedoch nur selten vorkommt. Möglicherweise ist daher eine dritte *Sorbus*-Art an der Bildung dieses Hybridkomplexes beteiligt.

Die Verteilung der Haplotypen in der Gruppe der Hybriden deutet an, dass Hybridisierung in beide Richtungen möglich ist. Die nicht verwandten Arten *Sorbus pinnatifida* und *Sorbus intermedia* sind vollständig von den Sippen des endemischen *Sorbus-latifolia*-Komplexes getrennt. Ergänzende Isoenzym-Untersuchungen zur Apomixis bei *Sorbus heilingensis* zeigten, nur bei 4% der Nachkommen zum Samenbaum identische Muster. Dies deutet daraufhin, dass *Sorbus latifolia* in unerwartet hohem Ausmaß zu generativer Reproduktion befähigt ist.

7. Abstract

Title of the paper: *Insights into genetic variation patterns in the genus Sorbus in Thuringia.*

The main objective of the survey was the characterization of Hybrid-Species of the *Sorbus latifolia* aggr. with universal (ccmp) cpDNA markers. In total, 141 samples of 12 *Sorbus* species including the two ancestral species *Sorbus aria* and *Sorbus torminalis* were investigated. Beside eight botanically characterized Hybrid-Species (*Sorbus acutisepta*, *Sorbus decipiens*, *Sorbus heilingensis*, *Sorbus isenacensis*, *Sorbus latifolia*, *Sorbus multicrenata*, *Sorbus parumlobata*, *Sorbus subcordata*) the species *Sorbus pinnatifida* and *Sorbus intermedia* were analysed (see *Table 1* and *Figure 1*). Isozyme gene markers were applied to investigate apomictic regeneration in one species (*Sorbus heilingensis*) with overall 68 progenies of ten seed parents. The cpDNA analyses displayed 10 haplotypes (see *Table 2*). In *Table 3* the haplotype frequencies within the single species are shown. Two out of a total of 10 haplotypes (S-9 and S-14) were characteristic for the ancestral species *Sorbus aria* and *Sorbus torminalis*, respectively, with frequencies of about 70% each. Other haplotypes are rare in these two species. With the exception of one *Sorbus latifolia* tree all hybrids showed solely haplotypes of the two potential ancestral species. One of the rare haplotypes (S-22) of the ancestral species displayed frequencies higher than 50% in some of the hybrid species. Thus, a third unidentified ancestral species is possibly involved in the formation of this hybrid aggregate. The distribution of haplotypes within and between the single hybrid species indicates that hybridisation between *Sorbus aria* and *Sorbus torminalis* is possible in both directions. Each of the taxonomically distant species *Sorbus pinnatifida* and *Sorbus intermedia* showed unique haplotypes.

The investigations concerning apomictic regeneration in *Sorbus heilingensis* revealed unexpectedly high estimates of sexual regeneration of 96% since only 4% of the progenies showed identical patterns to their particular seed parents.

8. Literatur

- BIEDENKOPF, S., Ch. AMMER and G. MÜLLER-STARCK (2007): Genetic aspects of seed harvests for the artificial regeneration of the Wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz). *New Forests* **33**, 1–12.
- CHESTER, M., R. S. COWAN, M. F. FAY and T. C. G. RICH (2007): Parentage of endemic *Sorbus* L. (Rosaceae) species in the British Isles: evidence from plastid DNA. *Botanical Journal of the Linnean Society* **154**, 291–304.
- DEMASURE, B., N. SODZI and R. J. PETIT (1995): A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* **4**, 1, 129–131.
- DÜLL, R. (1961): Die *Sorbus*-Arten und ihre Bastarde in Bayern und Thüringen. *Ber. Bayer. Bot. Ges.* **34**, 11–65.
- FINK, M. (2006): Situation der breitblättrigen Mehlbeere in der Rhön. Diplomarbeit, Thür. Fachhochschule für Forstwirtschaft Schwarzburg.
- GREGORIUS, H.-R. (1974): Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica* **23**, 22–27.
- KUTZELNIGG, H. (1995): *Sorbus*. In: H. J. CONERT u.a. (Hrsg.): GUSTAV HEGI. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band 4 Teil 2B: Spermatophyta: Angiospermae: Dicotyledones 2 (3). Rosaceae 2. Blackwell 1995.
- LEINEMANN, L. (2000): Inheritance analysis of isozyme phenotypes in tetraploid species using single plant progenies. An example in black thorn (*Prunus spinosa* L.). *Forest Genetics* **7**, 3, 205–209.
- MEYER, N., L. MEIEROTT and H. SCHUWERK (2005): Beiträge zur Gattung *Sorbus* in Bayern. Sonderband der Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft, 216 S., ISSN 0373-7640.
- NELSON-JONES, E. B., D. BRIGGS and A. G. SMITH (2002): The origin of intermediate species of the genus *Sorbus*. *Theor Appl Genet* **105**, 953–963.
- ODDOU-MURATORIO, S., R. J. PETIT, B. LE GUERROUE, D. GUESNET and B. DEMASURE (2001a): Pollen-versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. *Evolution* **55**, 6, 1123–1135.
- ODDOU-MURATORIO, S., C. ALIGON, S. DECROCOQ, C. PLOMION, T. LAMANT and B. MUSH-DEMASURE (2001b): Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. *Molecular Ecology Notes* **1**, 297–299.
- PRICE, D. T. and T. C. G. RICH (2007): One-way introgressive hybridisation between *Sorbus aria* and *Sorbus torminalis* (Rosaceae) in southern Britain. *Watsonia* **26**: 419–432.
- REUTHER, R. (1995): Vorkommen und Verbreitung der thüringischen Sippen der Breitblättrigen Mehlbeere (*Sorbus latifolia*). – Schriftenr. Thüring. Landesanst. Umwelt **13**, 14–26.
- REUTHER, R. (1997): Eine neue *Sorbus* aus Thüringen. *Haussknechtia* **6**, 17–20.
- ROBERTSON, A., T. C. G. RICH, A. M. ALLEN, L. HOUSTON, C. ROBERTS, J. R. BRIDLE, S. A. HARRIS and S. J. HISCOCK (2010): Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Molecular Ecology* (2010) **19**, 1675–1690.
- SCHRÖTTER, H. (1992): Förderung der Elsbeere, eine waldbauliche Aufgabe in Mecklenburg-Vorpommern, *Der Wald*, Berlin, S. 386.
- SCHRÖTTER, H. (2001): Vogelkirsche, Spitzahorn und Elsbeere: Drei wertvolle Baumarten in Mecklenburg-Vorpommern im Abseits, *Forst und Holz*, Berlin, S. 188–196.
- SNEATH, P. H. A. and R. R. SOKAL (1973): *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco.
- WEISING, K. and R. C. GARDNER (1999): A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **42**, 9–19.
- WENDEL, J. F. and N. F. WEEDEN (1989): Visualization and interpretation of plant isozymes. P. 5–45. In: SOLTIS, D. E. and P. S. SOLTIS (eds.). *Isozymes in Plant Biology*. London: Chapman and Hall.