

Ploidie-Bestimmung baden-württembergischer Bastard-Mehlbeeren

Von STEFFEN HAMMEL, Erligheim, BERND HAYNOLD, Vellberg, THOMAS GREGOR und JURAJ PAULE, beide Frankfurt.

ZUSAMMENFASSUNG

Hybriden der *Sorbus latifolia*- und der *Sorbus hybrida*-Aggregate sind aus Südwestdeutschland (Baden-Württemberg, Main-Tauber-Gebiet, Ostalb) nachgewiesen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die relative DNA-Menge in somatischen Zellkernen von 19 Bastard-Mehlbeeren bestimmt, welche man den Ploidiestufen zuordnen konnte. Untersuchte *Sorbus*-Pflanzen erwiesen sich als tri- oder tetraploid.

Schlüsselwörter: *Sorbus*, Durchflusszytometrie, Ploidie, Apomixis.

ABSTRACT

Hybrids of *Sorbus latifolia* and *Sorbus hybrida* complexes have been reported from southwest Germany (Baden-Württemberg, Main-Tauber region, eastern Swabian Alb). The relative DNA content of somatic nuclei of 19 *Sorbus* plants was determined by flow cytometry and assigned to ploidy level. Studied samples were tri- or tetraploid.

Keywords: *Sorbus*, flow cytometry, ploidy, apomixis.

EINLEITUNG

Die in Baden-Württemberg vorkommenden *Sorbus domestica* L., *Sorbus torminalis* (L.) Crantz, *Sorbus aria* (L.) Crantz und *Sorbus aucuparia* L. sind diploide, sexuelle Arten (KAMM et al. 2009, LUDWIG et al. 2013) mit der für sexuelle Arten typischen morphologischen Schwankungsbreite (z. B. BRUS et al. 2011). Bei *Sorbus* entstehen aus Kreuzungen von diploiden Eltern sowohl diploide Pflanzen, deren Nachkommen morphologisch variabel sind (LEINEMANN et al. 2013, MEYER et al. 2014), wie auch polyploide Pflanzen, die durch Apomixis fixiert sind (PELLICER et al. 2012). Die Nachkommen derartiger Pflanzen sind morphologisch konstant und entsprechen der Mutterpflanze. Gelingt es diesen polyploiden Hybriden ein Areal aufzubauen, so werden sie als (Klein)Arten (microspecies) beschrieben.

Aus Baden-Württemberg sind bisher nur wenige Mehlbeeren bekannt, die aus Hybridisierung hervorgegangen sind und als apomiktisch fixiert anzusehen sind.

Aus dem *Sorbus latifolia*-Aggregat (*S. torminalis* x *S. aria* s.l.) beschrieb DÜLL (1961) *Sorbus badensis* Düll. Es dauerte über 50 Jahre, bis mit *Sorbus meyeri* S. Hammel & Haynold und *Sorbus seiboldiana* S. Hammel & Haynold weitere Arten folgten (HAMMEL & HAYNOLD 2014, 2015a). L. MEIEROTT beschrieb bereits 2005 *Sorbus herbipolitana* Meierott aus Bayern (MEYER et al. 2005: 183–186). Nachweise für Baden-Württemberg gibt es für diese Art im Herbarium Erlangense (ER) von K. GAUKLER (17.06.1963, Stammberg, Tauberbischofsheim, det. N. MEYER) und im Herbarium HAMMEL (31.05.2014, Hirschberg, Werbach-Werbachhausen,

leg. et det. S. HAMMEL). Das von MEYER et al. (2005: 186) genannte Vorkommen vom Apfelberg bei Werbach-Gamburg hat sich nach Mitteilung von N. MEYER als irrtümlich erwiesen.

Hybriden zwischen *S. aucuparia* und *S. aria* werden vor allem auf der Schwäbischen Alb und am Ostrand des Schwarzwaldes hin und wieder aufgefunden. Hier dürfte es sich überwiegend um diploide Spontanhybriden handeln. Allerdings kommen auch in Baden-Württemberg fixierte Sippen aus dem *Sorbus hybrida*-Aggregat vor. Im Lonetal südlich Herbrechtingen findet sich die im vorliegenden Band neu beschriebene *Sorbus lonetalensis* S. Hammel & Haynold (SEYBOLD 1992: 204–205; HAMMEL & HAYNOLD 2015b).

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um die optischen Eigenschaften einzelner Teilchen zu erfassen. Bei der Ploidiebestimmung sind die untersuchten Partikel die Zellkerne, die mit einer DNA-spezifischen, fluoreszierenden Sonde markiert sind. Die Untersuchung erfolgt bei der Bewegung der einzelnen Zellkerne in einem Flüssigkeitsstrom, in dem sie mit einem Lichtstrahl konstanter Wellenlänge bestrahlt werden und dabei eine Fluoreszenz emittieren. Die Fluoreszenzintensität korrespondiert mit dem DNA-Gehalt des Zellkernes und kann nach einer Kalibrierung als Ploidiestufe interpretiert werden (DOLEŽEL, GREILHUBER & SUDA 2007).

Ziel dieser Arbeit war die Prüfung der Ploidie der in Baden-Württemberg vorkommenden *Sorbus*-Arten. Daraus lassen sich Schlüsse ableiten, ob morphologisch als Hybride angesprochene Pflanzen zu polyploiden apomiktischen (Klein) Arten gehören oder ob es sich um diploide sexuelle Spontanhybriden handelt.

MATERIAL UND METHODEN

Die DNA-Ploidiestufen wurden aus frischen Blattstielen mittels Durchflusszytometrie mit dem Partec CyFlow Space (Münster) mit einer UV-LED Lichtquelle (365 nm) bestimmt. Blätter inklusive der Blattstiele wurden in verschließbaren Plastikbeuteln gesammelt und bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Ein Zeitraum von wenigen Tagen zwischen der Ernte der Blätter und der durchflusszytometrischen Messung machte sich nicht negativ bei der Messung bemerkbar. Die Proben wurden in zwei Schritten nach dem Otto-Protokoll bearbeitet (zusammengefasst in DOLEŽEL, GREILHUBER & SUDA 2007), gemeinsam mit einem internen Standard (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Polanka: DOLEŽEL, DOLEŽELOVÁ & NOVÁK (1994) oder *Lycopersicon esculentum* Mill cv. Stupické polní tyčkové rané: DOLEŽEL, SGOBATI & LUCRETTI (1992)). Nach dem Zerkleinern des Materials in Otto-I-Puffer und Färbung in Otto-II-Puffer (enthaltend 4',6-Diamidin-2-phenylindol [DAPI]) wurde die Fluoreszenz-Intensität von 3.000 Zellkernen aufgezeichnet. Die Probe/Standard-Verhältnisse wurden aus den mittleren Werten der Proben- und Standard-Fluoreszenzhistogramme berechnet. Nur Histogramme mit Variationskoeffizienten von G_0/G_1 -Peak der analysierten Probe $< 5,0$ % wurden berücksichtigt.

Die Probe/Standard-Verhältnisse, basierend auf internem Standard *L. esculentum*, wurden mit denen von *G. max* durch Multiplikation der Werte mit einem Koeffizienten von 0,805 korrigiert. Dieser Koeffizient wurde von neun Wiederho-

lungsmessungen aus den beiden Standards abgeleitet. Bisher wurden folgende Pflanzen untersucht:

1. *Sorbus badensis*, Main-Tauber-Kreis, Werbach-Gamburg, Apfelberg, verwachsene Schafweide, 19.06.2014 (Nähe locus classicus), TK 6323/2, R-H ca. 3544050/5504880
2. *Sorbus graeca* s.l., Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Halbtrockenrasen, 19.06.2014, TK 6324/1, R-H 3549190/5504485
3. *Sorbus seyboldiana*, Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Halbtrockenrasen, 19.06.2014, TK 6324/1, R-H 3549220/5504565
4. *Sorbus seyboldiana*, Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Halbtrockenrasen, 19.06.2014, TK 6324/1, R-H 3549270/5504460
5. *Sorbus seyboldiana*, Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Halbtrockenrasen (Typus), 19.06.2014, TK 6324/1, R-H 3549280/5504460
6. *Sorbus seyboldiana*, Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Waldrand, 19.06.2014, TK 6324/1, R-H 3549386/5504423
7. *Sorbus seyboldiana*, Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Appenrod, Waldrand (Wegesrand), 19.06.2014, TK 6324/1, R-H 3548530/5504175
8. *Sorbus seyboldiana*, Main-Tauber-Kreis, Werbach, Hühberg, Waldsaum, 19.06.2014, TK 6323/2, R-H 3547895/5503510
9. *Sorbus meyeri*, Main-Tauber-Kreis, Kilsheim, Läger, Waldrand (Typus), 19.06.2014, TK 6323/1, R-H 3537300/5502750
10. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Werbach-Gamburg, Kahlberg, Waldrand, 09.08.2014, TK 6323/2, R-H 3544540/5504630
11. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Tauberbischofsheim-Hochhausen, Höhefelden, Waldrand, 09.08.2014, TK 6323/2, R-H 3545060/5503920
12. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Tauberbischofsheim-Hochhausen, Kaltes Bild, Gebüsch, 09.08.2014, TK 6323/2, R-H 3544530/5504175 (Abb. 1)
13. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Tauberbischofsheim-Hochhausen, Orbisdell, Wald, 09.08.2014, TK 6323/2, R-H 3544530/5503925
14. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Tauberbischofsheim-Hochhausen, Kahlberg, Waldrand, 09.08.2014, TK 6323/2, R-H 3544600/5504720
15. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Halbtrockenrasen, 10.09.2014, TK 6324/1, R-H 3549335/5504415 (Abb. 2)
16. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Werbach-Werbachhausen, Leitenberg, Halbtrockenrasen, 10.09.2014, TK 6324/1, R-H 3549220/5504480
17. *Sorbus latifolia*-agg., Main-Tauber-Kreis, Kilsheim, Hoher Herrgott, Waldrand, 10.09.2014, TK 6323/1, R-H 3537340/5505890
18. *Sorbus koksensis* ined. (*Sorbus latifolia*-agg.), Main-Tauber-Kreis, Kilsheim, Koks, Waldsaum, 10.09.2014, TK 6323/1, R-H 3537270/5505815
19. *Sorbus lonetalensis*, Landkreis Heidenheim, Herbrechtingen-Bissingen ob Lonetal, Gemeindle, Waldweg (Typus), 09.09.2014, TK 7427/1, R-H 3586358/5380085

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Variationskoeffizienten der G_0/G_1 Histogramme der 19 untersuchten Proben reichten von 1,29 bis 4,18 (Mittelwert = 2,80). Die Untersuchungen ergaben zwei Proben/Standard-Fluoreszenz-Verhältnisse mit den Mittelwerten 0,81 ($\pm 0,01$) und 1,05 ($\pm 0,02$). Nach PELLICER et al. (2012) sind die Genomgrößen innerhalb der Gattung *Sorbus* relativ konstant und auch innerhalb verschiedener Linien konserviert. Weiterhin wurde bereits das Proben/Standard-Fluoreszenz-Verhältnis von 0,52 mit einer diploiden Chromosomenzahl korreliert (MEYER et al. 2014). Deswegen entsprechen die hier gemessenen DNA-Ploidiestufen (SUDA et al. 2006) dem triploiden (3x) und dem tetraploiden (4x) Chromosomensatz (Tab. 1).

Tab. 1: DNA-Ploidie der untersuchten Pflanzen.

Probennummer	Taxon	Probe/Standard Verhältnis	DNA-Ploidie
1	<i>Sorbus badensis</i>	0,82	3x
2	<i>Sorbus graeca</i> s.l.	1,01	4x
3	<i>Sorbus seyboldiana</i>	0,82	3x
4	<i>Sorbus seyboldiana</i>	0,81	3x
5	<i>Sorbus seyboldiana</i>	0,82	3x
6	<i>Sorbus seyboldiana</i>	0,82	3x
7	<i>Sorbus seyboldiana</i>	0,81	3x
8	<i>Sorbus seyboldiana</i>	0,80	3x
9	<i>Sorbus meyeri</i>	0,82	3x
10	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,80	3x
11	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,82	3x
12	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	1,04	4x
13	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,81	3x
14	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,80	3x
15	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,82	3x
16	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,83	3x
17	<i>Sorbus latifolia</i> -agg.	0,81	3x
18	<i>Sorbus koksensis</i> ined.	0,80	3x
19	<i>Sorbus lonetalensis</i>	1,03	4x

Alle 19 Proben erwiesen sich als polyploid. Die als *Sorbus graeca* (Lodd. ex Spach) Kotschy angesprochene Mehlbeere (Nr. 2), wohl nicht mit dem Typus identisch, eine großblättrige *S. latifolia*-agg. (Nr. 12), für die noch eine Neubeschreibung aussteht, sowie *S. lonetalensis* (Nr. 19) wurden als tetraploid bestimmt. Alle anderen untersuchten Pflanzen erwiesen sich als triploid.

Sorbus ×decipiens (Bechst.) Petz. & G. Kirchn., die diploide Hybride zwischen *Sorbus aria* und *Sorbus torminalis*, ist im Main-Tauber-Gebiet offenbar selten oder fehlt sogar völlig. Dies steht im Einklang mit dem Fehlen von diploider *S. aria* in diesem Bereich, die hier durch *S. graeca* s.l. ersetzt wird (BETTINGER 2013: 746).

Auf der Schwäbischen Alb und am Schwarzwaldrand kommt dagegen die diploide *S. aria* vor. Dementsprechend ist auch zu erwarten, dass die hier gelegentlich zu findenden Hybriden des *S. latifolia*-agg. in der Regel sexuell sind und daher zu *Sorbus ×decipiens* gehören. Ploidie-Bestimmungen dazu stehen noch aus.

Diese ersten Untersuchungen zur Ploidie baden-württembergischer Mehlbeeren zeigen, dass vor allem im Main-Tauber-Gebiet (vgl. z.B. Nr. 10 bis 18) weitere apomiktische Polyploide zu erwarten sind.

LITERATUR

- BETTINGER, A., BUTTLER, K.-P., CASPARI, S., KLOTZ, J., MAY, R. & D. METZING (2013): Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands; 912 S. – Bonn-Bad Godesberg.
- BRUS, R., BALLIAN, D., BOGUNIĆ, F., BOBINAC, M. & M. IDŽOJIĆ (2011): Leaflet morphometric variation of service tree (*Sorbus domestica* L.) in the Balkan Peninsula. – *Plant Biosyst.*, **145**: 278–285.
- DOLEŽEL, J., SGORBATI, S. & S. LUCRETTI (1992): Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. – *Physiol Plantarum*, **85**: 625–631.
- DOLEŽEL, J., DOLEŽELOVÁ, M. & F.J. NOVÁK (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). – *Biol Plantarum*, **36**: 351–357.
- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J. & J. SUDA (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nat. Protocols*, **2**: 2233–2244.
- DÜLL, R. (1961): Die *Sorbus*-Arten und ihre Bastarde in Bayern und Thüringen. – *Ber. Bayer. Bot. Ges.*, **34**: 11–65.
- HAMMEL, S. & B. HAYNOLD (2014): *Sorbus meyeri* – eine neue Art aus der *Sorbus-latifolia*-Gruppe. – *Kochia*, **8**: 1–13.
- HAMMEL, S. & B. HAYNOLD (2015a): *Sorbus seyboldiana* – eine neue Mehlbeere aus Baden-Württemberg und Bayern. – *Jh. Ges. Naturkde. Württemberg*, **171**: 51–67.
- HAMMEL, S. & B. HAYNOLD (2015b): *Sorbus lonetalensis* – eine neue Mehlbeere aus Baden-Württemberg. – *Jh. Ges. Naturkde. Württemberg*, **171**: 77–94.
- KAMM, U., ROTACH, P., GUGERLI, F., SIROKY, M., EDWARDS, P. & R. HOLDEGGER (2009): Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. – *Heredity*, **103**: 476–482.
- LUDWIG, S., ROBERTSON, A., RICH, T. C. G., DJORDJEVIĆ, M., CEROWIĆ, R., HOUSTON, L., HARRIS, S. A. & S. J. HISCOCK (2013): Breeding systems, hybridization and continuing evolution in Avon Gorge *Sorbus*. – *Ann Bot (Oxford)*, **111**: 563–575.
- LEINEMANN, L., HOSIUS, B., KAHLERT, K., KUCHMA, O., CZERNIKARZ, H., ARENHÖVEL, W. & K. HELMECKE (2013): Genmarkeranalysen zur Hybridbildung und natürlichen Vermehrung bei *Sorbus latifolia* agg. in Thüringen. – *Allg. Forst- u. Jagdzeitung*, **184**: 204–214.

MEYER, N., MEIEROTT, L., SCHUWERK, H. & O. ANGERER (2005): Beiträge zur Gattung *Sorbus* in Bayern. – Ber. Bayer. Bot. Ges. (Sonderband); München.

MEYER, N., GREGOR, T., MEIEROTT, L. & J. PAULE (2014): Diploidy suggests hybrid origin and sexuality in *Sorbus* subgen. *Tormaria* from Thuringia, Central Germany. – *Plant. Syst. Evol.*, **300**: 2169–2175.

PELLICER, J., CLERMONT, S., HOUSTON, L., RICH, T. C. G. & M. F. FAY (2012): Cytotype diversity in the *Sorbus* complex (Rosaceae) in Britain: sorting out the puzzle. – *Annals of Botany*, **110**: 1185–1193.

SEYBOLD, S. (1992): *Sorbus* L. (1753). – In: SEBALD, O., SEYBOLD, S. & G. PHILIPPI (ed.): Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs, Bd. 3: 196–206. – Stuttgart.

SUDA, J., KRAHULCOVÁ, A., TRÁVNÍČEK, P. & F. KRAHULEC (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – *Taxon*, **55**(2): 447–450.

Anschrift der Autoren:

STEFFEN HAMMEL
Rathausstraße 44
74391 Erligheim
Email: Hammel-Erligheim@t-online.de

BERND HAYNOLD
Bahnhofstraße 12
74541 Vellberg-Großaltdorf
Email: haynold@t-online.de

DR. THOMAS GREGOR
Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum
Abteilung Botanik und molekulare Evolutionsforschung
Senckenberganlage 25
60325 Frankfurt a.M.
Email: thomas.gregor@senckenberg.de

DR. JURAJ PAULE
Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum
Abteilung Botanik und molekulare Evolutionsforschung
Senckenberganlage 25
60325 Frankfurt a.M.
Email: juraj.paule@senckenberg.de



Abb. 1: Kurztrieb eines tetraploiden Baumes aus dem *Sorbus latifolia*-Aggregat vom Kalten Bild bei Tauberbischofsheim-Hochhausen (Tab. 1, Nr. 12); Foto: S. HAMMEL.



Abb. 2: Triploide Pflanze des *Sorbus latifolia*-Aggregats am Leitenberg bei Werbach-Werbachhausen (Tab. 1, Nr. 15), 10.09.2014; Foto: S. HAMMEL.