



FBVA-BERICHTE 105/1998

**Forstliche Bundesversuchsanstalt Wien
Waldforschungszentrum**

**Molekulargenetische Unterscheidung
und Identifizierung von Schwarz-
pappeln und Hybridpappelklonen**

*Molecular Genetic Differentiation
and Identification of Black Poplars
and Hybrid Poplar Clones*

B. HEINZE

FDK 165.41:176.1:(436)



Das Lebensministerium

Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft

Empfohlene Zitierung:

Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridpappelklonen / B. Heinze. FBVA-Berichte; Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien, 1998, Nr. 105, 44 S.

ISSN 1013-0713

Copyright 1998 by
Forstliche Bundesversuchsanstalt

Für den Inhalt verantwortlich :
Direktor HR Dipl. Ing. Friedrich Ruhm

Herstellung und Druck :
Forstliche Bundesversuchsanstalt
Waldforschungszentrum
Seckendorff-Gudent Weg 8
A-1131 Wien

Anschrift für Tauschverkehr :
Forstliche Bundesversuchsanstalt
Bibliothek
Seckendorff-Gudent Weg 8
A-1131 Wien

Tel. + 43-1-878 38 216
Fax. + 43-1-877 59 07

Nachdruck mit Quellenangabe gestattet

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	5
Abstract.....	5
1 Hybridpappel-Züchtung und Erhaltung der Schwarzpappel	5
2 Übersicht über molekulargenetische Untersuchungsmethoden	7
2.1 Biochemische Marker	8
2.2 Isoenzyme	8
2.3 DNA-Methoden - Analysenprinzipien	10
2.4 Chloroplasten- und Mitochondrien-Analysen in der Gattung <i>Populus</i>	11
2.5 Genomische DNA-Marker.....	12
2.6 Zytologie	14
2.7 Auswahl von Verfahren für die Untersuchungen des Projektes.....	14
3 Introgression Schwarzpappel - Hybridpappel	15
3.1 Chloroplasten-DNA als Unterscheidungsmerkmal der Pappelarten	15
3.1.1 Material und Methoden	15
3.1.2 Ergebnisse.....	18
3.1.3 Diskussion	20
3.2 Chromosomale DNA	22
3.2.1 PCR-Primer und Untersuchungsmaterial.....	22
3.2.2 Ergebnisse.....	24
3.2.3 Diskussion	28
3.3 Reihenuntersuchungen zur Introgression	28
3.3.1 Untersuchte Klone und DNA-Marker.....	28
3.3.2 Ergebnisse.....	32
3.3.3 Diskussion	33
4 Klonunterscheidung und Identifizierung von Hybridpappeln	35
4.1 Einleitung	35
4.2 Material und Methoden	35
4.3 Ergebnisse	37
4.4 Diskussion	38
5 Zusammenfassung	39
6 Summary	40
Danksagung	40
7 Literaturverzeichnis	41

Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridpappelklonen

B. HEINZE

Institut für Forstgenetik, Forstliche Bundesversuchsanstalt Wien

Kurzfassung. Molekulargenetische Methoden sind zur Untersuchung der großen Formenvielfalt der Hybridpappeln und der schleichenden Einkreuzung von Hybridpappeln und damit möglichen Gefährdung der Schwarzpappel geeignet. Bisher verwendete Verfahren werden dargestellt und Entwicklungsarbeiten von Chloroplasten- und Zellkern-DNA-PCR-Markern beschrieben. Es konnten Unterschiede im Chloroplasten-Genom und in drei Zellkern-Genen gefunden werden, die eine Zuordnung der Pflanzen und Gene zu den verschiedenen Pappelarten erlaubten. In Schwarzpappel-Beständen und -Verjüngungen wurden Hybridpappel-beeinflußte Pflanzen mit einem Anteil bis ca. 10 % gefunden. Samen von Hybridpappeln sind durchaus keimfähig, und Pflanzen können bis zum Baumalter präsent sein. Die PCR-Tests wurden auch zur Zusammenfassung der zahlreichen Hybridpappel-Sorten in kleine Gruppen ähnlicher Klone verwendet. Verfahren zur Unterscheidung innerhalb dieser Gruppen wurden angewendet. Diese Testmethoden können in der Kontrolle des Pflanzen-Handels eingesetzt werden.

Schlüsselworte: Schwarzpappel, Hybridpappel, *Populus nigra*, *Populus x euramericana*, Generhaltung, Sorten-unterscheidung, molekulargenetische Marker

Abstract. [Molecular Genetic Differentiation and Identification of Black Poplars and Hybrid Poplar Clones] Molecular genetic methods assist in investigating into the wide variety of hybrid poplar clones as well as into the possible introgression of hybrids with black poplars. Based on a thorough review of described methods, experiments for the development of chloroplast and nuclear DNA PCR markers are described. Genetic differences between the poplar species regarding these markers were identified and applied. Black poplar regeneration sites and stands contained up to approximately 10 % of hybrid-influenced plants. Seed from hybrid poplars is often fertile, and plants may be present up to maturity. The PCR tests were also utilized in classification of the many hybrid poplar clones into small groups. Approaches for the fine-scale differentiation of clones are described. These methods can serve in the control of plant trade according to legal regulations.

Keywords: black poplar, hybrid poplar, *Populus nigra*, *Populus x euramericana*, gene conservation, variety distinction, molecular genetic markers

1 Hybridpappel-Züchtung und Erhaltung der Schwarzpappel

Die wichtigsten, forstlich leistungsfähigen Hybridpappelsorten stellen Kreuzungen der ersten Generation zwischen der einheimischen Schwarzpappel (*Populus nigra* L.) und amerikanischen Pappeln (wie *P. deltoides* Marsh., amerikanische Schwarzpappel, oder *P. trichocarpa* Torr & Gray, westliche Balsampappel) oder asiatischen Arten (z.B. *P. maximowiczii* Henry, ostasiatische Balsampappel) dar (MÜLLER & SAUER 1957-1961, GÜNZL 1982, STETTLER ET AL. 1996, PINON & VALADON 1997, RASCHKA 1997). Diese Pappelsorten können aber nicht immer über Jahrzehnte hinweg verwendet werden, da ihre Krankheitsresistenzen im Lauf der

Zeit durch die sich schnell weiterentwickelnden Populationen der Schädlinge und Krankheitserreger gebrochen werden (PINON & VALADON 1997). Deshalb ist es notwendig, ständig neue Sorten mit verbesserten Eigenschaften zu züchten. Hier ist die genetische Vielfalt der Schwarzpappel als Lieferant wichtiger Eigenschaften und Gene unverzichtbar. Die Art sollte deshalb mit möglichst großer genetischer Vielfalt erhalten werden. Da die heimischen Schwarzpappeln überdies zentrale Elemente der flußnahen Auwälder darstellen, ohne die dieses Ökosystem nicht denkbar wäre, liegt ihre Erhaltung auch im Interesse des Naturschutzes (WWF ÖSTERREICH & NÖ. LANDSCHAFTSFOND 1998). Über Arbeiten zur Art- und Generhaltung wird in einem parallel erscheinenden Band berichtet (HEINZE 1998c).

Um die Art erhalten zu können, muß sie zuallererst eindeutig von verwandten Arten unterschieden werden können. Hier beginnen die Schwierigkeiten: wie schon der Name sagt, unterscheidet sich etwa die amerikanische Schwarzpappel (*P. deltoides*) äußerlich nur in wenigen botanischen Details von der europäischen (*P. nigra*). Die am weitesten verbreiteten Hybridpappelsorten stellen nun Kreuzungen zwischen diesen beiden Arten dar, wobei *P. deltoides* als Mutter und *P. nigra* als Pollenspender fungiert (in der anderen Richtung sind Kreuzungsversuche bisher gescheitert). Diese Kreuzungsprodukte werden unter dem Sammelnamen *P. x euramericana* (Dode) Guinier geführt. Da Nachkommen Merkmale beider Elternteile erben, sind sie, zumindest für den Laien, noch etwas schwerer von den Elternarten zu unterscheiden. Rechnet man nun noch mit der Möglichkeit, daß sich solche gepflanzten Hybridpappeln mit einheimischen Schwarzpappeln durch natürlichen Pollenflug kreuzen, kann man sich vorstellen, daß die entstehenden Nachkommen nur mehr schwer eindeutig einer Gruppe zugeordnet werden können, da in den meisten Merkmalen fließende Übergänge entstehen.

Für diese schwierige Artunterscheidung können molekulargenetische Marker herangezogen werden. Die einzelnen Gene, die die Hybrid-Nachkommen von ihren Elternarten geerbt haben, bleiben in den Pflanzenzellen unverändert nebeneinander bestehen. Ihre Weitergabe im Lauf der Generationen ist durch die Mendelschen Vererbungsregeln voraussagbar. Genetische Marker im Sinne dieser Ausführungen können zwar auch rein äußerliche Merkmale sein, im speziellen versteht man darunter aber biochemische Verfahren (HEINZE 1994b). Damit können die Genvarianten aufgrund der Stoffwechselvorgänge, die sie bewirken (Isoenzyme, Stoffwechselprodukte), oder aber aufgrund der zugrundeliegenden Variation in der Erbsubstanz selbst, der DNA, unterschieden werden. Für dieses Projekt wurden DNA-Analysen gewählt, auch um diese relativ neuen Verfahren für eine Modellbaumart exemplarisch anzuwenden. Kapitel 2 beschreibt, welche Verfahren in der Literatur zu finden sind, und ihre jeweiligen Vor- und Nachteile. Die Anpassung dieser Methoden für die Untersuchungen dieses Projektes wird in Kapitel 3 wiedergegeben. Die genetischen

Marker, die die Elternarten kennzeichnen, wurden zur eindeutigen Bestimmung von einheimischen Schwarzpappeln verwendet. Die Katalogisierung solcher Schwarzpappeln in Österreich zum Zweck der Generhaltung und die Anlage einer Schwarzpappel-Klonsammlung werden in einem separaten Band beschrieben (HEINZE 1998c). Es wurde jedoch auch untersucht, inwieweit die einheimischen Schwarzpappeln mit den Hybridpappeln in genetischem Kontakt stehen oder ob es doch genetische Barrieren gibt, die die völlige Vermischung der Arten verzögern. Dazu waren größere Analysenserien mit einheimischen Schwarzpappeln und deren Nachkommen notwendig, um eventuell Einkreuzung (Introgression) aufzuzeigen. Auch diese Arbeiten finden sich in Kapitel 3.

Ein weiterer Ansatzpunkt des vorliegenden Projektes war es, mithilfe der molekulargenetischen Verfahren Klarheit und Übersicht in die Vielfalt der Hybridpappelsorten zu bringen. Im Lauf der Jahrzehnte seit dem zweiten Weltkrieg sammelte sich in den österreichischen Baumschulen und Forstbetrieben eine verwirrende Vielzahl solcher Sorten an; derzeit werden im Versuchsgarten Tulln der FBVA ca. 130 Sorten für Identifizierungszwecke bei der Anerkennung von Vermehrungsgut bereitgehalten. Die meisten dieser Sorten stellen jeweils einen Klon dar: von einem einzigen Sämling ausgehend, wurden sie immer nur durch Steckholz vermehrt (der von manchen verwendete Ausdruck „Mehrklonsorte“ bezeichnet eine Gruppe einander ähnlicher Klone). Alle Pflanzen desselben Klons besitzen daher idente Erbanlagen. Manche dieser Sorten sind eng miteinander verwandt, da sie teilweise auf identische Elternsorten zurückgeführt werden können. Die Unterscheidung der vielen Sorten in der Baumschule, aber auch im Bestand, fällt selbst Fachleuten schwer. Durch die Analyse einer Reihe von genetischen Markern kann man sortentypische „genetische Fingerabdrücke“ erstellen und damit einzelne Pflanzen bestimmten Klonen zuzuordnen versuchen. Dieselben Marker, die zur Untersuchung der Introgression verwendet wurden, konnten auch die Hybridpappel-Sorten in unterschiedliche Gruppen teilen, innerhalb derer dann die genetischen Fingerabdrücke für die Klonunterscheidung dienten. Diese Arbeiten sind in Kapitel 4 beschrieben.

2 Übersicht über molekulargenetische Untersuchungsmethoden für die Pappelarten

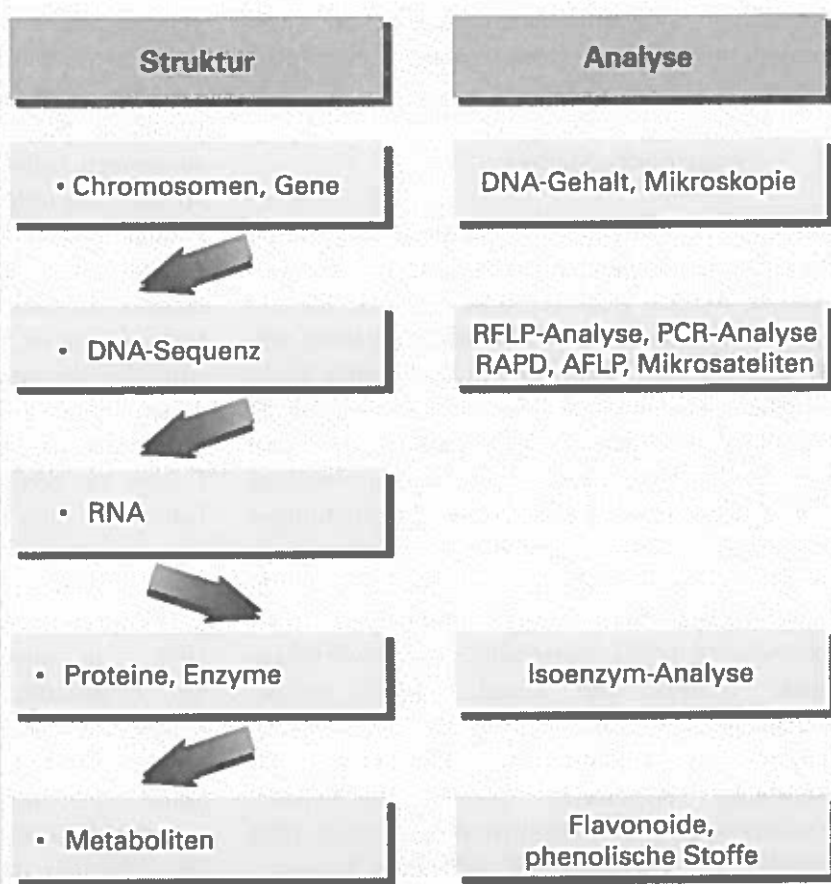
Genetische Marker erlauben es, eine Reihe von Genen einer Pflanzenart direkt zu studieren und Aussagen über die Verteilung genetischer Varianten zu treffen. Bei genetischen Markern handelt es sich um erbliche, biochemische und molekulargenetische Merkmale, die im Labor analysiert werden können. Einen Überblick über molekulare Marker zur Generhaltung geben KARP ET AL. (1997); eine detailliertere Behandlung geben WESTMANN & KRESOVICH (1997). Im folgenden werden solche Labortests beschrieben, die einerseits zur Unterscheidung der einheimischen Schwarzpappel (*Populus nigra* L.) von anderen Pappelarten angewendet werden, andererseits auch solche, mit denen die genetische Vielfalt innerhalb einer Pappelart untersucht werden kann, sowie weiters Methoden, die zur Unterscheidung von einzelnen eng verwandten Klonen geeignet sind. Dabei wird der Begriff „molekulare Marker“ für DNA, RNA und Proteine, „biochemische Marker“ für andere Stoffwechselprodukte verwendet.

Gene und deren Varianten, die Allele, sind in den Chromosomen im Zellkern (chromosomale DNA) lokalisiert. Sie dirigieren die Produktion von RNA und Proteinen (Eiweißstoffen) in den Zellen, die ihrerseits wieder äußerliche Merkmale eines Lebewesens bestimmen (Abb. 2-1). Einen exzellenten Überblick über das derzeitige Verständnis der einzelnen Komponenten des Pflanzengenoms geben FLAVELL & MOORE (1996). Außer den Chromosomen enthalten die Chloroplasten und Mitochondrien der Pflanzenzellen auch etwas eigene DNA. Gene bestehen aus aneinandergereihten Abfolgen von durchschnittlich einigen Tausenden DNA-Bausteinen, den Nukleotiden. Es gibt vier verschiedene Nukleotide (meist mit A, G, T, C abgekürzt).

„Kodierende“ und steuernde DNA-Abschnitte bilden zusammen ein Gen. In den „kodierenden“ Abschnitten bilden jeweils drei hintereinander gereihete Nukleotide ein „Codon“, welches einer der 20 Aminosäuren (Bausteine der Proteine) entspricht. Die Abfolge der Codons bestimmt somit die Abfolge der Aminosäuren im Protein. In dieser Weise ist der Aufbau der Eiweißstoffe der Zelle, die den Stoffwechsel und das Wachstum quasi wie ein „Maschinenpark“ steuern, in der Abfolge der DNA-Nukleotide festgelegt.

Andere Abschnitte der Gene steuern Ort, Zeitpunkt und Stärke der Aktivität des betreffenden Genes, also der Produktion von Proteinen. Allele - die unterschiedlichen Varianten eines Genes - unterscheiden sich durch kleine Änderungen in der Abfolge der DNA-Nukleotide, die manchmal auch eine Änderung der Aminosäuren-Abfolge in den Proteinen bewirken. Es gibt 64 Kombinationsmöglichkeiten der DNA-Nukleotide, 4 Nukleotide hoch 3 im jeweiligen Codon, jedoch nur 20 verschiedene Aminosäuren, sodaß mehrere verschiedene Codons dieselbe Aminosäure kodieren.

Abbildung 2-1:
Steuerung von Wachstum und Stoffwechsel durch die DNA, und Möglichkeiten zur Analyse von Variation.



Das heißt, daß nicht alle Änderungen in der Nukleotidabfolge sich auf die Aminosäureabfolge im Protein auswirken. Der Austausch von Aminosäuren in Proteinen kann sich einerseits auf die physiologischen Eigenschaften - die Stoffwechselfunktionen - oder vielleicht nur auf die Wanderungsgeschwindigkeit bei der elektrophoretischen Analyse auswirken. Andererseits kann die Variation aber auch nur in der DNA auftreten und keinen Einfluß auf die Proteine haben.

Um festzustellen, welche genetischen Varianten in den einzelnen Pflanzen-Individuen vorhanden sind, kann man prinzipiell die Stoffwechselprodukte der Proteine eines bestimmten Genes, die Proteine selbst, die chromosomale DNA oder die Chromosomen untersuchen (Abb. 2-1). Beispiele dafür werden im folgenden diskutiert.

Die Vererbung der chromosomalen DNA erfolgt nach den bekannten Mendelschen Regeln. Deshalb finden sich in Hybriden der ersten Generation, mit denen man es in der Gattung *Populus* oft zu tun hat, Gene beider Elternarten im gleichen Verhältnis (biparentale Vererbung). In nachfolgenden Generationen jedoch spalten diese Gene auf. Im Gegensatz dazu werden die Chloroplasten und Mitochondrien mitsamt den in ihnen vorhandenen Erbinformationen bei den meisten bedecktsamigen Blütenpflanzen von der Mutterpflanze allein auf die Nachkommen weitergegeben (uniparentale Vererbung).

2.1 Biochemische Marker

BÖRITZ (1962) untersuchte Preßsaft aus Pappelblättern auf großen Papierchromatogrammen. Bei dieser Methode werden gefärbte Stoffe aus den Blättern (Phenole, Flavonoide usw.) nach ihrer relativen Affinität zum Fließmittel aufgetrennt. Es konnten so die einzelnen Sektionen und Arten der Gattung *Populus* unterschieden werden. Die Trennschärfe reichte aber nicht zur Differenzierung zwischen den einzelnen *P. x euramericana* Klonen. Seine Beschreibungen beinhalteten semi-quantitative Komponenten („mehr“, „weniger“, „stärker“, ...), wodurch sie für Introgressionsstudien weniger brauchbar sind. ECKENWALDER (1982) verwendete eine zweidimensionale Technik und konnte mittels solcher Chromatogramme den Beitrag von *P. nigra* zu Pflanzen in Nordamerika, die durch freie Bestäubung entstanden waren, nachweisen. MALVOLI ET AL. (1991) konnten in einer Studie über kontrollierte Kreuzungen - *P. deltoides* x *P. nigra* -

ebenfalls mit zweidimensionalen Chromatogrammen Arten und Gruppen von Hybriden, nicht jedoch Klone, unterscheiden. GREENAWAY ET AL. (z.B. 1991) haben solche Komponenten mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie analysiert und berichten über Hybrid-Identifizierung.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Analyse von Blatt- und Knospenextrakten die Unterscheidung reiner Arten und manchmal die Zuordnung von Hybriden erlaubt. Variation konnte innerhalb der Arten, zwischen Klonen der einzelnen Arten, und fallweise zwischen Hybridklonen mit gleichen Elternarten gefunden werden. Die Zuordnung einzelner Komponenten der Blattextrakte zur Wirkung einzelner Gene, wie dies mit den Monoterpenen in manchen Koniferen möglich ist, wurde in keiner der Studien vorgenommen.

2.2 Isoenzyme

Mit Hilfe von Isoenzymen wurden Klonunterscheidung, Artunterscheidung, Introgression und genetische Variation in verschiedenen Arten der Gattung *Populus* untersucht (siehe Übersicht in Tabelle 2-1). Bis zu 30 Genorte (Loci) konnten in manchen Studien analysiert werden. Für diese verschiedenen Anwendungen in den einzelnen Pappelarten wurden jedoch nicht immer dieselben Enzyme und Loci erfolgreich eingesetzt. Ein genauerer Blick auf die Resultate dieser Untersuchungen enthüllt auch, daß verschiedene Labors zu durchaus unterschiedlichen Ergebnissen in bezug auf die Verwendbarkeit mancher Enzymsysteme und Loci kommen - sogar direkte Widersprüche können entdeckt werden (HEINZE 1998b). In einigen dieser Fälle scheint es, als sei der Grund in zu geringen Anzahlen an untersuchten Pflanzen zu suchen: so haben Labors in Europa oft nur wenige *P. deltoides* Genotypen zur Untersuchung der Introgression mit *P. nigra* zur Verfügung, während nordamerikanische Labors vor dem entgegengesetzten Problem stehen. Aus diesem Grund können seltene Varianten in einer Art übersehen oder mit Markern für Introgression verwechselt werden (LEGIONNET & LEFEVRE 1996) - ein unlösbares Dilemma, da Probenmaterial des „Urzustandes“ vor der Einführung standortsfremder Baumarten nicht mehr vorhanden ist.

Während dieser Sachverhalt für alle genetischen Markertypen zutrifft, scheint das Problem bei Isoenzymen größer zu sein als bei DNA-Markern, da die Möglichkeiten für Mutationen in funktionellen

Table 2-1: Übersicht über Isoenzym-Studien in Populus-Arten – verwendete Enzym-Systeme („ja“) und Zweckdienlichkeit („JA“)

[illegible]

Enzymen eingeschränkt sind und die Protein-Abfolgen noch langsamer mutieren als die DNA-Sequenzen. Das Auftreten seltener Varianten könnte also auf gemeinsame Vorfahren zurückgehen. Dieser Sachverhalt erleichtert andererseits phylogenetische Vergleiche zwischen nahe verwandten Arten mit Isoenzymen. Manche Unstimmigkeiten könnten auch auf mangelnde Auflösung zurückzuführen sein (HEINZE 1998b), da die Trennschärfe in den jeweils verwendeten Elektrophoresesystemen verschieden ist.

Für die Analyse genetischer Variation innerhalb der *Populus*-Arten haben sich isoenzymatische Methoden jedoch durchaus bewährt. Auch die Unterscheidung und Identifizierung von Klonen war in manchen Fällen erfolgreich. Praktische Schwierigkeiten traten in jenen Fällen auf, bei denen nahe verwandte Klone (BERGMANN 1981) oder sehr viele Individuen (LEGIONNET ET AL. 1996) untersucht wurden.

RAJORA (1990a) und MÜLLER-STARCK (1992) untersuchten die Kopplung von Isoenzym-Loci in kontrollierten Kreuzungen. Im Probenmaterial von MÜLLER-STARCK (1992) konnten 3 Kopplungsgruppen ermittelt werden, wovon eine auch in den Untersuchungen der Korbweide durch THORSEN ET AL. (1997) auftrat. Die Bedeutung der Erhaltung von Kopplungsgruppen, also gleichbleibender Anordnung der Gene auf den Chromosomen, über evolutionäre Zeiträume liegt darin, daß nach vergleichenden Kopplungsstudien genetische Erkenntnisse aus einer Art sehr direkt auf die anderen Arten übertragen werden können.

Isoenzyme sind also für die Analyse von Introgression und genetischer Variation innerhalb der Arten (z.B. RAJORA 1989a) geeignet. Der Vergleich von Resultaten zwischen verschiedenen Labors bleibt problematisch, sofern dieser die tatsächlichen Bandenmuster betrifft; abgeleitete genetische Parameter jedoch liegen häufig im vergleichbaren Größenbereich.

2.3 DNA-Methoden - Analysenprinzipien

DNA-DNA Hybridisierung

Diese Analysetechnik war eine der ersten, mit welcher DNA verwandter Arten verglichen wurde. DNA besteht aus gegengleichen Doppelsträngen, in denen sich die Nukleotidsequenz eines Stranges mit der des Gegenstranges wie Original und Spiegelbild ergänzen. Dabei ergänzen sich jeweils A und T sowie

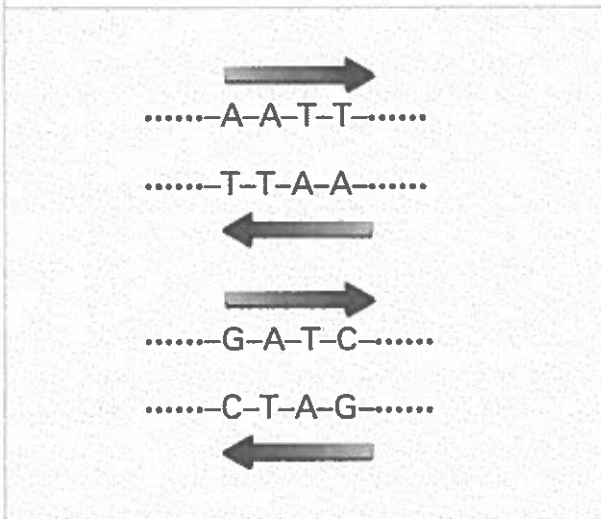
G und C. Durch Erhitzen kann die Doppelstrang-DNA in die Einzelstränge getrennt („geschmolzen“) werden. Beim langsamen Abkühlen finden die zueinander passenden Abschnitte wieder zusammen und bilden Doppelstränge. Einzelsträngig gemachte DNA kann auch mit anderer DNA oder künstlichen DNA-Sonden zusammengebracht werden, und je nach der Stärke der Übereinstimmung zwischen den Nukleotidsequenzen lagern sich passende aneinander und bilden mehr oder weniger stabile Komplexe.

In der DNA-DNA Hybridisierung wird DNA von zwei zu vergleichenden Arten gereinigt und zusammengebracht, dann erhitzt und langsam abgekühlt. Dabei lagern sich die Stränge, die beim Erhitzen getrennt werden, umso schneller wieder zusammen, je ähnlicher sich die DNA-Sequenzen der beiden Arten sind. Die Zusammenlagerung kann spektroskopisch mitverfolgt werden. Während diese Methode an Bedeutung verloren hat, besonders deshalb, weil relativ viel DNA einzusetzen ist, können modernere Verfahren, die auf ähnlichen Prinzipien beruhen, durchaus erfolgversprechend für die Untersuchung von Introgression angewandt werden. Die „dot-blot“- oder „slot-blot“-Techniken zum Beispiel messen das Ausmaß der Hybridisierung zweier DNA-Präparationen. Eine der DNAs wird an ein Membranfilter gebunden, die zweite DNA wird radioaktiv oder mit Farbstoffen markiert und mit dem Filter inkubiert. Das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den DNA-Proben kann aufgrund der Stärke der gebundenen Radioaktivität bzw. der Farbtintensität geschätzt werden.

Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme sind biologische Wirkstoffe, die DNA-Stränge an genau definierten Stellen auseinander schneiden. Diese Stellen sind durch eine bestimmte kurze Basenabfolge gekennzeichnet, meist in Form eines Palindroms, d.h. einer Folge von Nukleotiden, die aus jeder Richtung, also im Strang und Gegenstrang gelesen, gleich lautet (Abb. 2-2). DNA wird durch Behandlung mit Restriktions-Enzymen in ein Gemisch von unterschiedlich langen Bruchstücken zerschnitten, das elektrophoretisch nach der Größe getrennt werden kann. Chromosomen enthalten sehr viel DNA, und das entstehende Gemisch von Fragmenten kann durch normale Elektrophoresetechniken nicht in separate Banden getrennt werden. Aus den Chloroplasten gereinigte DNA jedoch kann in separate Banden

Abbildung 2-2:
Restriktions-Schnittstellen in DNA mit Palindrom-Sequenzen.



getrennt werden. Oft zeigen dann verwandte Pflanzenarten voneinander abweichende Muster. Bei Pappelarten wurde dieses Prinzip von SABSCH (1992) angewendet.

RFLP: restriction fragment length polymorphism

Bei dieser Analysentechnik wird das oben geschilderte Problem der Überlagerung der vielen Fragmente dadurch gelöst, daß aus dem Gemisch der Fragmente nur einzelne sichtbar gemacht werden. Dazu bedient man sich wieder des Hybridisierungsprinzips. Das in der Elektrophorese getrennte Fragmentgemisch wird auf eine Membran übertragen, die dann mit einer DNA-Sonde inkubiert wird. Diese Sonde ist ein Stück einzelsträngiger DNA, die sich genau dort an die DNA an der Membran anlagert, wo sich ein gegengleiches Stück mit entsprechender Übereinstimmung befindet. Die Sonde ist radioaktiv oder chemisch farbmarkiert, und nach der Entwicklung zeigt sich ein Muster, das hinsichtlich etwaiger Unterschiede ausgewertet werden kann.

Als Sonden können DNA-Fragmente aus Chloroplasten, Mitochondrien und Chromosomen verwendet werden, entweder von derselben oder einer nahe verwandten Art, bei entwicklungsgeschichtlich konservativen DNA-Bereichen auch solche von entfernt verwandten Arten. Diese Sonden werden meist in Bakterien vermehrt; manchmal sind zusätzliche Informationen wie z.B. die genaue DNA-Sequenz bekannt, oder man weiß, um welche Gene es sich handelt. In *Populus*-Arten kann man

erwarten, daß Sonden von einer Art auch für die meisten anderen Arten eingesetzt werden können.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit dieser neuen Methode kann man DNA im Reagenzglas vervielfältigen, und zwar auf ähnliche Art und Weise, wie das in der Zelle vor der Zellteilung geschieht. Man bedient sich dabei des Enzyms „Taq-Polymerase“ aus Bakterien, das bereits industriell hergestellt und vertrieben wird. Dieses Enzym benötigt außer der DNA-„Vorlage“, die vermehrt werden soll, noch die Einzelbausteine (Nukleotide) und kurze Startsequenzen, sogenannte „Primer“, die als Ausgangspunkte für die Verlängerung des DNA-Stranges dienen. Durch geschickte Auswahl solcher Primer kann ein Abschnitt der DNA exponentiell vermehrt werden. Dazu muß nur die Temperaturfolge für das Auseinandertrennen der Doppelstränge (ca. 93°C), das Anlagern der Primer (ca. 45-65°C) und das Verlängern (70-75°C) eingehalten werden, solange alle anderen Reaktionskomponenten im Überschuß vorhanden sind. Innerhalb weniger Stunden können so von Nanogramm an Ausgangsmaterial sichtbare Mengen eines bestimmten DNA-Abschnittes hergestellt werden.

2.4 Chloroplasten- und Mitochondrien-Analysen in der Gattung *Populus*

Die Reinigung von Chloroplasten und Mitochondrien aus Pflanzenmaterial ist nicht mehr üblich. Damit konnte die Größe der *Populus*-Chloroplasten-DNA bestimmt werden (ca. 150-156 Kilobasenpaare, kbp; SABSCH 1992). Auch der mütterliche Erbgang beider Zellorganellen wurde so bestätigt (MEJNARTOWICZ 1991, SABSCH 1992). Spezifische, nur auf einzelne Chloroplasten-DNA-Abschnitte ansprechende RFLP- und PCR-Methoden mit Gesamt-DNA (Chromosomen, Chloroplasten, Mitochondrien) haben dieses Verfahren mittlerweile abgelöst. RFLP-Methoden wurden außerdem von SMITH & SYTSM (1990), MEJNARTOWICZ (1991), SABSCH (1992), RAJORA & DANCIC (1992b), VORNAM ET AL. (1994) und RAJORA & DANCIC (1995a, b, c) für Chloroplasten-DNA und von RADEZKY (1990), PAIGE ET AL. (1991), RAJORA ET AL. (1992) und BARRETT ET AL. (1993) für Mitochondrien-DNA angewendet. Dabei wurden von manchen Autoren DNA-Sonden aus *Petunia*

oder anderen nur entfernt verwandten Pflanzen angewendet.

SMITH & SYTSMA (1990) stellten aufgrund der von ihnen erhobenen Daten die ungewöhnliche Hypothese von der Beteiligung von *P. alba* an der Artentstehung von *P. nigra* auf (mit Hilfe des sogenannten „chloroplast capture“ Mechanismus). MEJNARTOWICZ (1991, s.a. SABSCH 1992) konnte mit kontrollierten Kreuzungen zwischen Balsampappelklonen den mütterlichen Erbgang dieser Zellorganellen nachweisen. In SABSCH (1992) wird auch über innerartliche Variation des Chloroplastengenoms in *P. trichocarpa* berichtet. RAJORA & DANKI (1992b; 1995a, b, c) und VORNAM ET AL. (1994) konnten den mütterlichen Erbgang auch für andere Kreuzungskombinationen von *Populus*-Arten bestätigen, im besonderen für Kreuzungen *P. deltoides* x *P. nigra*. Auch innerartliche Variation konnte festgestellt werden (was sicher mit der Anzahl und der Herkunft der untersuchten Bäume zusammenhängt). Allerdings fallen bei genauem Vergleich der Daten kleinere Unstimmigkeiten zwischen den Arbeitsgruppen auf, die somit auf unterschiedliche Handhabung der Analysen zurückzuführen sein müssen.

Chloroplasten-DNA zeigt also Variation zwischen und innerhalb der Pappel-Arten, wobei letztere mit dem geographischen Ursprung der Proben korrelieren kann. Die angewendete RFLP-Methode, die sehr viele Arbeitsschritte erfordert, macht allerdings die Analyse großer Probenserien extrem aufwendig. Gleiches gilt für Mitochondrien-DNA, wobei aber noch die vermutete häufige Reorganisation des Mitochondrien-DNA-Ringes erschwerend dazukommt.

2.5 Genomische DNA-Marker

RFLP-Analyse ribosomaler RNA-Gene

Ribosomen, die Orte der Proteinsynthese in den Zellen, bestehen hauptsächlich aus ribosomaler RNA, die von speziellen Genen (rDNA) kodiert wird. Diese Gene sind zwischen den Arten sehr stark konserviert, und zwar vermutlich aus zwei Gründen: erstens sind Mutationen in diesen Genen offenbar sehr schädlich, da dann meist die Proteinsynthese betroffen ist, unter Umständen sogar unmöglich wird. Zweitens sind in den Chromosomen diese Gene in großer Anzahl vorhanden, und zwar direkt hintereinander gereiht, nur durch „Abstandhalter-DNA“ („spacer DNA“)

getrennt, oft in hunderten Kopien, manchmal sogar auf mehreren Chromosomen. Solche Gene zeigen jedoch eine extrem langsame Mutationsrate, da sich zufällig entstandene Änderungen der Sequenz an einer Stelle nur sehr schwer im Lauf der Entwicklung gegen die „Übermacht“ der anderen, unveränderten Genkopien „durchsetzen“ können. Einige Besonderheiten machen die Einzel-Locus-Analyse von rDNA schwierig bis unmöglich: die Möglichkeiten des ungleichen Chromosomensegment-Austausches in der Meiose („unequal crossing-over“), der Genkonvertierung („gene conversion“) und der Entwicklung nicht funktioneller Pseudogene. Für entwicklungsgeschichtliche Fragestellungen (Artentstehung, Artunterscheidung, Artverwandtschaft) wird rDNA jedoch gerne eingesetzt.

SMITH & SYTSMA (1990) fanden bei ihrer RFLP-Analyse verschiedener Pappelarten Unterschiede in der rDNA. D'OVIDIO ET AL. (1990, 1991) untersuchten den Sachverhalt genauer und fanden mehrere rDNA-Varianten auch innerhalb der Arten, wobei anscheinend verschieden große Genkomplex-Varianten bestehen („major and minor loci“). Hybriden erben die Varianten beider Eltern. Auch FAIVRE-RAMPANT ET AL. (1992) konstruierten Genkarten aufgrund der gefundenen Restriktionsenzym-Schnittstellen, wobei sich diese Karten teilweise mit denen in D'OVIDIO ET AL. (1991) decken. Klone konnten korrekt *P. nigra*, *P. deltoides* oder *P. x euramericana* F1-Hybriden zugeordnet werden. STOEHR & SINGH (1993) präsentierten eine Genkarte für rDNA von *P. balsamifera*, einer nahen Verwandten von *P. trichocarpa*. Diese Karte stimmt zumindest in der für die RNA kodierenden Region mit den vorher besprochenen Karten überein. Die Autoren berichten auch über Längenvariation in der „spacer DNA“ zwischen den Genkopien, die bei der Analyse einer Populationsstichprobe evident wurde. PRADO ET AL. (1996) bewiesen schließlich mit mikroskopischen Chromosom-Präparaten, daß in manchen Pappelarten mehr als ein Locus für rDNA zu finden ist. Die Technik der „in situ-Hybridisierung“ verwendet dazu Sonden ähnlich denen in der RFLP-Analyse. Für *P. nigra* und *P. deltoides* wurden je ein „größerer“ und ein „kleinerer“ Locus detektiert, deren F1-Hybriden zeigten jedoch zusätzlich zum „größeren“ Locus beide „kleinere“ Loci. *P. balsamifera* zeigte zwei „größere“ und zwei „kleinere“ Loci, *P. alba* überhaupt nur einen Locus.

Die „in situ-Hybridisierung“ eignet sich nicht für Reihenuntersuchungen. RFLP-Untersuchungen wie

die oben beschriebenen sind mit größeren Probenzahlen möglich, können aber in Bezug auf Schnelligkeit und Kosten nicht mit PCR-Methoden mithalten. Langfristig wäre daher die Entwicklung von PCR-Methoden zur Analyse der rDNA wünschenswert.

RFLP-Analysen mit anderen DNA-Sonden

KEIM ET AL. (1989) verwendeten DNA-Sonden aus Pappeln, die in Bakterien vermehrt („kloniert“) wurden. Damit konnte die unidirektionale Introgression in *P. angustifolia* - *P. fremontii* Hybridschwärmen nachgewiesen werden, d.h. F1-Hybriden kreuzten sich nur mit einer der Elternarten. BRADSHAW ET AL. (1994) verwendeten ähnliche DNA-Fragmente zur Konstruktion einer genetischen Kopplungskarte der Chromosomen in einer *P. deltoides* - *P. trichocarpa* Kreuzung.

PCR anonymer DNA-Sequenzen

RAPD, AP-PCR und DAF (WILLIAMS ET AL. 1990, WELSH & MCCLELLAND 1990, CAETANO-ANOLLÉS ET AL. 1991) sind drei einander sehr ähnliche Verfahren zur Darstellung genetischer Marker mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und einzelner, zufällig gewählter Primersequenzen. Es entstehen bei diesen Verfahren DNA-Banden in Elektrophoresegelele, die durch ihre An- oder Abwesenheit auf das Vorhandensein der betreffenden DNA-Sequenz - über die man nicht mehr als diese Tatsache weiß - hinweisen. Da für diese Analysen keine Vorkenntnisse oder Vorarbeiten, wie die Isolierung von DNA-Sonden, notwendig sind, können sie sehr schnell für verschiedene Pflanzenarten adaptiert werden. Die Qualität der so erhaltenen Information ist zwar nicht so hoch wie bei anderen Markertypen - leichte Änderungen im Analysenprotokoll können Auswirkungen auf die Analysenergebnisse haben. Die Schnelligkeit der Analyse und die große Anzahl möglicher Marker machen aber manches wett. Die üblichen populationsgenetischen Parameter können nur unter verschiedenen Annahmen berechnet werden. Ob diese Annahmen berechtigt sind, kann nicht überprüft werden. Allerdings kann man auf andere Parameter ausweichen, die besser an die Qualität der Daten angepaßt sind. Vielfach wird dabei die „Cluster“-Analyse verwendet, ein Verfahren zur Datenreduktion, das auf berechneten „Ähnlichkeits-Abständen“ beruht. Dendrogramme, die Ergebnisse solcher Analysen, geben aber, abge-

sehen von spezifischen Schwierigkeiten bei der Berechnung der Abstände mit RAPD-Markern, die „wahren“ Beziehungen der Proben untereinander nur verkürzt wieder. Bei *Populus* wurden diese Techniken hauptsächlich zur Klondifferenzierung eingesetzt (z.B. LIN ET AL. 1994, BUENO ET AL. 1997). YEH ET AL. (1995) und LIU & FURNIER (1993) verglichen RAPD mit anderen Methoden zur Detektion von Variation innerhalb und zwischen Populationen in *P. tremuloides*, während TUSKAN ET AL. (1996) ihre populationsgenetischen Berechnungen in derselben Art alleine auf der Basis von RAPD-Daten durchführten.

AFLP (VOS ET AL. 1995) ist eine Methode, die manche Nachteile der RAPD-Analyse vermeidet: die zu analysierende DNA wird vor der PCR mit Restriktionsenzymen verdaut, deren spezifische Erkennungssequenzen zur „Verankerung“ der PCR-Primer dienen. Da eine große Vielfalt von Fragmenten entsteht, ist die Verwendung von Polyacrylamid-Sequenziergelele zu deren Auftrennung notwendig. CERVERA ET AL. (1996) fanden damit DNA-Marker für Resistenzgene in einem Hybridpappel-Stammbaum (*P. deltoides* x *P. nigra*). STORME & BOERJAN (persönliche Mitteilung) haben mit dieser Methode eine Sammlung von *P. nigra* „Italica“-Klonen untersucht und haben für diese eine fast 100 prozentige Übereinstimmung der Bandenmuster festgestellt, während andere Schwarzpappelklone aufgrund der Muster voneinander und von den „Italica“-Klonen unterschieden werden konnten. Über die Eignung von AFLP-Analysen für populationsgenetische Aufgaben besteht noch wenig Erfahrung.

PCR von DNA mit bekannter Sequenz

In der wissenschaftlichen Literatur sowie in den internationalen DNA-Sequenz-Datenbanken, die über das Internet abrufbar sind, finden sich für die als Modellbaumart dienende Pappel zahlreiche Daten über DNA-Fragmente. Dazu zählen die PCR-Primer, die von BRADSHAW ET AL. (1994) in der Analyse der *P. trichocarpa* - *P. deltoides* Kreuzung verwendet wurden (29 Primerpaare), sowie Gensequenzen von ca. 100 Genen oder Fragmenten mit größtenteils bekannter Funktion in den großen DNA-Sequenz-Datenbanken GenBank, EBI und DDBJ.

Die von BRADSHAW ET AL. (1994) entwickelten Primer wurden teilweise auch für andere Pappelarten als *P. trichocarpa* und *P. deltoides* getestet. Nach der Vermehrung mittels PCR diente die Behandlung

mit verschiedenen Restriktionsenzymen zur Detektion von Polymorphismen, also genetischer Variation. Diese Fragmente zeigten größtenteils Variation zwischen den Arten. LEGIONNET ET AL. (1997) und FAIVRE-RAMPANT ET AL. (1995, und persönliche Mitteilung) konnten mit einigen dieser Fragmente auch Variation innerhalb der Arten *P. nigra* und *P. deltoides* entdecken. Manche der Fragmente scheinen auf Introgression von *P. deltoides*-Genen über Hybridpappeln in den Genpool der *P. nigra* hinzuweisen.

Ähnlich wie dies von BRADSHAW ET AL. (1994) vorgezeigt wurde, kann man auch auf der Basis der DNA-Sequenzen in den internationalen Datenbanken Primer entwerfen und untersuchen, ob diese für andere Pappelarten geeignet sind bzw. ob sich genetische Variation damit detektieren läßt.

PCR-Analyse hochvariabler Mikrosatelliten-DNA

Bei Mikrosatelliten-DNA handelt es sich um kurze DNA-Sequenzen, die aufgrund hoher Mutationsrate für gewöhnlich zahlreiche Allele aufweisen. Diese Tatsache macht sie für Fragestellungen, die eine hohe genetische Trennschärfe erfordern, besonders geeignet. LEXER ET AL. (1997) stellten zum Beispiel Vaterschaftsanalysen für Eichen auf der Grundlage solcher Mikrosatelliten-DNA vor. WANG ET AL. (1996) beschrieben eine solche Sequenz für *P. nigra*. RAJORA (1997) stellte laufende Arbeiten über Mikrosatelliten in *P. tremuloides* vor. Drei Mikrosatelliten-Sequenzen konnten auch bei *P. nigra* angewendet werden. Mikrosatelliten, obwohl technisch schwieriger zu analysieren, würden für Zwecke der Klonidentifizierung ideale Instrumente darstellen. Es ist sogar denkbar, auf ihrer Grundlage Datenbanken zusammenzustellen, die international die einheitliche Identifizierung von Pappelklonen ermöglichen könnten.

2.6 Zytologie

Der DNA-Gehalt pro Zelle beträgt für Pappeln ca. 1,1 pg (WANG & HALL 1995). Die direkte Beobachtung der Chromosomen im Mikroskop zeigt keine

morphologische Variation. Als bisher einzige Arbeit, die zytologische Unterschiede zwischen Pappelarten beschreibt, ist die oben erwähnte von PRADO ET AL. (1996) bekannt, in der in-situ-Hybridisierung angewendet wurde.

2.7 Auswahl von Verfahren für die Untersuchungen des Projektes

Für die Ziele des Projektes boten sich Analysemethoden auf der Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion besonders an: Gründe dafür sind die vorhandene Laborausstattung, die Eignung für Reihenuntersuchungen, die geringe Entwicklungsarbeit, die Vergleichbarkeit mit Daten anderer Labors und die relativ geringen Kosten.

Für die Untersuchung der Introgression zwischen *P. nigra* und *P. x euramericana* boten sich dabei Methoden zur Analyse der Variation in der Chloroplasten-DNA an. TABERLET ET AL. (1991), DEMESURE ET AL. (1995) und DUMOLIN-LAPEGUE ET AL. (1997) stellten Primersequenzen vor, die nahezu „universell“ in vielen Pflanzenarten die Vermehrung bestimmter DNA-Abschnitte der Chloroplasten ermöglichen. Dabei wird von den relativ konservierten DNA-Sequenzen der Chloroplasten-Gene ausgegangen, um die dazwischenliegenden Abschnitte, die stärker mutieren, darzustellen. Bisher sind aus den erwähnten Arbeiten 16 Primerpaare bekannt. Die Entwicklung weiterer Primerpaare kann auf der Grundlage veröffentlichter DNA-Sequenzen (z.B. Tabak, Reis, japanische Schwarzkiefer) mittels spezieller Computersoftware auch selbst durchgeführt werden.

Ebenfalls zur Untersuchung der Introgression, aber auch zur Identifikation der Hybridpappelklone, wurden PCR-Methoden auf der Grundlage bekannter DNA-Sequenzen ausgewählt. Dieser Ansatz erforderte den geringsten Aufwand für Methodenentwicklung. Im Gegensatz dazu wäre die Entwicklung neuer Mikrosatelliten-DNA-Marker, die für die Identifizierung an sich geeigneter wären, in der Laufzeit des Projektes zeitlich nicht möglich gewesen. Zusätzlich hätte die Laborausstattung erweitert werden müssen (mikrobiologisches und gentechnisches Arbeiten).

3 Introgression Schwarzpappel - Hybridpappel

3.1 Chloroplasten-DNA als Unterscheidungsmerkmal der Pappelarten

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, ist zu erwarten, daß sich die Analyse der Chloroplasten-DNA besonders für die Unterscheidung der Arten gut eignet. Die Abfolge der Gene auf dem Chloroplasten-DNA-Ring unterscheidet sich innerhalb der bedecktsamigen Blütenpflanzen nur wenig und daher auch nur gering von der Reihenfolge, die durch die Aufklärung der kompletten Sequenz des Tabak-Chloroplasten bekannt ist (SUGIURA 1992). Aufgrund der Daten in SABSCH (1992) und RAJORA & DANKIC (1995a, b, c) war zu erwarten, daß Variation hauptsächlich zwischen den Pappelarten, in geringerem Ausmaß auch innerhalb der Pappelarten auftritt. Ergebnisse bei anderen Baumarten wie z.B. der Buche (DEMESURE ET AL. 1996) lassen überdies erwarten, daß die Mehrzahl der Mutationen in den Abstandhalter („spacer“)-Regionen zwischen den Genen der Chloroplasten-DNA zu finden sein wird, und daß es sich dabei vermehrt um Einschübe bzw. Verluste sehr kurzer DNA-Abschnitte handeln wird. Mutationen, die zu

solcher Variation führen, treten im Lauf der Entwicklungsgeschichte einer Pflanzenart fortwährend auf. Es wird im allgemeinen angenommen, daß die Mutationsrate im Lauf der Evolution annähernd konstant bleibt. Analog zu der Buche (DEMESURE ET AL. 1996) wurde im vorliegenden Projekt für die Untersuchungen der Pappel die Methode der PCR mit konservierten Primersequenzen (TABERLET ET AL. 1991, DEMESURE ET AL. 1995, DUMOLIN-LAPEGUE ET AL. 1997) gewählt. Es war zu prüfen:

- 1) ob die PCR-Primer aus den angegebenen Literaturstellen für die Pappel angewendet werden können;
- 2) ob und mit welchen Restriktionsenzymen Variation detektiert werden kann;
- 3) ob zur Detektion von Variation in Pappeln zusätzliche Primerpaare entworfen werden können.

3.1.1 Material und Methoden

Die in dieser Untersuchung hauptsächlich verwendeten Pappelklone sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Falls nicht anders angegeben, stammten diese aus den Versuchsgärten der FBVA in Mariabrunn und Tulln. Für die Reinigung der DNA aus Knospen und Blättern der Pflanzen wurden im wesentlichen die Methoden von HEINZE & GEBUREK (1995) und OTTO ET AL. (1994) angewendet.

Tabelle 3-1:
Pappelklone, die für das Testen von Methoden hauptsächlich verwendet wurden

Klon-Bezeichnung	Beschreibung
S-9-2	<i>P. deltoides</i>
S-307-24	<i>P. deltoides</i>
Lébény 211	<i>P. nigra</i>
„Italica“	<i>P. nigra</i>
„Verecken“	<i>P. nigra</i>
„Vert de Garonne“	<i>P. nigra</i>
T 3 „Rochester“	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. nigra</i> „Plantierensis“ (?)
T 4 „Geneva“	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. x berolinensis</i>
„Robusta“	<i>P. x euramericana</i>
„Marilandica“	<i>P. x euramericana</i>
„Aukönig“	<i>P. x euramericana</i> ?
T 107 „I 214“	<i>P. x euramericana</i>
„Max 3“	<i>P. nigra</i> x <i>P. maximowiczii</i>
72/51 „Kamabuchi“	<i>P. nigra</i> x <i>P. maximowiczii</i>
69/2 „Muhle-Larsen 45/54“	<i>P. trichocarpa</i>
I/5 „Mariabrunn I“	<i>P. trichocarpa</i>
Kontrollierte Kreuzung „Sárvár 1“: Sv 1-... (13 Klone)	S-9-2 x Lébény 211
Kontrollierte Kreuzung „Sárvár 2“: Sv 2-... (13 Klone)	S-307-24 x Lébény 211

Tabelle 3-2:
Chloroplasten-Primer aus der Literatur

Primer 1	Sequenz 5'-3'	Primer 2	Sequenz 5'-3'	Temperatur (°C)	Größe (bp)
trnH	ACG GGA ATT GAA CCC GCG CA	trnK1	CCG ACT AGT TCC GGG TTC GA	62,0	1825
		trnK2	CAA CGG TAG AGT ACT CGG CTT TTA	53,5	2557
trnD	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC	trnT	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG	54,5	1719
psbC	GGT CGT GAC CAA CAA ACC AC	trn S	GGT TCG AAT CCC TGT CTC TC	57,0	1628
trnS	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC	trnfM	CAT AAC CTT GAG GTC CG GG	62,0	1603
		psaA	ATT CGT TCG CCG GAA CCA GAA GT	47,5	5148
trnS	CGA GGG TTC GAA TCC CTC TC	trnT	AGA GCA TCG CAT TTG TAA TG	57,5	1319
ucp a	CAT TCA AAA TGC GAT GCT CT	ucp d	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	50-55	
ucp c	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	ucp d	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	50-55	

Tabelle 3-3:
Selbstentworfen Chloroplasten-Primer

Vorwärts-Primer	Sequenz 5'-3'	Rückwärts-Primer	Sequenz 5'-3'
ORF62-P	CTT GCT TTC CAA TTG GCT GT	ORF62-M	TTG GTT TTG GGT CGT CGA C
trnG-P	GCC AAG GAG AAG ATG CGG G	trnG-M	AAC CCG CAT CTT CTC CTT GG
psbA5'	TAC GTT CGT GCA TAA CTT CC	psbA3'	CTA GCA CTG AAA ACC GTC TT
rpl23p	TAA GAC AGA AAT AAA GCA TTG CGT CGA AC		

Die von TABERLET ET AL. (1991), DEMESURE ET AL. (1995) und DUMOLIN-LAPEGUE ET AL. (1997) entworfenen Primerpaare, die in dieser Studie verwendet wurden, sind in Tabelle 3-2 angeführt. Diese Primerpaare decken ungefähr die Hälfte der Sequenzregion der „large single copy region“ im Chloroplasten-DNA-Ring ab (SUGIURA 1992). Weitere Primerpaare wurden aufgrund von Vergleichen („alignments“) dieser Tabak (*Nicotiana tabacum*)-Chloroplasten-DNA-Sequenzen mit denen von Reis (*Oryza sativa*) und japanischer Schwarzkiefer (*Pinus thunbergii*) entworfen. Dazu wurden aus dem Programmpaket PC/GENE 6.85 (Oxford Molecular) die folgenden Programme verwendet: NALIGN, NMATPUST, CLUSTAL, PCRPLAN und QSEARCH. Diese Primer sind in Tabelle 3-3 wiedergegeben.

Die standardmäßig verwendeten Bedingungen für die PCR waren: 10-50 ng DNA pro Ansatz (10-20 µL); 200 nM von jedem Primer; 2,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10-50 ng/µL RNAase A (HEINZE 1994a) und 0,5 U DNA-Polymerase (DynaZyme, Finn-Zymes Oy oder AmpliTaq Gold, Perkin Elmer) in 1 x Reaktionspuffer wie mit dem Enzym mitgeliefert. Die folgenden PCR-Geräte und -Programme wurden verwendet:

- MJ Research PTC 100-96V, MJ Research PTC 100-60 oder Hybaid Touchdown;

- 94°C (50 Sek.), 55°C (50 Sek.), 70°C (2 Min.) für 35 Zyklen, 4°C bis zur Elektrophorese;
- 94°C (50 Sek.), 70°C (1 Min.) für 10 Zyklen, dann 94°C (30 Sek.), 55°C (50 Sek.), 70°C (2 Min.) für 35 Zyklen, 4°C bis zur Elektrophorese;
- 94°C (8 Min.), Temperatur 1 (empfohlene Temperatur für den jeweiligen Primer + ca. 10°C - 45 Sek.), 70°C (1 Min.), 94°C (45 Sek.) für 10 Zyklen, dann Temperatur 2 (empfohlene Temperatur für den jeweiligen Primer - 45 Sek.), 70°C (1 Min.), 94°C (45 Sek.) für 35 Zyklen, 4°C bis zur Elektrophorese.

Tabelle 3-4 nennt die Restriktionsenzyme, die für die jeweiligen DNA-Abschnitte verwendet wurden. Dabei handelt es sich einerseits um Enzyme mit einer Abfolge von 4 Basen als Erkennungssequenz (z.B. Msp I, Hinf I, Hae III, Rsa I), die bevorzugt für die Analyse kurzer DNA-Fragmente verwendet werden, andererseits um Enzyme mit 6 Basen als Erkennungssequenz (z.B. Eco RI, Dra I), die seltenere Schnittstellen erkennen und damit für die Analyse längerer DNA-Abschnitte geeigneter sind. Zur Restriktionsanalyse wurde nach Beendigung der PCR-Reaktion die Konzentration von Mg²⁺ durch Zugabe von MgCl₂ auf mindestens 10 mM gebracht und die Restriktionsenzyme direkt zugefügt (0,1 Enzym-Einheit pro 10 µL

Tabelle 3-4:

Eingesetzte Primerpaare, ungefähre Fragmentgröße und verwendete Restriktions-Enzyme. Fragmente mit *variabler Länge* in *kursiv*, polymorphe Restriktions-Schnittstellen **fett**.

Primer-Paar	ungefähre Größe (bp)	Restriktions-Enzyme	Primer-Paar	ungefähre Größe (bp)	Restriktions-Enzyme
ucp a + ucp d	1050	Hae III Hha I Msp I Rsa I	<i>ORF62-P + trnfM</i>	1040	Bam HI Eco RI Hae III Hha I Hinf I Rsa I Xho I
ucp c + ucp d	650	Bam HI Bgl I Eco RI Hae III Hha I Hind III Msp I Pst I Xho I	<i>ORF62-P + trnG-M</i>	800	Dra I Eco RI Rsa I
psbA 5' + trnK2	6000	Bam HI Bgl I Eco RI Hind III Pst I Xho I	trnG-P + trnfM	250	Bam HI Bgl I Eco RI Hae III Hha I Hinf I Msp I Xba I Xho I
psbA 5' + trnK1	1350	Hha I Msp I Rsa I	trnG-P + psaA	3500	Hae III Hha I Hinf I
psbA 5' + psbA 3'	900	Hinf I	<i>trnD + trnT</i>	850 bzw. 1050	Hinf I Msp I Rsa I Xba I
psbA 3' + rpl23p	3000	Hae III Hha I Hinf I Msp I	psbC + trnS	1600	Hinf I Xba I
psbA 3' + trnH	1300	Rsa I	trnS + trnT	1700	Bam HI Bgl I Eco RI Hae III Hha I Hind III Hinf I Msp I Pst I Rsa I Xho I
trnH + trnK	1800	Msp I Rsa I			
<i>trnS + trnfM</i>	1600	Bam HI Bgl I Dra I Eco RI Hae III Hha I Hinf I Msp I Pst I Rsa I Xho I			

PCR-Reaktion). Nach 3-15 Stunden bei 37°C wurden die Reaktionsprodukte in 1,5-2,5 % Standard-Agarose-Gelen nach ihrer Größe (= Anzahl der Basenpaare) aufgetrennt. Die Feststellung der Molekülgrößen der Bruchstücke erfolgte computergestützt mit Hilfe der Gel-Dokumentations-Anlage (GPI 2000, MWG Biotech) und dem Programm RFLPScan (Scanalytics). Der Durchschnitt mehrerer Analysen diente als Grundlage für die Kartierung einzelner Abschnitte. Zusätzlich wurden einzelne DNA-Abschnitte mittels „single strand conformation polymorphism-Analyse“ (SSCP) untersucht, wobei nach den Angaben in HEINZE (1997a) vorgegangen wurde.

Bei dieser Analyse werden die beiden DNA-Stränge eines einzelnen DNA-Moleküls durch Erhitzen voneinander getrennt. Sofortiges Abkühlen auf ca. 0°C bewirkt, daß sich die Einzelstränge nicht wieder aneinander lagern, sondern jeder für sich eine sequenzspezifische Konformation einnehmen. In geeigneten Polyacrylamid-Elektrophoresegelen (0,5 oder 0,75 x MDE - Fa. FMC) wandern diese Einzelstränge dann verschieden schnell. Kleine Sequenz-Verschiedenheiten zwischen DNA-Strängen können so detektiert werden, auch wenn sie sich nicht auf Restriktions-Enzyme auswirken, oder wenn keine in Agarose-Gelen detektierbaren Längenunterschiede auftreten.

3.1.2 Ergebnisse

Die in der Tabelle 3-4 angeführten DNA-Abschnitte ließen sich ohne besondere Schwierigkeiten mit allen Proben vermehren, sofern die Qualität der DNA-Präparation den Anforderungen genügte. Zusammengerechnet summierten sich die Abschnitte bei nur einmaliger Zählung überlappender Abschnitte zu ca. 18 000 Basenpaaren Länge auf (HEINZE 1998a).

Es zeigte sich, daß von den analysierten Chloroplasten-DNA-Abschnitten nur die wenigsten Variation aufwiesen (Tab. 3-4). Es wurden insgesamt 6 variable Restriktions-Schnittstellen gefunden (fettgedruckt in Tab. 3-4), und Längenänderungen, manchmal äußerst geringfügiger Art, traten insgesamt in 3 Bereichen auf. Ein Beispiel für nicht variable DNA-Abschnitte ist in Abbildung 3-1 abgebildet. Abbildung 3-2 hingegen zeigt die Analyse eines variablen DNA-Fragmentes. Die untersuchten Klone von *P. x euramericana* stimmten dabei mit den *P. deltoides*-Klonen überein. Auffallend war das gehäufte Auftreten von Polymorphismen in der Region zwischen den Primern trnS und trnFM. Hier wurde eine variable Restriktions-Schnittstelle des Enzyms Rsa I gefunden: die Schnittstelle war in *P. nigra* und *P. maximowiczii*-Klonen vorhanden, in *P. deltoides* und *P. x euramericana* fehlte sie. Beim Verdau mit anderen Restriktions-Enzymen wurden zusätzlich Längenänderungen deutlich, wobei es sich

um bereits mehrmals für Chloroplasten-DNA beschriebene sogenannte „insertions/deletions“ handelte. Das sind kurze Einschübe bzw. Verluste kurzer DNA-Abschnitte, oft nur wenige Basen lang.

Diese Region wurde mit zusätzlich entworfenen Primern genauer untersucht. Die Reihenfolge der Gene in diesem Bereich ist nach SUGIURA (1992) psbC-trnS-ORF105-ORF62-trnG-trnFM-rps14-psaB-psaA. Durch Sequenzvergleiche zwischen den Reis- und Tabak-DNA-Sequenzen aus der Datenbank konnten im Bereich von ORF62 und trnG solche Primer entworfen werden (Tab. 3-3), während sich bei ORF105 keine genügende Übereinstimmung zwischen den Arten ergab. Die Anwendung der zusätzlichen Primer sowie eine Restriktions-Kartierung durch einfache und doppelte Restriktions-Verdaue führte zur Konstruktion der Karte in Abbildung 3-3. Darin sind die Lage der Primer und der Restriktions-Schnittstellen relativ zueinander eingezeichnet.

Wie zu sehen ist, konnte die variable Region auf den Bereich zwischen ORF62 und trnG lokalisiert werden. In diesem Bereich divergieren die drei hauptsächlich untersuchten Pappelarten *P. nigra*, *P. deltoides* und *P. maximowiczii* voneinander. Die variable Restriktionsschnittstelle Rsa I-4 fiel mit Längenänderungen zwischen den Klonen zusammen, was darauf hinweist, daß eine „insertion/deletion“ Mutation der wahrscheinliche

Abbildung 3-1:
Beispiel eines nicht-variablen
DNA-Abschnittes
(*rpl23p* + *psbA* 3'), analysiert
mit Restriktions-Enzym *Hinf*I.
Pappelarten:
• *P. deltoides* (1, 2, 3, 4),
• *P. nigra* (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13),
• *P. x euramericana*
(5, 6, 14, 15, 16, 17, 18).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

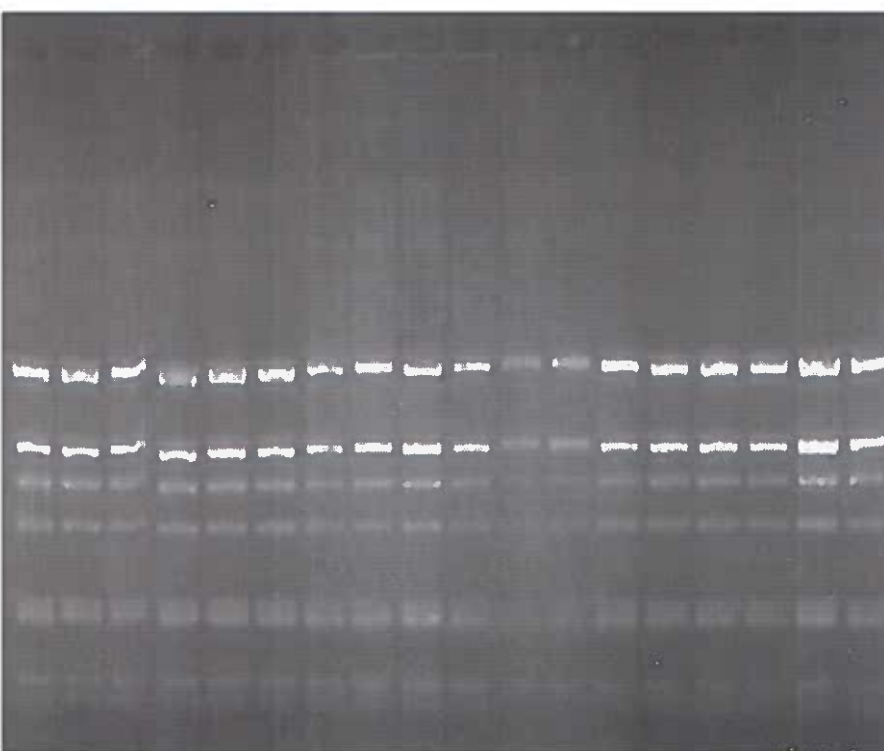


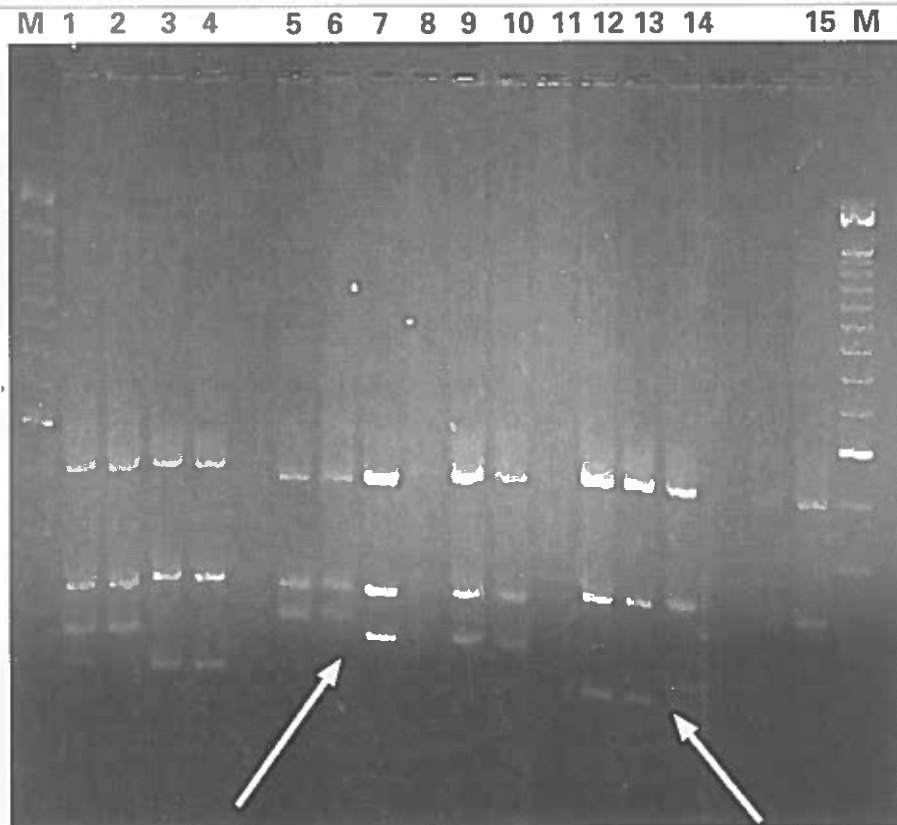
Abbildung 3-2:

Beispiel für variablen DNA-Abschnitt (*trnS-trnM*), analysiert mit den Restriktions-Enzymen *Eco* RI und *Bam* HI.

Pappelarten:

- *P. deltoides* (1, 2),
- *P. nigra* (3, 4, 12, 13),
- *P. maximowiczii* x *P. nigra* „T3 Rochester“ (5),
- *P. maximowiczii* x *P. x berolinensis* „T4 Geneva“ (6),
- *P. x euramericana* (7, 9, 10),
- *P. nigra* x *P. maximowiczii* „Max 3 - NM 103“ (14),
- *P. trichocarpa* (15).

Pfeile weisen auf besonders variable DNA-Fragmente.



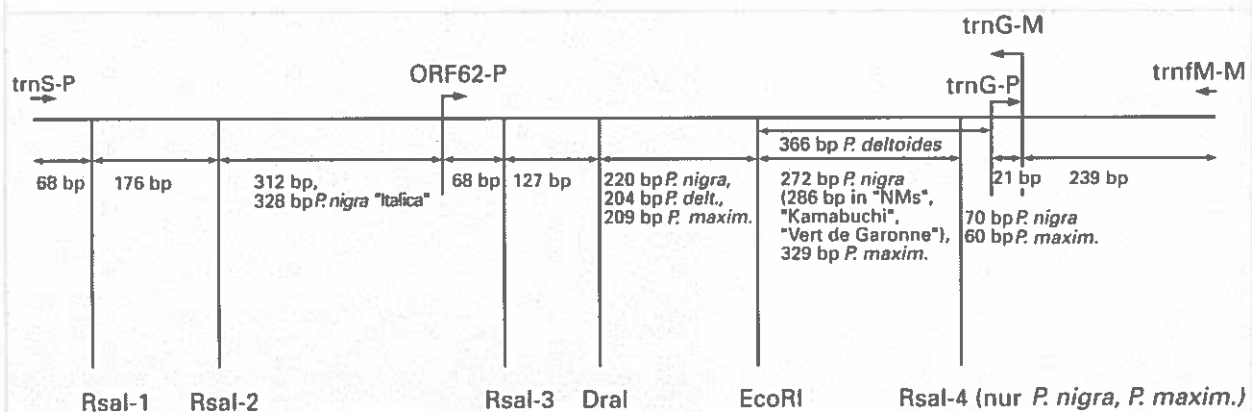
Grund für die Variation ist. Im gegenteiligen Fall einer sogenannten Punktmutation, also der Änderung nur einer Base der Erkennungssequenz des Enzyms *Rsa* I an dieser Stelle, wären die übrigen Abschnitte in ihrer Länge unverändert geblieben. Kurze Längenänderungen betrafen auch manche Klone der bestuntersuchten Art *P. nigra*: eine Gruppe von Klonen aus Japan mit *P. nigra*-Mutter („NM 101“ bis „NM 106“ bzw. „Max1“ bis „Max5“ und „Kamabuchi“) sowie ein *P. nigra*-Klon „Vert de Garonne“ unterschieden sich von allen anderen *P. nigra*-Klonen. Weiters konnte sehr nahe dieses Abschnittes eine weitere Mutation festgestellt werden, die die bekannte Pyramiden-, Säulen- oder Spitz-

pappel *P. nigra* „Italica“ betraf: diese unterschied sich durch eine kleine Längenänderung (ca. 16 Basen) von allen anderen untersuchten Pappelklonen.

Die variable Region zwischen ORF62P und *trnM* wurde auch in einer SSCP-Analyse untersucht. Wie aus Abbildung 3-4 ersichtlich, zeigen Klone mit gleichen Restriktionsverdau-Mustern auch gleich weit gewanderte Banden in der SSCP-Analyse. Alle verschiedenen Typen, die in der Restriktions-Karte (Abb. 3-3) erkennbar sind, haben ein voneinander unterscheidbares SSCP-Erscheinungsbild. Im Gegensatz dazu zeigte die SSCP-Analyse eines anderen Abschnittes, nämlich desjenigen zwischen den Primern *ucp-a* und *ucp-b*, keine Variation.

Abbildung 3-3:

Restriktionskarte des variablen DNA-Abschnittes *trnS-trnM* mit Position und Orientierung der Primer (Pfeile).



Weitere Polymorphismen betrafen die folgenden DNA-Abschnitte und Klone: *psbA3'-rpl23p* in den bereits erwähnten „NM“- bzw. „Max“-Klonen (eine *Hha* I-Schnittstelle fehlt, während die Restriktions-Muster mit *Hae* III, *Hinf* I und *Msp* I unverändert sind) und *trnD-trnT* in allen *P. deltoides*- und *P. x euramericana*-Klonen (Längenänderung um ca. 200 bp, verbunden mit *Hinf* I und *Xba* I-Polymorphismen).

3.1.3 Diskussion

PCR-Primer

Die Primerkombinationen in Tabelle 3-2 konnten größtenteils problemlos aus der Literatur übernommen werden, wenngleich kleine Anpassungen im

Analysenprotokoll notwendig waren. Als zielführend erwies sich die Verwendung eines PCR-Programmes mit einer Anfangsphase bei hohen „annealing“-Temperaturen (HECKER & ROUX 1996). Dadurch konnte in der zweiten Phase eine einheitliche Temperatur für viele der Primer eingesetzt werden. Die selbstentworfenen Primer konnten mit Ausnahme von ORF62M in den sich aus der Abfolge der Gene ergebenden Kombinationen (Tab. 3-3) erfolgreich verwendet werden. Aus diesen Tatsachen ist zu schließen, daß die Abfolge der Gene zwischen Tabak und Pappelarten im untersuchten Bereich im wesentlichen identisch ist.

Gel-Auflösung

Agarose-Gele zeigen im allgemeinen Auflösungs-Genauigkeiten im Bereich von $\pm 5\%$; dieser Sachver-

Abbildung 3-4:
SSCP-Analysen des
nicht-variablen Abschnittes *ucpa-ucpb* (A)
und des variablen DNA-Abschnittes
ORF62P-trnfM (B).

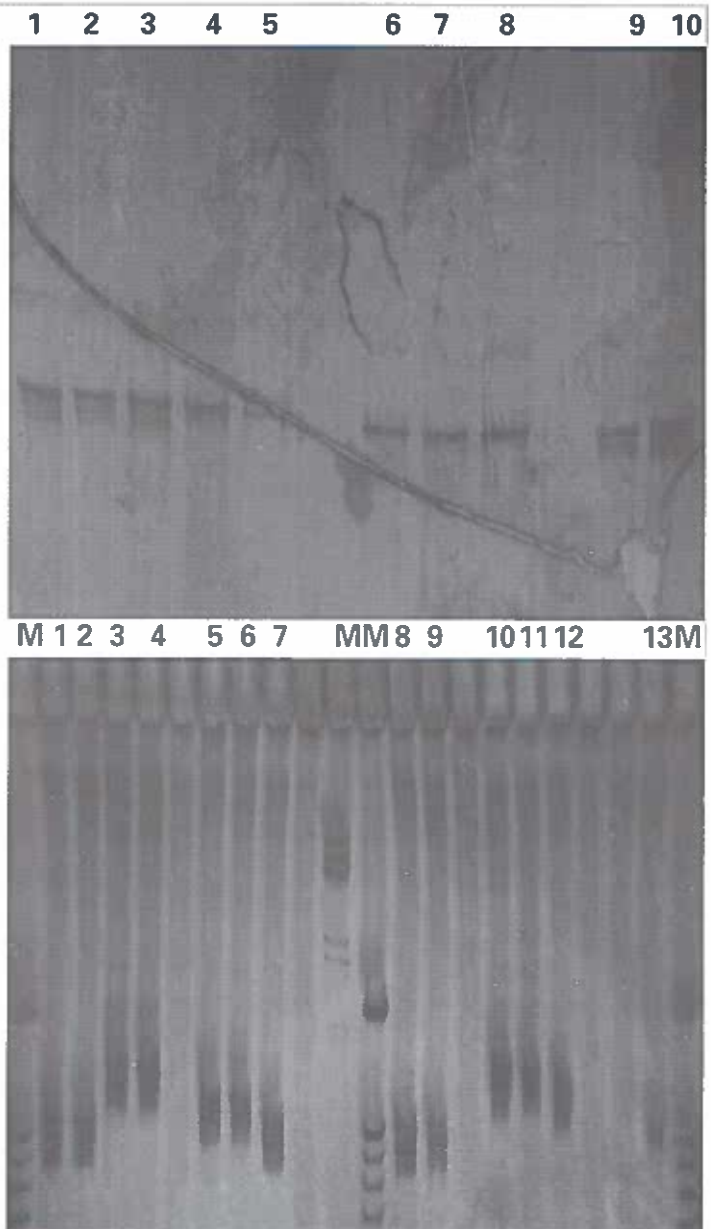
A:

- *P. nigra* (1),
- *P. x euramericana* (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8),
- *P. trichocarpa* (9, 10).

B:

- *P. deltoides* (1, 2),
- *P. nigra* (3, 4, 10, 11),
- *P. maximowiczii* x *P. nigra*
„T3 Rochester“ (5),
- *P. maximowiczii* x *P.*
x berolinensis „T4 Geneva“ (6),
- *P. x euramericana* (7, 8, 9),
- *P. nigra* x *P. maximowiczii* (12),
- *P. trichocarpa* (13).

M: Marker für DNA-Größe.



halt bestätigte sich auch in den vorliegenden Untersuchungen. Somit kann zwar keine absolute Größe für die analysierten DNA-Fragmente angegeben werden, der Durchschnitt aus mehreren Analysen, der in die Berechnung der Restriktions-Karte (Abb. 3-3) einging, kann jedoch als Schätzung mit akzeptabler Genauigkeit angesehen werden. Für den Vergleich von DNA-Abschnitten verschiedener Klone heißt das, daß bei Unterschieden im Bereich von 0-5 % diese Klone Seite an Seite analysiert werden sollten, um die experimentell bedingte Variabilität der Meßwerte zu minimieren, wie es auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

Struktur der Polymorphismen

Kleine Längenmutationen, sogenannte „insertions/deletions“, stellten die größere Gruppe der gefundenen Mutationen dar. Diese waren teilweise erst nach „Verkürzen“ der DNA-Fragmente mittels Restriktionsanalyse erkennbar. Punktmutationen an Restriktions-Enzym-Schnittstellen waren in der Minderzahl. Drei der gefundenen Restriktionsstellen-Mutationen (Rsa I-4 in der variablen Region, s. Abb. 3-3, und Xba I sowie Hinf I im Bereich trnD-trnT) fielen mit Längenänderungen zusammen. In diesen Fällen kann man davon ausgehen, daß durch die Längenänderung die Restriktions-Schnittstelle verändert wurde, somit eine „insertion/ deletion“ vorliegt und keine Punktmutation. Als einzige Punktmutation blieb somit die Hha I-Restriktionsstelle im Bereich psbA-rpl23 übrig. Bei dieser Mutation waren die resultierenden DNA-Fragmente ca. 800 + 1400 bp bzw. über 2000 bp lang. Aufgrund dieser Werte konnten kleinere Längenänderungen im Bereich von vielleicht 40-100 bp (= 5 % von 800 bzw. 2000 bp) nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Analyse dieses Abschnittes mit anderen Restriktions-Enzymen, die jeweils mehrere Schnittstellen erkennbar machten und deshalb eine größere Anzahl von kleineren Bruchstücken erzeugten (Hae III, Hinf I, Msp I), ergab jedoch keinen Verdacht auf Längenänderungen.

Die Polymorphismen waren nicht regellos über den untersuchten Chloroplasten-DNA-Bereich verteilt, sondern häuften sich in einem bestimmten Abschnitt. Für ähnliche Phänomene wird in der Literatur der Ausdruck „mutation hot spots“ verwendet (z.B. JOHNSON & HATTORI 1996, HIPKINS ET AL. 1995). Da in der vorliegenden Arbeit nur ein Teilbereich der Pappel-Chloroplasten-DNA untersucht werden konnte (ca. 18 000 bp von ca. 155 000 bp insgesamt, das entspricht ca. 11,6 %), erscheint es noch nicht als

gerechtfertigt, die variable Region trnS-trnFM als solchen „hot spot“ zu bezeichnen.

Der Polymorphismus zwischen trnS und ORF62 in der Pyramidenpappel „Italica“ wurde in keiner anderen der untersuchten Schwarzpappeln gefunden. Diese stammten alle aus Mittel- oder Westeuropa. Man kann daher vermuten, daß die Pyramidenpappel nicht in dieser Region heimisch ist. Ein Vergleich mit autochthonen Schwarzpappel-Klonen aus Italien, West- und Zentralasien anhand dieses Markers könnte möglicherweise die Frage der in der Fachwelt seit langem umstrittenen geographischen Herkunft des Pyramidenpappel-Klones klären.

Rückschlüsse auf die Evolution und Verwandtschaft der Pappel-Arten

Unter der einigermaßen berechtigten Annahme, daß die Häufigkeit von Mutationen im Laufe der Entwicklungsgeschichte der Pappelarten konstant geblieben ist, kann der Verwandtschaftsgrad zweier Arten auf der Grundlage der Anzahl der diese unterscheidenden Mutationen versuchsweise berechnet werden. Auf diesem Ansatz basieren Berechnungsmethoden wie jene von NEI (1987), bei welcher Mutationen in Restriktions-Schnittstellen mit der Länge der Erkennungssequenz der entsprechenden Restriktions-Enzyme gewichtet werden. Dadurch ergibt sich eine Nukleotid-Divergenz, die in Beziehung zum entwicklungsgeschichtlichen Abstand der Arten gesetzt werden kann. Dieser Ansatz wurde von einigen Forschergruppen gewählt, die mit der RFLP-Methode die Pappel-Chloroplasten-DNA untersuchten (s. Diskussion in HEINZE 1998a, b). Wenn nun nach den vorliegenden Ergebnissen kleine Längenänderungen den überwiegenden Anteil der Mutationen in den Chloroplasten-Spacern stellen, müssen die Ergebnisse dieser Untersuchungen revidiert werden. Die Anwendung der Berechnungsmethode von NEI (1987) auf der Grundlage von solchen Längenänderungen ist in der Fachwelt umstritten. Eine solche Mutation stellt ebenso wie eine Punktmutation ein einmaliges Mutationsereignis dar. Allerdings kann nicht festgestellt werden, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit nachträglich noch Mutationen im Bereich der ursprünglichen Längenmutation stattgefunden haben, während für Punktmutationen eine Wahrscheinlichkeit für Rückmutationen angegeben werden kann und der Formel von NEI (1987) zugrunde liegt. Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, daß die Mutationsrate in Chloroplasten-Spacer-DNA-Abschnitten zweier Gräser

stark von den benachbarten Nukleotiden an jeder Stelle abhängt und daher mit Interdependenzen verbunden ist, die das Geschehen sehr komplex machen (MORTON ET AL. 1997), wodurch sich der evolutionäre Abstand einer einfachen Berechnung wie im Modell von NEI (1987) entzieht. Für eine eingehendere Diskussion dieses Sachverhaltes bei Pappeln wird auf HEINZE (1998a, b) verwiesen.

Praktische Verwendungsmöglichkeiten

Vorrangiges Ziel der Untersuchungen war es, genetische Marker zu finden, die die rasche und zuverlässige Detektion von Chloroplasten-Typen von Hybridpappeln bei Pappelnachkommen ermöglichen. Die vorgestellten Marker eignen sich alle für diese Art von Analyse, da zwischen der hauptsächlich verbreiteten *P. x euramericana* und ihrer Mutterart *P. deltoides* einerseits und den einheimischen Schwarzpappeln *P. nigra* andererseits einige Unterschiede im Chloroplasten-Genom detektierbar sind. Vom Arbeitsaufwand her gesehen ist die Analyse des Abschnittes trnD-trnT am schnellsten durchzuführen, da der Polymorphismus bereits bei PCR ohne anschließenden Restriktions-Verdau sichtbar wird. Für die Reihenuntersuchungen von Schwarzpappel-Nachkommenschaften, über die in Kapitel 3-3 berichtet wird, wurde daher dieser Marker vorrangig verwendet.

Auch Balsampappeln, die in Österreich immer mehr forstliche Verwendung finden (RASCHKA 1997), können auf Grund von Chloroplasten-DNA-Analysen von Schwarzpappeln unterschieden werden. Dabei ist bemerkenswert, daß die Balsampappeln in sich sehr einheitliche Muster aufweisen, obwohl es sich um verschiedene Arten handelt (*P. trichocarpa* und *P. maximowiczii* wurden hauptsächlich untersucht).

Die Einkreuzung von Pyramidenpappeln in die einheimischen Schwarzpappeln stellt ein bislang nicht untersuchtes Problem dar, das für die Gen-erhaltung wichtig ist. Die Analyse des Polymorphismus, der die Pyramidenpappel „Italica“ von den anderen untersuchten Pappeln unterscheidet, kann jedoch zu diesem Zweck nicht herangezogen werden. Wie bereits in Kapitel 2 diskutiert, wird das Chloroplasten-Genom in den Pappeln nach bisher vorliegenden Erkenntnissen von der Mutter, also dem Samenbaum, an die Nachkommen weitergegeben. Der in Österreich weitverbreitete Pyramidenpappel-Klon ist jedoch männlich und kann seine Erbsubstanz somit nur über den Weg des Pollens weitergeben.

3.2 Chromosomale DNA als Unterscheidungsmerkmal

Eine Übersicht über DNA-Marker aus dem Zellkern wurde bereits im Kapitel 2.5 gegeben. Es soll nun die Entwicklung von PCR-Tests für die molekular-genetischen Untersuchungen der Pappeln beschrieben werden. Die notwendigen DNA-Sequenzen stammten dabei aus den folgenden Quellen:

- 1) Primerpaare aus der Arbeit von BRADSHAW ET AL. (1994);
- 2) DNA-Sequenzen in den internationalen DNA-Datenbanken, die von Pappelarten isoliert wurden und deren Funktion bekannt ist;
- 3) Primersequenzen für rDNA mit weitem Anwendungsspektrum aus der Literatur.

3.2.1 PCR-Primer und Untersuchungsmaterial

Tabelle 3-5 führt die einzelnen Primer, ihre Sequenzen und die in der PCR getesteten Temperaturen für das „annealing“ an. Die selbstentworfenen Primer wurden mit Hilfe des Computer-Programmes PCRPLAN des Paketes PC/GENE 6.85 (Oxford Molecular) ausgesucht bzw. auf allgemeine Eignung getestet (Bindung an die DNA-Sequenz, Bindung an sich selbst, optimale „annealing“-Temperatur usw.). Die übrigen PCR-Bedingungen waren identisch mit den in 3.1 angeführten. Zusätzlich wurde in manchen Versuchen das Enzympräparat „AmpliTaQGold“ (Perkin-Elmer) samt mitgelieferter Puffer verwendet.

Zuerst wurden 12-18 Pappelklone geprüft, die Exemplare von *P. nigra*, *P. deltoides*, *P. x euramericana* und Balsampappelkreuzungen enthielten (Tabelle 3-1). Nach erfolgreicher Amplifikation eines DNA-Fragmentes im erwarteten Größenbereich wurden etwaige Größenunterschiede zwischen den Klonen mittels Agarose-Elektrophorese gesucht. Weiters wurde versucht, Polymorphismen innerhalb der Sequenzen mittels Restriktions-Enzym-Analyse (s. 3.1) darzustellen. Die Interpretation der erhaltenen Muster hatte dabei darauf Rücksicht zu nehmen, daß in einem DNA-Fragment mehrere Restriktions-Schnittstellen auftreten können, daß in einem Individuum zwei Varianten (Allele) am selben Genlocus vorhanden sein können und daß manche Genloci in sehr ähnlichen Varianten zwei- oder mehrfach im Kerngenom vorhanden sein können. Diese Tatsachen ergeben komplexere Bandenmuster, als es bei der Analyse der Chloroplasten-DNA der Fall ist. Für die Interpretation solcher Bandenmuster wurden kontrollierte Kreuzungen (Tabelle 3-1) herangezogen.

Tabelle 3-5:
Primer für nukleare DNA-Marker

Bezeichnung	DNA-Sequenz 5'-3'	optimale Temperatur	Quelle
win3-P	CCC GAA GTG TCC AGA GC	50°C	Bradshaw et al. 1994
win3-M	CCC ACT CAA ATA GTC TAC		
P757-P	TTG CAG CAA GAA AGA ATG	55°C	Bradshaw et al. 1994
P757-M	TGC AGG ATC AAT TCC CTC		
P767-P	CTG CAG GCT AAT GTA CCC CTG	55°C	Bradshaw et al. 1994
P767-M	CTG CAG AAG AGG AAC TTC ACG A		
P1018-P	TAT TGT TGG TGG AGC TAA CAT G	55°C	Bradshaw et al. 1994
P1018-M	AAG GGC GAT GTA AAT GAA AAA T		
PPAL-P1	CAA GGC GGT GCT CTT CAG AAG G	65°C	eigener Entwurf auf Basis GenBank Nr. POPPALGA
PPAL-M1	GCT GAG TGA GGC AGT GTG TGG C		
POPX-P5	GTC CAA ATG TGA GCA GCA TTA TCC	62°C	eigener Entwurf auf Basis GenBank Nr. POPP02
POPX-M25	ATC AGT CTG AAG CAG GCC TCG		
ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	58-65°C	White et al. (1990)
ITS 4	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G		
ITS5	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

Selbstentworfenen Primer

In der internationalen DNA-Sequenz-Datenbank GenBank finden sich eine DNA-Sequenz eines Gens (mRNA) für die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) eines *P. trichocarpa* x *P. deltoides* Hybrids (SUBRAMANIAM ET AL. 1993), sowie mehrere Sequenzen desselben Gens (genomische DNA) aus einer Hybrid-Aspe, *Populus* x *kitakamiensis* (*P. sieboldii* x *P. grandidentata*, OSAKABE ET AL. 1995). Das Produkt (Enzym) des PAL-Gens spielt eine Rolle im Ligninaufbau in Pflanzen. Die DNA-Sequenzen wurden zur Entwicklung eines Markers herangezogen. Der genaue Vergleich der Sequenzen mit Hilfe des Computer-Programms NALIGN aus dem PC/GENE Programmpaket ergab, daß die Sequenzen aneinandergereiht werden konnten, wenn die Position des Introns bei der Aspe in der anderen Art überbrückt wurde. Introns unterliegen im Laufe der Evolution nicht denselben rigiden Selektionskriterien wie die exprimierten Teile des Gens, die Exons. Es ist also in den Introns mehr genetische Variation zu erwarten als in den Exons. Dennoch bleibt die Position der Introns in den Genen meist über evolutionäre Zeiträume erhalten.

Deshalb wurden mit Hilfe des Programmes PCRPLAN aus PC/GENE Primer entworfen, die dieses PAL-Intron flankieren und für die *P. trichocarpa* x *P. deltoides*-Sequenz passen, da dieser Hybrid der *P. nigra* und der *P. x euramericana* entwicklungs- geschichtlich näher als die Aspe ist. Zwei geeignete Primer-Sequenzen konnten so gefunden werden.

Diese sollten aus der Aspen-DNA ein Fragment mit ca. 1000 bp amplifizieren, welches das gesamte Intron und die angrenzenden Teile des Exons umfaßt. Unter der Voraussetzung, daß die Primersequenzen in den verschiedenen Arten genügend stark übereinstimmen, sollten die Primer auch aus den hier interessierenden Schwarz- und Hybridpappeln dieses Fragment amplifizieren.

Peroxidasen spielen wichtige Rollen im Stoffwechsel von Pflanzen. Peroxidase-Enzyme und -Gene kommen in größerer Anzahl in den einzelnen Arten vor, man spricht deshalb von einer Genfamilie. Diese Genfamilie kann nach der Substratspezifität der Enzyme, dem Wanderungsverhalten der Enzyme in Elektrophoresegelelen oder nach Verwandtschaftsgraden der Gensequenzen unterteilt werden. Nach der Substratspezifität gibt es z.B. Peroxidasen für spezielle intermediäre Stoffwechselprodukte wie z.B. Ascorbinsäure, oder andere mit breiteren Substratspektren. Peroxidasen können im elektrischen Feld zu unterschiedlichen Polen wandern und werden danach in kathodische und anodische Enzyme unterteilt. Eine Einteilung pflanzlicher Peroxidasen in verschieden nahe miteinander verwandte Gruppen aufgrund von Gensequenzen steckt bisher noch in den Ansätzen (SIMON ET AL. 1996). Offensichtlich sind noch nicht genug Sequenzen bekannt, um klare Abgrenzungen vornehmen zu können, was sicher damit zusammenhängt, daß erst manche Pflanzenarten wie z.B. Kren und Tabak in dieser Hinsicht viel besser untersucht sind als der große Rest der Pflanzenarten. In

jüngster Zeit (1996 und 1997) wurden in den internationalen DNA-Sequenz-Datenbanken auch Sequenzen dieses Gens aus verschiedenen Pappelarten deponiert (s. Tab. 3-6). Primer wurden aus der Sequenz der Peroxidase von *P. nigra* „Italica“, wie sie in Japan untersucht wurde (s. GenBank Acc. Nr. POPP02), entwickelt (Tab. 3-5).

Tabelle 3-6:

Pappel (Populus)-Peroxidase-DNA-Sequenzen in internationalen Datenbanken

Nummer	Beschreibung	
[POPP2]	Aspen prxA4a gene for peroxidase	komplettes Gen - DNA
[POPP01]	Populus nigra mRNA for peroxidase	mRNA komplett
[POPP02]	Populus nigra peroxidase gene	komplettes Gen - DNA
[POPPRXA1]	<i>P. x kitakamiensis</i> gene for peroxidase	komplettes Gen - DNA
[POPPA]	Populus x kitakamiensis mRNA for peroxidase	partiell, mRNA
[POPPB]	Populus x kitakamiensis mRNA for peroxidase	partiell, mRNA
[POPP1]	Aspen prxA3a gene for peroxidase	komplettes Gen - DNA
[POPHPOX14]	<i>P. x kitakamiensis</i> gene for peroxidase	partiell, mRNA
[PTXP1PER]	<i>P. trichocarpa</i> mRNA for anionic peroxidase	partiell, mRNA
[PTXP2PER]	<i>P. trichocarpa</i> mRNA for anionic peroxidase	partiell, mRNA
[PTXP3PER]	<i>P. trichocarpa</i> mRNA for anionic peroxidase	partiell, mRNA
[PTXP4PER]	<i>P. trichocarpa</i> mRNA for anionic peroxidase	partiell, mRNA

3.2.2 Ergebnisse

Primer aus BRADSHAW ET AL. (1994)

Von den 4 getesteten Primerpaaren aus BRADSHAW ET AL. (1994) wurden mit win3 die besten Ergebnisse erzielt: aus allen untersuchten Pappelklonen konnten ein oder mehrere DNA-Fragmente von 100-300 bp Länge amplifiziert werden (s. unten).

Die übrigen Bradshaw-Primer (P757, P767, P1018) brachten unterschiedliche Ergebnisse in der PCR. Oft wurden nur bei wenigen Klonen Banden amplifiziert, manchmal bei gar keinen. Mit P767 wurden bessere Ergebnisse erzielt, sobald ein qualitativ hochwertigeres PCR-Enzym, AmpliTaq Gold (Fa. Perkin-Elmer) verwendet wurde. Es zeigten sich weniger Artefakte, wie sie oft bei PCR-Reaktionen auftauchen. Dennoch

konnten mit diesen drei Primerpaaren keine eindeutig auswertbaren Ergebnisse erzielt werden.

win3

win3 stellt sich in *P. deltoides* bei der Agarose-Elektrophorese als einzelne Bande bei ca. 265 bp dar, während diese Bande in den übrigen Pappelarten außer *P. nigra* bei ca. 165 bp lag. In *P. nigra* traten eine oder zwei Banden auf, wovon die eine mit der 165 bp-Bande der übrigen Arten (außer *P. deltoides*) übereinstimmte. Die andere, nicht in allen untersuchten *P. nigra*-Individuen auftretende Bande lag bei ca. 210 bp. Schließlich zeigten *P. x euramericana*-Klone ein Muster mit den Elementen aus *P. nigra*, *P. deltoides* und einer zusätzlichen Bande oberhalb von 300 bp (Abb. 3-5; HEINZE 1997).

Abbildung 3-5:

Typische Bandenmuster von win3.

- *P. trichocarpa* (1, 2)
- *P. maximowiczii* x *P. trichocarpa* T2 „Androscoggin“ (3)
- *P. maximowiczii* x *P. nigra* (?) T3 „Rochester“ (4)
- *P. maximowiczii* x *P. x berolinensis* T4 „Geneva“ (5)
- *P. nigra* x *P. maximowiczii* (6, 7, 8, 9, 10)
- *P. trichocarpa* x *P. deltoides* (11, 12)
- *P. nigra* (13, 14), *P. deltoides* (15, 16).

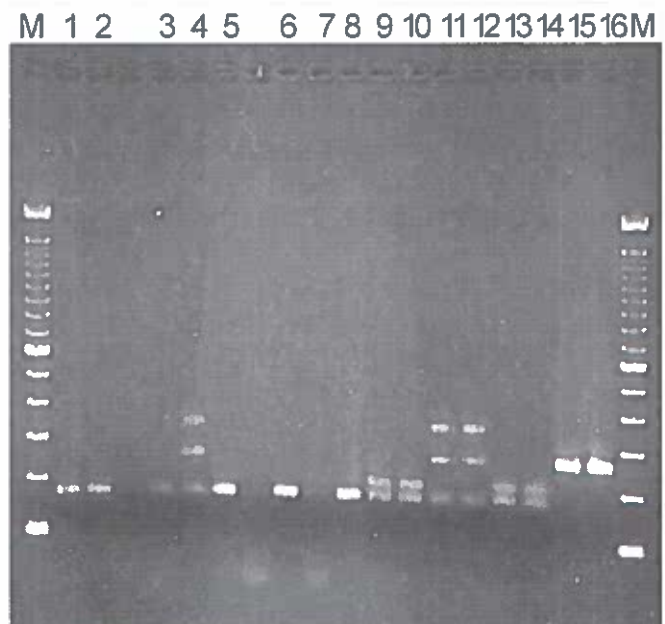
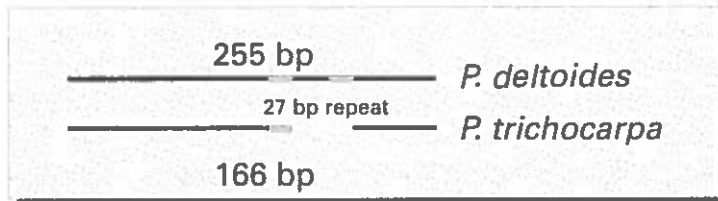


Abbildung 3-6:

„Alignment“ (Schema und Detail-Analyse) der win3-Sequenzen aus *P. deltoides* und *P. trichocarpa*.

a:

Grafik *P. deltoides* - *P. trichocarpa* win3
Längeneinschub - schematisch.



b:

Detaillierter Vergleich - „alignment“ - zwischen den beiden DNA-Sequenzen mittels Programm PC/GENE-NALIGN. Primerpositionen sind fett, die „repeats“ in *P. deltoides* sind unterstrichen gekennzeichnet.

The two sequences to be aligned are:

PTPROINH.
DE POPULUS DELTOIDES SERINE/PROTEINASE INHIBITOR (WIN3.12) GENE,
DE COMPLETE CDS.
OS POPULUS TRICHOCARPA X POPULUS DELTOIDES
Total number of bases: 1589.

PTGWIN3.
DE POPULUS TRICHOCARPA WOUND RESPONSIVE GWIN3 GENE
OS POPULUS TRICHOCARPA
Total number of bases: 1509

Open gap cost:100
Unit gap cost:10

The character to show that two aligned residues are identical is '|'

```

PTPROINH - AAGCTTCCAACATCAATGATTATCTCTCAATAACCATGATTGGCCTAA - 50
          |||
PTGWIN3   - AAGCTTCCAACAT-AATGATTATCTCTCAATAACCATGATTGGTCAAAA - 49
PTPROINH - TAGTTTCTGTGCAAAAACAAACTTTAGAATTAAACTAAGAAAAACCAG - 100
          |||
PTGWIN3   - TAGTTTCTGTGCAAAAACAAA-CTTTAGAATTAAACTAAGAAAAACCAG - 98
                                     win3P
PTPROINH - TTATTGAAGCAAACCTAACCTATATTATTGATTAATCAGGCTCCCGAAGT - 150
          |||
PTGWIN3   - TTATTGAAGCAAACCTAACCTATATTATTGATTAATCAGGCTCCCGAAGT - 148
PTPROINH - GTCCAGAGCAAATAAATGGACCAAAACGTTTTTAGAATACTTGAACGTGT - 200
          |||
PTGWIN3   - GTCCAGAGCAAATAAATGGACCAAAACGTTTTTAGAATACTTGAACGTGT - 198
                                     repeat (27 bp)
PTPROINH - AATCTCATTTTAAATGACTGGTTATGAGCTTGACAGCTCACACTGTTTCAT - 250
          |||
PTGWIN3   - AATCTCATTTTAAATGACTGATTATGAGCTTGACAGCT----- - 236
PTPROINH - GCTTCTCTTTTTTTTATTTTATGTATTCTCGACTTCAACAAAAA - 300
PTGWIN3   - ----- - 236
                                     repeat (27 bp)
PTPROINH - AAATGACTGGTTATGAGCTTGACAGCTTAAATTTGATTGGAAGGTGTAAT - 350
          |||
PTGWIN3   - -----TAAATTTGATTGGAAGGTGTAAT - 259
                                     win3M
PTPROINH - TAGTAGTTTAAATTGAAGTTATTTATAAAGTAGACTATTTGAGTGGGTTT - 400
          |||
PTGWIN3   - TAGTAGTTTAAATTGAAGTTATTTATAAAGTAGACTATTTGAGTGGGTTT - 309
PTPROINH - TGTTCAATTTTATACATGGTGTATTATTTTGAGTTGTCAAGTTCACCAAT - 450
          |||
PTGWIN3   - TGTTCAATTTTATACATGGTGTATTATTTTGAGTTGTCAAGTTCACCAAT - 359

```

Zur Aufklärung der Vererbungsmodalitäten dieser Banden wurde die SSCP-Analyse eingesetzt (s. 3.1). Bei dieser Elektrophoresetechnik wird die in Einzelstränge getrennte DNA in speziellen Polyacrylamidgelen nach ihren Sequenzeigenschaften aufgetrennt. Für *P. deltoides* oder *P. trichocarpa* traten jeweils zwei Banden auf, die deutlich voneinander getrennt waren. *P. nigra* zeigte zwei bis vier einzelne Banden, die im Bereich der *P. trichocarpa*-Banden lagen und zwischen den untersuchten *P. nigra*-Klonen Variation zeigten. Hybridklone aus *P. deltoides* und *P. nigra* zeigten in dieser Analyse ein additives Muster aus den beiden Elternarten ohne zusätzliche Banden, wie sie bei der Agarose-Elektrophorese aufgetreten waren. Die Analyse einer kontrollierten Kreuzung aus *P. deltoides* \times *P. nigra* („Sárvár 1“, GERGACZ 1988/89) zeigte, daß alle Banden der Eltern sich auch in den Nachkommen finden.

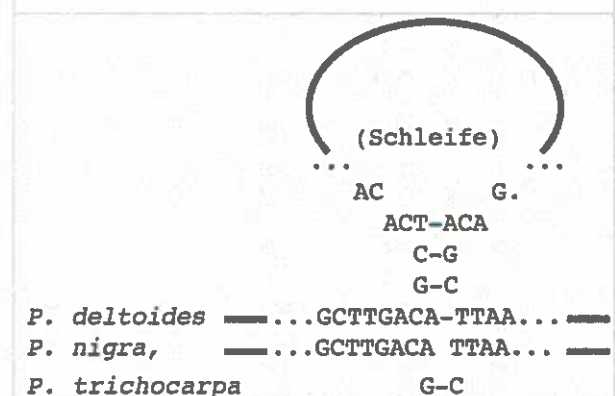
In den internationalen DNA-Gen-Datenbanken sind Beispielsequenzen dieses Abschnittes aus *P. deltoides* und *P. trichocarpa* zu finden. Es handelt sich um ein Gen mit der vermuteten Funktion eines Serin-Proteinase-Inhibitors, das bei Verwundungen des Pflanzengewebes aktiviert wird (HOLICK & GORDON 1995). Bei einem detaillierten Vergleich dieser Sequenzen („alignment“-Analyse) fällt auf, daß sich der Größenunterschied zwischen den Fragmenten beider Arten, der tatsächlich 255 zu 165 bp beträgt, am einfachsten durch die Annahme eines Einschubes von ca. 90 bp in *P. deltoides* erklären läßt, der mit einer Verdoppelung einer Sequenz von 27 bp („repeat“) einhergeht (Abb. 3-6). Die Daten aus der Agarose-Elektrophorese überschätzen die Länge der DNA-Sequenz um 3,9 bzw. 0,6 %. Das kann auf die der Agarose-Elektrophorese innewohnende Ungenauigkeit (± 5 %) und/ oder auf Polymorphismen zwischen den von HOLICK & GORDON (1995) und in dieser Arbeit analysierten Klonen zurückzuführen sein.

Somit bietet sich als Erklärungsmöglichkeit für die Elektrophorese-Muster folgender Sachverhalt an: die Sequenz dieses Genes hat im Lauf der Evolution der Pappelarten in *P. deltoides* einen Einschub von ca. 90 bp erhalten, der mit der Verdoppelung von 27 bp einherging. So entstanden in den reinen Arten *P. deltoides* und *P. trichocarpa* Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Banden in *P. nigra* sind am einfachsten durch eine Genverdoppelung zu erklären. Die alternative Annahme von unterschiedlichen Allelen an nur einem Locus in *P. nigra* erscheint durch die SSCP-Analyse der kontrollierten Kreuzung widerlegt, da in deren Nachkommen diese Allele nicht segre-

gieren. Während nun *P. x euramericana*-Klone in der SSCP-Analyse additive Muster der Elternarten aufweisen, treten in der Agarose-Elektrophorese Banden auf, die in keinem Elternteil vorkommen. Diese können am besten durch die Bildung von Heteroduplex-DNA-Molekülen in den letzten Zyklen der PCR erklärt werden. Dabei lagern sich je ein Einzelstrang der *P. deltoides*- und der *P. nigra*-eigenen DNA zusammen und bilden einen Hybrid-Doppelstrang. Dessen Bildung wird durch die höhere Konzentration an DNA in den letzten PCR-Zyklen begünstigt. Dieser Hybrid-Doppelstrang könnte durch einige Basen am Ende des repeats stabilisiert werden (Abb. 3-7). In der Agarose-Elektrophorese würde dieser Hybrid-Doppelstrang durch die absteigende Schleife verlangsamt werden, wodurch sich die scheinbar höhermolekulare Bande bei über 300 bp erklären ließe. In der SSCP-Analyse liegen Einzelstränge vor; die Hybrid-Doppelstrang-Bande kann also nicht beobachtet werden.

Abbildung 3-7:

Modell für die Schleifenbildung von Heteroduplex-DNA bei der Analyse von Hybridpappeln mit win3.



PPAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase

PCR-Reaktionen mit den entworfenen Primern und 12 Pappelklonen zeigten eine Bande bei ca. 1000 bp. Bei Verdau mit dem Restriktions-Enzym Hinf I entstanden daraus zwei Banden bei ca. 800 und 200 bp. Auch die Restriktions-Enzyme Rsa I und Msp I bewirkten einen Abbau des Fragmentes. Beim Ansatz mit Hae III zeigten sich Banden bei ca. 350 und 650 bp, wobei im Bereich 350 bp bei manchen Klonen mehrere Banden zu sehen waren. Meist handelte es sich dabei um *P. x euramericana*-Hybride oder *P. deltoides*-Klone. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe der kontrollierten Kreuzungen den Erbgang der Fragmente dieses Gens nachzuvollziehen. Dabei fiel

zunächst ein segregierendes Allel in der *P. deltoides* S-307-24 und ihren Nachkommen (Familie „Sárvár 2“, GERGACZ 1988/89) auf, bei dem die 650 bp-Bande in zwei Teile von ca. 220 und 420 bp zerfiel. Dieses Allel wurde mit „D2“ bezeichnet. Die Interpretation der übrigen Banden bei etwa 350 bp gestaltete sich etwas schwieriger; hier war die Beziehung der vom Istituto Sperimentazione di Poppicoltura (Casale Monferrato, Italien) zur Verfügung gestellten Rückkreuzung (*P. deltoides* x *P. nigra*) x *P. nigra* hilfreich. Die plausibelste Erklärung für die beobachteten Bandenmuster ist die Annahme unterschiedlicher Allele in den Arten *P. nigra* und *P. deltoides*, wobei jenes der *P. deltoides* (D1) etwas länger sein dürfte. Ähnlich wie schon bei win3 entstehen wahrscheinlich wieder durch die Aneinanderlagerung von ähnlichen, aber nicht vollkommen komplementären Einzelsträngen zusätzliche, in den Eltern nicht nachweisbare Banden.

Dieser Genabschnitt liefert also einen zusätzlichen Marker für die Introgression von Allelen der *P. deltoides* in den Genpool von *P. nigra*. Deshalb wurde eine Reihe von österreichischen *P. nigra*-Herkünften damit untersucht (Kap. 3.3).

POPX: Peroxidase

Die Primer (Tab. 3-5) amplifizierten eine Bande oder ein unscharf getrenntes Gemisch von Banden bei ca. 1100-1250 bp. Diese Amplifikations-Produkte wurden mit mehreren Restriktions-Enzymen behandelt, um so mögliche Polymorphismen zu finden. Es konnte eine Reihe solcher Polymorphismen gefunden werden.

Bei Behandlung mit dem Enzym Msp I zeigten sich invariante Banden bei ca. 200 bp und 1000 bp. Polymorphismen traten in Form von Banden bei ca. 300, 650, 700 und 800 bp auf (Abb. 3-8). Von diesen war die Bande bei 800 bp in *P. nigra* und *P. x euramericana*, jene bei ca. 700 bp vornehmlich in *P. trichocarpa*-Klonen zu finden. Verdau mit Hinf I brachte 4 invariante Banden (2 x ca. 200 bp, 300 bp und 450 bp) und 3 variable Banden zutage (ca. 310 bp, 400 bp, 500 bp).

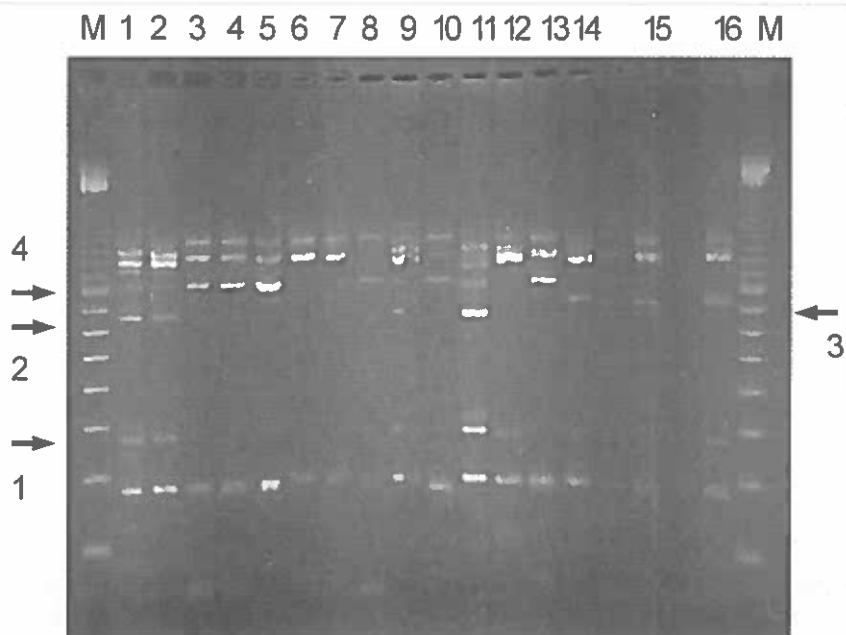
Eine genauere Betrachtung ergab, daß die Banden 650 bp (Msp I-Verdau) + 400 bp (Hinf I-Verdau) einerseits sowie 500 bp (Msp I) + 700 bp (Hinf I) jeweils in der Mehrzahl der untersuchten Klone zusammen vorkamen (70 von 72 bzw. 68 von 72 Klonen). Es handelt sich also höchstwahrscheinlich um dieselben Allele, die mit unterschiedlichen Enzymen detektierbar sind. Die wenigen Ausnahmen könnten auf Beurteilungs- oder Analysefehler zurückgehen, oder weitere Allele darstellen. Mit diesen Banden stehen also Marker für Balsampappeln zur Verfügung, und solche, die innerhalb der *P. nigra* Variabilität aufzeigen.

ITS

Diese Primer wurden für die Amplifizierung der internen „Spacer“ (Abstandhalter-DNA) der rDNA entworfen (WHITE ET AL. 1990; s. Kapitel 2.5). Ursprünglich dienten pilzliche DNA-Sequenzen als Grundlage für das Primer-Design. Später stellte sich heraus, daß auch Pflanzen-rDNA damit analysiert werden kann. Dabei kann es aber zu Komplika-

Abbildung 3-8:
Typische Bandenmuster von POPX
- Msp I. Pfeile weisen auf die
entsprechend bezeichneten Banden.

- *P. deltoides* (1, 2, 8, 9)
- *P. nigra* (3, 4, 5, 13, 14)
- *P. x euramericana* (10, 11, 12)
- *P. nigra* x *P. maximowiczii* (15)
- *P. trichocarpa* (16)



tionen durch Verunreinigungen der DNA-Präparate kommen, etwa durch pilzliche Endophyten in Bäumen (CAMACHO ET AL. 1997).

Bei der Analyse dieser Sequenzen in Pappeln traten mehrere Banden im Bereich von 600–800 bp auf. Hierbei ist der von PRADO ET AL. (1996) festgestellte Sachverhalt, wonach in manchen Pappelarten mehrere rDNA-Genloci auftreten, in Erinnerung zu rufen. Eine einfache genetische Interpretation war demnach nicht möglich. Die Muster waren nicht eindeutig wiederholbar und konnten daher nicht zur Analyse herangezogen werden.

3.2.3 Diskussion

Mit den vorgestellten Markern kann genetische Variation auf mehreren Ebenen analysiert werden. Die ca. 250 bp-Bande von win3 und eine Bande in POPX - Msp I stellen Marker für die Arten *P. deltoides* bzw. *P. trichocarpa* und andere Balsampappeln dar. Die Marker finden sich in den reinen Arten und in allen Hybriden der ersten Generation. Zur Untersuchung der Introgression sind sie insofern bestens geeignet, als bei ihrer Anwesenheit zwingend auf eine Beteiligung der betreffenden Art am untersuchten Individuum geschlossen werden kann. Der Umkehrschluß gilt nicht: Abwesenheit des Markers ist in Hybriden der zweiten und späteren Generationen mit den Mendelschen Vererbungsregeln möglich. Allerdings erlaubt die gleichzeitige Betrachtung mehrerer solcher Marker Aussagen über die Wahrscheinlichkeit, ob tatsächlich keine Introgression vorliegt. Die Sicherheit der Aussage steigt mit der Anzahl der Marker.

Daneben gibt es Marker, die innerhalb von Arten Polymorphismen zeigen. Dazu gehört die oberste variable Bande im Muster POPX - Msp I und die fallweise auftretende zweite Bande in win3, die in *P. nigra* polymorph sind, und die Bande D2 in PPAL, die auf *P. deltoides* zurückgeht. Diese Banden finden sich in manchen, aber nicht allen Hybriden, an denen die jeweiligen reinen Arten beteiligt sind. Für die Beurteilung der Introgression bieten sie etwas weniger Sicherheit, da aus ihrer Abwesenheit nicht unbedingt auf Abwesenheit von Introgression geschlossen werden kann. Sie erlauben aber Aussagen über die Einheitlichkeit von beernteten Beständen. Sobald sich zwei Varianten innerhalb eines Bestandes finden, kann es sich nicht um einkloniges Material handeln. Durch die Kombination mehrerer einzelner Marker-Genotypen ergeben sich im Falle von nicht verklonten Pflanzen, die aus Samen entstanden sind,

meist weitere unterscheidbare Genotypen. Die variablen und die artspezifischen Banden können auch zur Charakterisierung von Hybridpappeln verwendet werden. Artspezifische Banden legen den Typ der Kreuzung fest, während die variablen Banden Klone unterscheidbar machen.

Die Marker trnD-trnT, win3 und PPAL - Hae III wurden deshalb zur Beschreibung von Introgression in Restvorkommen der Schwarzpappel eingesetzt (Kapitel 3.3). Zusätzlich zu diesen Markern wurden auch POPX - Msp I und POPX - Hinf I zur Charakterisierung der Hybridpappeln verwendet (Kapitel 4).

3.3 Reihenuntersuchungen zur Introgression

Die in den Kapiteln 3.1 und 3.2 diskutierten Analysen wurden zur Beurteilung der Introgression von Hybridpappeln mit der einheimischen *P. nigra* herangezogen. Dabei wurde Untersuchungsmaterial aus den folgenden Quellen bezogen:

- 1) Knospen aus vier Beständen unterschiedlichen Alters im Wiener Raum;
- 2) Knospen von Stechhölzern aus einem Großteil des österreichischen Verbreitungsgebietes, die für die Anlage einer repräsentativen Klon Sammlung gesammelt wurden (HEINZE 1998 c);
- 3) Knospen- und Blattmaterial von Sämlingen, die aus selbstgeerntetem Saatgut gezogen wurden.

Die ökologischen Bedingungen der einzelnen Standorte, von denen das Probenmaterial stammt, reichen von einzelnstehenden Bäumen in der Kulturlandschaft bis zu alten Beständen im Nationalpark Donau-Auen.

3.3.1 Untersuchte Klone und DNA-Marker

Ortsbezeichnungen und die genauen geographischen Koordinaten des Untersuchungsmaterials sind in Tabelle 3-7 angeführt. Es wurden sowohl Knospen und Blätter von Bäumen nahezu jeden Alters als auch Keimlinge oder im Versuchsgarten aus Samen gezogene Pflanzen untersucht.

Es wurden die in Kapitel 3.1 und 3.2 vorgestellten Marker angewendet. Dabei diente für die Beurteilung der Chloroplasten-DNA hauptsächlich nur Primerpaar trnD-trnT, da die Unterschiede zwischen *P. nigra* einerseits und *P. deltoides* und *P. x euramericana* andererseits mit diesem Marker bereits ohne Durchführung der Restriktions-Analyse darstellbar sind. Von den nuklearen Markern wurde annähernd das gesamte Material mit win3, ein Großteil auch mit PPAL - Hae III (Kapitel 3.2) untersucht. Andere in Kapitel 3.2

Tabelle 3-7:
Untersuchungsmaterial für Introgression von *P. x euramericana* und *P. nigra*

Name Klon/ Herkunft	Nummern	Bundesland	Bezirk	Ort	Jahr der Sammlung	Geograph. Breite	Geograph. Länge	Seehöhe (m)	Wuchshöhe (m)	Beschreibung
Anthering	1-8	S	Salzburg Umgebung	Anthering	1996	47°52' N	13°00' O	407	7.1	Altbäume
Ostermiething-Ettenau	1-6	OÖ	Braunau am Inn	Ostermiething	1996	48°05' N	12°46' O	370	7.1	Altbäume
Mühlheim Mamling	1-13	OÖ	Braunau am Inn	Untersünzing	1996	48°18' N	13°11' O	330	7.1	Altbäume
Feldkirchen	1, 2	OÖ	Urfahr-Umgebung	Feldkirchen	1996	48°21' N	14°03' O	268	7.2	Altbäume
Traun	1-21	OÖ	Linz-Land	Oedt	1996	48°12' bis 48°13' N	14°10' bis 14°14' O	275-285	7.2	vorw. Altbäume
Puchenuau		OÖ	Urfahr-Umgebung	Puchenuau	1996	48°19' N	14°14' O	262	9.1	Altbäume
Steyr		OÖ	Steyr-Stadt	Steyr	1996	48°03' N	14°26' O	298	7.2	Altbäume
Melk	1-24	NÖ	Melk	Melk	1995	48°14' N	15°20' O	212	7.2	Sämlinge
Krems-Egelsee	1, 2	NÖ	Krems Stadt	Egelsee	1997	48°25' N	15°34' O	480	9.2	Altbäume
Unterer Kamp		NÖ	Krems Land	Schönberg	1996	48°29' bis 48°32' N	15°42' O	210-260	8.1	Sämlinge
Grafenegg/ Seebarn	1-50	NÖ	Tulln	Seebarn am Kamp	1997	48°23' bis 48°24' N	15°46' bis 15°49' O	187	8.1	Altbäume, Ausschlag und Anflug
Ochsenburg	1-3	NÖ	St.Pölten Land	Ochsenburg	1995	48°08' N	15°38' O	302	7.2	Sämlinge
Pruwitz		NÖ	St.Pölten Land	Pruwitz	1997	48°23' N	15°48' O	184	8.1	Altbäume und Ausschlag
Klosterneuburg	1-17	NÖ	Wien Umgebung	Klosterneuburg	1997	48°20' N	16°20' O	169	8.1	vorw. Altbäume
Schwarzlackenau	1-50	W	21. Bezirk	Schwarzlackenau	1996	48°16' N	16°21' O	166	8.1	1-3 jähriger Anflug
Friedensbrücke, Spittelau	1	W	9. Bezirk	Friedensbrücke	1996	48°14' N	16°22' O	164	8.1	Anflug
Donaukanal Radweg		W	19. Bezirk	Heiligenstadt	1996	48°14' bis 48°15' N	16°22' O	164	8.1	Sämlinge
Brigittaspitz	1-28	W	20. Bezirk	Brigittenau	1995	48°16' N	16°22' O	164	8.1	Sämlinge
Donauinsel	„Mitte“ 1-92, „Nord“ 1-3	W	21. Bezirk	Donauinsel	1995	48°14 bis 48°17' N	16°22' bis 16°24' O	160-164	8.1	Sämlinge
Mariabrunn städt. Wienfluschaufsicht		W	14. Bezirk	Mariabrunn	1996	48°13' N	16°14' O	226	8.1	Sämlinge
Mariabrunn Hybridpappel		W	14. Bezirk	Mariabrunn	1995, 1996	48°13' N	16°14' O	226	8.1	Sämlinge
Untere Lobau; Lettenhauften	11-31 bzw. 1-55	W	22. Bezirk	Donaustadt	1997	48°09' N	16°33' O	152	8.1	vorw. Altbäume
Untere Lobau Lettenhauften, Sämlinge		W	22. Bezirk	Donaustadt	1996	48°09' bis 48°10' N	16°32 bis 16°35' O	150-158	8.1	Sämlinge

Name Klon/ Herkunft	Nummern	Bundes- land	Bezirk	Ort	Jahr der Sammlung	Geograph. Breite	Geograph. Länge	Seehöhe (m)	Wuchs- gebiet	Beschreibung
Albern	1-22, 26-44	W	23. Bezirk	Albern	1996	48°10' N	16°29' O	160	8.1	Altbäume
Mannswörth	1-50	NÖ	Wien-Umgebung	Mannswörth	1996	48°08' N	16°33' O	160	8.1	Anflug
Fischamend	2	NÖ	Wien-Umgebung	Fischamend	1996	48°07' N	16°37' O	155	8.1	Altbäume
Haslau	1-10	NÖ	Bruck an der Leitha	Haslau	1997	48°07' N	16°44' O	140	8.1	Anflug und Altbäume
Petronell		NÖ	Bruck an der Leitha	Petronell	1997	48°07' N	16°52' O	145	8.1	Altbäume
Hainburg	1-12	NÖ	Bruck an der Leitha	Hainburg	1997	48°09' bis 48°10' N	16°57' bis 16°59' O	140-150	8.1	Altbäume
Eckartsau Pflanzgarten	1-25	NÖ	Gänserndorf	Eckartsau	1997	48°08' N	16°48' O	147	8.1	Anflug
Eckartsau - Orth	26-41	NÖ	Gänserndorf	Orth an der Donau - Eckartsau	1997	48°07' bis 48°09' N	16°43' bis 16°48' O	145-149	8.1	vorw. Altbäume
Puxer Au	Stmk 4, 6, 7	ST	Murau	Pux	1997	47°08' N	14°20' O	751	1.3	Altbäume
Hirschfeld-Scheifling-Unzmarkt	Stmk 9	ST	Murau	Hirschfeld	1997	47°10' N	14°25' O	745	1.3	Altbäume
Schalldorf-Graschnitz	Stmk 2,3	ST	Bruck an der Mur	Graschnitz	1997	47°28' N	15°21' O	538	3.1	Altbäume
Aichfeld-St. Lorenzen-Prag	Stmk 10,11	ST	Knittelfeld	St. Lorenzen	1997	47°16' N	14°55' O	600	3.2	Altbäume
St. Dionysen Kw	Stmk 12-14	ST	Bruck an der Mur	St. Dionysen	1997	47°25' N	15°14' O	595	3.1	Altbäume
Grenz-Mur	Stmk 15-27	ST	Bad Radkersburg	Oberschwarza - Diepersdorf	1997	46°42' bis 48°44' N	15°39' bis 15°50' O	227-247	8.2	Altbäume
Leibnitzer Feld	Stmk 28-46	ST	Leibnitz	Ehrenhausen - Wildon	1997	46°44' bis 46°53' N	15°32' bis 15°35' O	255-296	8.2	Altbäume
St. Johann ob Hohenburg		ST	Voitsberg	St. Johann ob Hohenburg	1997	47°01' N	15°14' O	364	8.2	Altbaum
Lobau Ölhafen- Donau-Oder-Kanal		W	22. Bezirk	Donaustadt	1996	48°10' N	16°32' O	158	8.1	Sämlinge
Kalvarienberg Stiefern-Schönberg		NÖ	Krems Land	Schönberg	1996	48°32' N	15°42' O	260	8.1	Sämlinge
Lobau Rettungshaus		W	22. Bezirk	Donaustadt	1996	48°09' N	16°33' O	152	8.1	Sämlinge
Zöbinger Langenlois Kamp		NÖ	Krems Land	Zöbinger	1996	48°29' N	15°42' O	210	8.1	Sämlinge
Lobau Kreuzgrund Heißblände		W	22. Bezirk	Donaustadt	1996	48°10' N	16°33' O	153	8.1	Sämlinge
Lobau Heißblände Kühwörther Wehr		W	22. Bezirk	Donaustadt	1996	48°09' N	16°35' O	150	8.1	Sämlinge
Heiligenstadt Radweg Boku Neubau		W	19. Bezirk	Heiligenstadt	1996	48°15' N	16°22' O	164	8.1	Sämlinge
Spittelau Radweg Donaukanal		W	9. Bezirk	Spittelau	1996	48°14' N	16°22' O	164	8.1	Sämlinge
Radweg Donaukanal Spittelau-Münze		W	9. Bezirk	Spittelau	1996	48°14' N	16°22' O	164	8.1	Sämlinge (17)

Tabelle 3-8:
Analysiertes Material für Introgression (Anzahl Pflanzen für jeden Marker)

Herkunft/ Standort	Material	win3	trnD- trnT	PPAL - Hae III	andere
Anthering	Blätter	7			
Ostermiething - Ettenau	Blätter	3			
Mühlheim	Blätter	8			
Feidkirchen	Knospen	2		2	
Traun	Knospen	17		20	
Puchenu	Knospen	1		1	
Steyr	Knospen	3		2	
Melk	junge Blätter	23		23	trnM-trnS: 5
Zöbing/ Kamp	Knospen	2	2	2	
Kaivarianberg Stiefern-Schönberg/ Kamp	Knospen	2	2	2	
Krems	Knospen	2	2	2	
Grafenegg Seebarn	Knospen	47	50	41	POPX - Msp I: 46
Ochsenburg	junge Blätter	3	3	3	
Prenowitz	Knospen	6	7	7	
Klosterneuburg	Knospen	15	16	15	POPX - Msp I: 12, POPX - Hinf I: 16
Schwarzlackenau	Knospen	30	36		
Friedensbrücke, Spittelau	Knospen	2	2		
Donaukanal-Radweg "Münze"	Keimlinge	17			
Donaukanal-Radweg Spittelau nordöstl. Brücke	Knospen	2	2	2	
Donaukanal-Radweg Boku Neubau	Knospen	2	2	2	
Donaukanal-Radweg Altbaum zw. Spittelau und Friedensbrücke	Knospen	2	2	2	
Donaukanal-Radweg "Gösser-Münze"	Knospen	2	2	2	
Brigittaspitz	junge Blätter	10	10	10	
Donauinsel Mitte	junge Blätter	26	27	28	
Donauinsel Nord	junge Blätter	3		3	
MB Hybrid Sämlinge	junge Blätter			14	
MB Wienflüßaufsicht	Knospen	39	45	47	POPX - Msp I: 37
Das Schwarze Loch Lobau	junge Blätter	9	12		
Lobau Altpappeln bei Hybridpappel-Plantage	Keimlinge	16		16	
Lettenhaußen	Knospen	53		41	trnGM-ORF62P: 35, POPX - Msp I: 47
Untere Lobau	Knospen	21	19	20	
Lobau Kreuzgrund	junge Blätter	13	18	6	
Lobau Heißblände Kühwörther Wehr	Knospen	2	2	2	
Lobau Kreuzgrund Heißblände	Knospen	2	2	2	
Lobau Ölhafen Donau-Oder-Kanal	Knospen	2	2	2	
Lobau Gänshaußen	Knospen	2	2	2	
Lobau Rettungshaus	Knospen	2	2	2	
Albern	Knospen	39	39	37	trnGM-ORF62P: 33, POPX - Msp I: 36
Mannswörth	Knospen	50	49	43	
Fischamend	Knospen	1	1	2	
Heslau	Knospen	7	8	2	POPX - Msp I: 9
Petronell	Knospen	15	12		
Heinburg	Knospen	10	10	9	
Eckartsau	Knospen	25	37	38	
Steiermark	Knospen	31	40	34	
St. Johann - Flecker-Kreuz	Knospen	1	1		

erwähnte Marker wurden nur für wenige Herkünfte angewendet. Eine Übersicht gibt Tabelle 3-8.

Eine Pflanze wurde dann als nicht mehr „reine“ Schwarzpappel qualifiziert, wenn mindestens einer der untersuchten Marker die für *P. deltoides* / *P. x euramericana* typische Ausprägung aufwies. In ähnlicher Weise wurden Bestände beurteilt. Der Anteil von Hybridpappel-beeinflußten Pflanzen im Bestand wurde als Prozentsatz der Pflanzen mit Chloroplasten-Markern oder Kern-DNA-Markern berechnet, die nicht der Schwarzpappel entsprechen.

3.3.2 Ergebnisse

Der überwiegende Teil der untersuchten Pflanzen und Herkünfte wies in allen untersuchten Merkmalen die für *P. nigra* typischen Marker auf. Die gefundenen Abweichungen von dieser genetischen Konstellation sind in Tabelle 3-9 angeführt. Dabei handelt es sich um:

- 1) Samenpartien direkt von Hybridpappeln geerntet oder unter alten Hybridpappeln aufgelesen;
- 2) einen Bestand im oberen Murtal / Steiermark außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes, der somit vermutlich aus gesetzten Hybridpappeln besteht;
- 3) einzelne offensichtlich aus Samenanflug hervorgegangene Bäume vorwiegend jüngeren Alters (bis ca. 20 Jahre) und

4) um möglicherweise durch Ausschlag von Hybridpappel-Wurzelstöcken entstandene Bäume.

Diese letztere Kategorie betraf z.B. zwei Bäume auf einer ca. 60jährigen Fläche in Wien.

Bei den direkt von weiblichen Hybridpappeln gewonnenen Samen (Fall 1), die zum Großteil keimfähig sind, wurde ein buntes Sammelsurium von genetischen Konstellationen gefunden. Das wird aufgrund der Mendelschen Vererbungsregeln dann erwartet, wenn Kreuzungen von Hybridpappeln untereinander oder mit Schwarzpappeln stattgefunden haben. Es fanden sich darunter auch Kern-DNA-Marker der *P. deltoides* in der reinerbigen Konstellation (z.B. Samencharge „Melk“). Eine solche Konstellation kann nur entstehen, wenn sich *P. deltoides* oder ihre Hybriden untereinander kreuzen. Im vorliegenden Fall handelt es sich also mit höchster Wahrscheinlichkeit um Nachkommen einer Kreuzung *P. x euramericana* X *P. x euramericana*. Bei den Fällen 2 und 4 zeigten die Marker die für Hybridpappeln der ersten Generation typische Konstellation: die Chloroplasten-Marker entsprachen *P. deltoides*, und die untersuchten Kern-DNA-Marker wiesen je ein Allel von *P. nigra* und eines von *P. deltoides* auf. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei diesem Material tatsächlich um Hybriden der ersten Generation handelt, die durch Pflanzung dort etabliert wurden und sich z.B. durch Stockausschlag auch nach der ersten Umtriebszeit halten konnten. Der Fall 3 betrifft die eigentliche

Tabelle 3-9:
Individuen mit Hybridpappel-beeinflußten Mustern

Herkunft	Nummer	Chloroplasten-Typ	untersuchte nukleare Marker; Typ	Mindest-Anteil Hybridpappel
Grafenegg/ Seebarn	4, 5, 6	<i>P. nigra</i>	<i>P. nigra</i> (win3); <i>P. x euramericana</i> (PPAL) ?	3/50 (6 %) ?
Melk	1-24	<i>P. deltoides</i>	Segregation: win3-Typen: 14 x <i>P. nigra</i> , 8 x <i>P. x euramericana</i> , 1 x <i>P. deltoides</i> ; PPAL - Msp I - Typen: 7 x <i>P. nigra</i> , 14 x <i>P. x euramericana</i> , 2 x <i>P. deltoides</i>	100 %
Klosterneuburg	14	<i>P. deltoides</i>	<i>P. x euramericana</i>	1/17 (5,8 %)
Mariabrunn Hybridpappel Südgarten	1-15	<i>P. deltoides</i>	win3-Typen: 8 x <i>P. nigra</i> , 4 x <i>P. x euramericana</i> , 2 x <i>P. deltoides</i>	100 %
Albern	10, 13, 41	<i>P. deltoides</i>	<i>P. x euramericana</i> (win3, PPAL)	3/39 (7,6 %)
Mannswörth	45 48	<i>P. deltoides</i> <i>P. deltoides</i>	<i>P. nigra</i> (win3), <i>P. euramericana</i> (PPAL) <i>P. deltoides</i> (win3, PPAL)	2/50 (4 %)
Steiermark (Puxer Au)	4, 6, 7	<i>P. deltoides</i>	<i>P. deltoides</i> (win3, PPAL)	3/3 (100 %)

Introgression, also die schleichende Vermischung der Arten. Auf diesen Umstand weist die eigentümliche Marker-Konstellation an manchen dieser Pflanzen hin. Es wurde nämlich an manchen Genmarkern die *P. nigra* - typische, an anderen die auf Hybriden hinweisende Konstellation gefunden. Daraus läßt sich schließen, daß es sich um Kreuzungen Hybrid x Schwarzpappel handelt. Der Chloroplasten-Marker weist darauf hin, daß in den bisher aufgetretenen Fällen Hybridpappelklone als Samenbäume anzunehmen sind. Die Bestäubung erfolgte demnach durch *P. nigra* - Pollen. Der umgekehrte Fall der Bestäubung einer weiblichen *P. nigra* durch Hybridpappel-Pollen männlicher Klone trat im Untersuchungsmaterial nur bei drei Pflanzen aus Stockausschlag im Revier Seebarn der Forstverwaltung Grafenegg auf: Am PPAL - Hae III - Marker wiesen diese das typische Hybrid-Muster auf, während alle anderen Marker auf typische *P. nigra* hinwiesen. Dieser Fall könnte aber nicht nur eine Einkreuzung, sondern alternativ auch ein bisher nicht entdecktes *P. nigra* - Allel darstellen.

3.3.3 Diskussion

Die Ergebnisse lassen die folgenden Schlüsse zu: Hybridpappeln vermehren sich auch auf generativem Weg; Sämlinge von Hybridpappeln können sich auch unter natürlichen Bedingungen halten; und gepflanzte Hybridpappeln oder Stockausschläge können relativ leicht mit einheimischen Schwarzpappeln verwechselt werden. Dennoch besteht die überwiegende Mehrheit des untersuchten Materials aus „reinen“ Schwarzpappeln, wofür verschiedene Faktoren verantwortlich sein können.

Die Möglichkeit, daß sich Hybridpappeln auf generativem Weg, also über Samen und Pollen, vermehren können, wurde offenbar bisher unterschätzt. Hybridpappeln wurden teilweise für steril gehalten, teilweise hielt man sie deswegen für fortpflanzungsunfähig, weil nach Entfernung der Schwarzpappeln in der Nähe männlicher Sorten keine Verjüngung gefunden wurde (WENDELBERGER-ZELINKA 1952). Tatsächlich aber scheint es keine generelle Sterilität der Hybridpappelklone zu geben. Hybridpappeln lassen sich untereinander in verschiedenen Kombinationen und mit Schwarzpappeln im Glashaus künstlich kreuzen. Allenfalls könnte man herabgesetzte Fertilität vermuten. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen, daß solche Kreuzungen auch unter natürlichen Bedingungen am Standort vorkommen. Dabei kreuzen sich

sowohl Hybridpappeln untereinander, wie in der Samencharge „Melk“, als auch weibliche Hybridpappeln mit einheimischen Schwarzpappeln, wie zumindest eine am Standort Mannswörth aufgefundene Pflanze zwingend beweist. Diese Kreuzungen sind rein äußerlich nicht von Schwarzpappel-Sämlingen zu unterscheiden.

Eine Selektion am natürlichen Standort gegen diese Produkte der Introgression scheint möglich (LEGIONNET & LEFEVRE 1996), läßt sich aus den vorliegenden Daten jedoch nicht ableiten. Immerhin sei festgehalten, daß unter den im Versuchsgarten gezogenen Sämlingen solche von Hybridpappeln eine etwas höhere Ausfallsrate zu zeigen scheinen.

Während die generative Vermehrung weiblicher Hybridpappeln nachgewiesen werden konnte, fehlen zwingende Nachweise für die Bestäubung von Schwarzpappeln durch Pollen männlicher Hybridpappeln. Nur im Fall der Hybridpappel-Absaaten muß Hybridpappel-Pollen beteiligt gewesen sein (die drei eigentümlichen Seebarn PPAL - Hae III - Muster könnten, müssen aber nicht auf Hybridpappel-Pollen zurückzuführen sein). Die Möglichkeit der Bestäubung von weiblichen *P. nigra* - Bäumen durch Hybridpappel-Pollen kann aber aufgrund der erhobenen Daten keinesfalls generell ausgeschlossen werden. Im Gegenteil scheint eine solche Konstellation aus statistischen Überlegungen plausibel. Es wurden außer unter weiblichen Hybridpappeln nur wenige Exemplare von Kreuzungen weiblicher Hybridpappeln mit Schwarzpappel-Pollen gefunden. Wenn Kreuzungsprodukte von weiblichen *P. nigra* mit *P. x euramericana*-Pollen ähnlich selten sind, könnten sie rein zufällig nicht in den Stichproben vorhanden gewesen sein.

Eine Erklärungsmöglichkeit für tatsächliche Häufigkeitsunterschiede zwischen den beiden Richtungen der Rückkreuzung wäre in der Dauer und im Zeitpunkt der Blühperiode zu suchen. Ein Bestand weiblicher Hybridpappeln, meist nur aus einem Klon bestehend, der dann in einem relativ engem Zeitintervall blühen würde, kann durch die kontinuierliche Pollenproduktion eines natürlichen Schwarzpappelbestandes leicht bestäubt werden. Eine Anzahl weiblicher Schwarzpappeln, die zu unterschiedlichen Zeiten blühen und auf die relativ enge Blühperiode eines männlichen einklonigen Hybridpappelbestandes angewiesen wären, würde wahrscheinlich eher von vorhandenen männlichen Schwarzpappeln mit kontinuierlicher Pollenproduktion bestäubt als vom Hybridpappelklon mit der engeren Blühperiode.

Ein weiterer Grund für die Seltenheit von Kreuzungen *P. nigra* X *P. x euramericana* könnten spezifische genetische Unverträglichkeiten sein. Es ist denkbar, daß manche *P. deltoides*-stämmige Gene für die korrekte Kooperation mit *P. deltoides*-stämmigen Chloroplasten, die mütterlich vererbt werden, notwendig sind.

Die enge Verwandtschaft vieler „alter“ Hybridpappelklone untereinander könnte die gegenseitige Befruchtungsrate verringern (Inzuchtdepression) und Schwarzpappeln bei der Bestäubung weiblicher Hybridpappeln bevorzugen. Das könnte ebenfalls den hohen Anteil von *P. nigra*-Genkombinationen in Hybrid-Absaaten erklären.

Sämlinge aus solchen Kreuzungen können sich unter „natürlichen“ Schwarzpappelanflug mischen und am natürlichen Standort zumindest die ersten Jahre mit den „echten“ Schwarzpappelsämlingen mithalten. LEGIONNET & LEFEVRE (1996) vermuten, daß sich der Anteil solcher eingekreuzter Nachkommen mit der Zeit verringert, diese also verstärkt ausfallen. Demgegenüber erscheint es aber durchaus möglich, daß z.B. bei Anflug geringerer Dichte einzelne eingekreuzte Individuen in den Bestand mit einwachsen, oder daß Sämlinge, die sich schon im frühen Alter gegen die Konkurrenz durchgesetzt haben, dies auch weiterhin tun werden. Dies wäre eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die 60jährigen Pappeln mit Hybrid-Muster auf der Fläche in Albern.

Mögliche Faktoren, die den Anteil solcher eingekreuzter Individuen an Verjüngungen bestimmen, sind: das Dichteverhältnis Schwarzpappeln/Hybridpappeln, das Alters- und Kronenvolumensverhältnis, die Geschlechterverteilung, die klon-spezifischen Blühperioden, und die Verfügbarkeit von Ansamungsflächen. Da man davon ausgehen kann, daß Hybridpappelbestände meist einklonig sind, ist eine Gruppe „natürlich“ entstandener Schwarzpappeln meist dahingehend bevorteilt, sich eher untereinander zu kreuzen: beide Geschlechter kommen vor, und die Blühperioden sind über einen längeren Zeitraum verteilt. Bei gemischtklonigen Hybridpappel-Flächen spielen diese Faktoren ebenfalls eine Rolle. Im Nationalpark Donau-Auen z.B. bestehen viele Flächen aus den beiden Klonen „Harff-Regenerata“ (weiblich) und „Robusta“ (männlich). Da sich deren Blühperiode anscheinend

überschneidet, ist durchaus mit Kreuzungsnachkommen zu rechnen. Andererseits verfügen gerade in diesem Bereich die verbliebenen alten Schwarzpappeln über größere Kronen, sie stehen oft freier und weisen oft ein größeres Alter auf, alles Faktoren, die die Blühwilligkeit der Bäume erhöhen. Im Gegensatz dazu neigen Hybridpappeln geringeren Alters im engen Verband weniger zur Blütenbildung.

In den vorliegenden Untersuchungen lagen die Anteile von Hybridpappel-beeinflußten Pflanzen unter Schwarzpappeln zwischen 0 und ca. 10 %. Allerdings ist zu bemerken, daß manchmal nur aufgrund der großen Stichproben diese Pflanzen erfaßt wurden. Die tatsächlich mögliche „Dunkelziffer“ kann daher durchaus auch mehr betragen. Diese subtile „Einwanderung“ oder Introgression der Hybridpappeln in den Genpool der heimischen Schwarzpappel ist aufgrund morphologischer Betrachtung sicher nur schwer nachzuvollziehen, vor allem bei Aufnahmen im Gelände. Aus dem Fehlen äußerer Hybridpappel-Merkmale in Schwarzpappel-Verjüngung sollte also nicht automatisch auf der „Reinheit“ von Hybridpappel-Genen geschlossen werden.

Die Pyramidenpappel *P. nigra* „Italica“, die praktisch in ganz Österreich verbreitet ist, könnte durch Einkreuzung den Genpool der Schwarzpappel ebenfalls stark einschränken. Dieser Klon wurde in die Untersuchungen mit einbezogen. Aus den vorliegenden Daten können allerdings keine Aussagen über eine solche Einkreuzung abgeleitet werden: Keiner der untersuchten Marker war für diesen Klon typisch. Das könnte mehrere Gründe haben:

- 1) Der Klon, der schon seit Jahrhunderten in Europa präsent ist, hat seine Gene bereits so weit in den Genpool eingebracht, daß er sich genetisch nicht mehr besonders auffällig unterscheidet. Im Gegensatz dazu zeigt z.B. der wenig verbreitete weibliche Klon „Femina“, die weibliche Spitzpappel, ein abweichendes Muster am Marker win3.
- 2) Deutliche Unterschiede könnten in weiteren, bisher nicht untersuchten Genen vorhanden sein.
- 3) Der Klon, der aus West- oder Zentralasien stammt, unterscheidet sich tatsächlich nur wenig vom europäischen Genpool.

Bessere Markersysteme wie etwa Mikrosatelliten wären notwendig, um diese Fragen zu klären.

4 Klonunterscheidung und Identifizierung von Hybridpappeln

4.1 Einleitung

Hybridpappel-Forstwirtschaft stellt für viele Auwaldbetriebe eine unverzichtbare Bewirtschaftungsart dar. Es gibt in der Au Pappel-Zwangsstandorte, auf denen keine andere Baumart dieselben Erträge bringt. Diese Betriebe sind auf die ständige Entwicklung neuer Sorten angewiesen. Solche Sorten sind seit der zufälligen Entdeckung von raschwüchsigen Kreuzungen amerikanischer (*P. deltoides*) und europäischer (*P. nigra*) Schwarzpappeln laufend entstanden; zuerst spontan, dann durch die Arbeit von Pappel-Züchtungsinstituten (s. HEINZE 1998c). Allerdings haben viele Neuentwicklungen nicht das versprochen, was man ihnen nach nur kurzer Testung zuschrieb. Außerdem eignen sich nicht alle Klone für jeden Standort. Deshalb ist es für den Pflanzenkäufer wichtig, über die Identität des Pflanzenmaterials genau Bescheid zu wissen.

Die langwierige und mühsame Kontrolle auf Identität von Sorten im Pflanzgarten war selbst mit vollständigen Datensätzen schwierig (HATTEMER 1966). Die größte Schwierigkeit bereitet der physiologische Zustand des Untersuchungsmaterials. Nur Pflanzen desselben Entwicklungszustandes können einwandfrei verglichen werden - in der Praxis meist Aufwüchse im Mutterquartier. Selbst bei Verwendung vorvermehrten Materials vermutete man manchmal noch Unterschiede zwischen Herkünften desselben Klon (WETTSTEIN & VIEGHOFER 1958). Die internationale Sortenschutz-Vereinigung UPOV arbeitete Richtlinien zur Beschreibung der Sorten aus (UPOV 1981). Die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Unterscheidungsmethoden wird von dieser Vereinigung längst gesehen.

An Material mit verschiedenem Entwicklungszustand, etwa beim Vergleich von Alt- und Jungpflanzen, sind morphologische Methoden ziemlich aussichtslos. Deshalb war auch ein Ansatzpunkt biochemischer und genetischer Untersuchungen die Unterscheidung von einzelnen Klonen. Die Methodik wurde bereits besprochen (Kapitel 2). Chromatographische Untersuchungen von Blatt- oder Knospenextrakten sind zur Klonunterscheidung größtenteils ungeeignet. Es können nur Arten und Hybridkombinationen ermittelt werden. Bessere

Ergebnisse liefern Isoenzymuntersuchungen (RAJORA 1989b, BERGMANN 1987). RAJORA (1989b) konnte nur zwei von 31 Klonen nicht unterscheiden konnte, die aber vermutlich idente Klone unter zwei verschiedenen Namen darstellten (Kap. 2). Auch BERGMANN (1987) konnte nur zwei eng miteinander verwandte Aspenklone aus einer Gruppe von 20 Klonen aufgrund der Isoenzymmuster nicht voneinander unterscheiden. CASTIGLIONE ET AL. (1993) verwendeten die RAPD-Methode, um die Verwandtschaftsverhältnisse in einer Gruppe von Hybridpappelklonen zu untersuchen. RAPD-Muster müssen Seite-an-Seite auf demselben Elektrophorese-Gel verglichen werden, um die beträchtlichen Schwankungen von Analyse zu Analyse einzuschränken. Dadurch wird eine Anlage von Datenbanken mit den Analysendaten nicht möglich. Bei jeder Analyse einer zusätzlichen Pflanze wären sämtliche Klone ebenfalls neu zu untersuchen. Dieser Arbeitsaufwand zur Identifizierung unbekannter Proben ist enorm, da eigentlich alle Vergleichsklone mit der unbekannten Sorte analysiert werden müßten.

Es war deshalb ein Ziel dieser Untersuchung, festzustellen, ob und in welchem Ausmaß andere DNA-Methoden fähig sind, Datenbank-taugliche Ergebnisse zu liefern und die Vielzahl auch eng verwandter Hybridpappeln in kleinere Gruppen zu unterteilen.

4.2 Material und Methoden

Das Pflanzenmaterial stammte aus den Versuchsgärten in Tulln (Hybridpappel-Klonsammlung der FBVA) und Mariabrunn (Referenz-Klone des EUFORGEN-Netzwerkes, kontrollierte Kreuzungen). Die kontrollierten Kreuzungen wurden von Prof. S. Bisoffi, Casale Monferrato, Italien, Dr. J. van Slycken, Geraardsbergen, Belgien und Dr. J. Gergácz, Sárovar, Ungarn zur Verfügung gestellt. DNA wurde nach den Methoden, die in den vorangegangenen Kapiteln bereits vorgestellt wurden, präpariert. Die in Kapitel 3 beschriebenen Marker win3, trnD-trnT, PPAL, und POPX wurden zur Klassifizierung der Hybridpappeln herangezogen. RAPD-Muster wurden nach den Protokollen von HEINZE (1994a) erstellt. Die Daten wurden als vorhandene oder nicht vorhandene Banden aufgenommen, entsprechend kodiert und mit den Programmen WinWord (Tabellensortierung) und SPSS für Windows (Abstands-, Ähnlichkeits- und Clusteranalysen) analysiert.

*** HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS ***
 Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)
 Rescaled Distance Cluster Combine

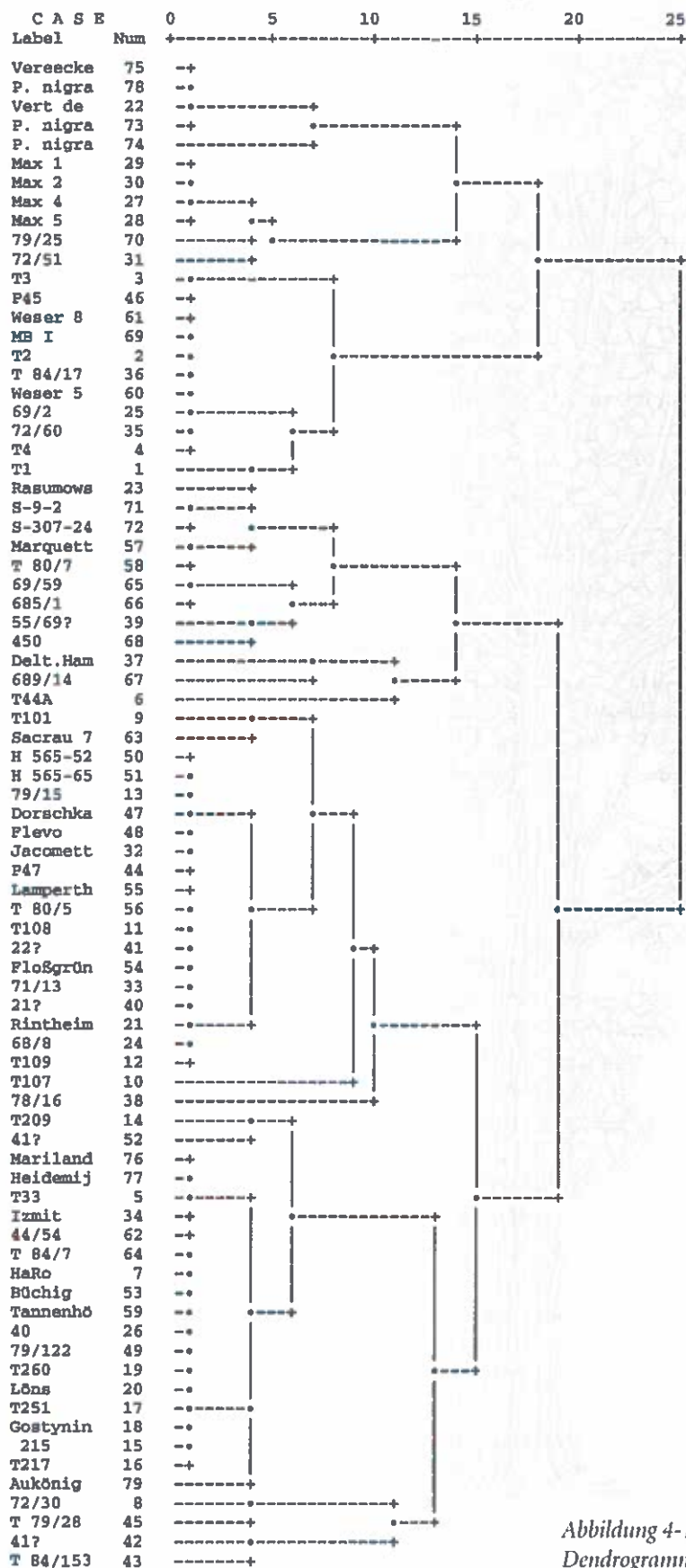


Abbildung 4-1:
 Dendrogramm einer Clusteranalyse von Pappelsorten.

4.3 Ergebnisse

Die Bandenmuster, die mit den Markern win3, trnD-trnT, PPAL - Hae III, POPX - Msp I und POPX - Hinf I erhalten wurden, sind in den Kapiteln 3.1 und 3.2 bereits beschrieben. Einzelne Banden in den jeweiligen Mustern wurden nach An- oder Abwesenheit mit „1“ oder „0“ bonitiert. Für win3 wurden 4 Banden als Variable ausgewertet: die typische *P. nigra* - Bande bei ca. 157 bp; die etwas größere Bande, die in den meisten *P. nigra* - Exemplaren vorkam; die *P. deltoides* - typische Bande; und die Hybridbande (s. Kap. 3.2). Beim Marker trnD-trnT wurde nach den Mustern von *P. nigra*, *P. deltoides* und Balsampappeln unterschieden (s. Kap. 3.1). Beim Marker PPAL - Hae III dienten die beiden *P. deltoides* - spezifischen Banden D1 und D2, die typische Bande für *P. nigra* und Balsampappeln und schließlich das Auftreten von Hybrid-typischen Mehrfachbanden als Variable (s. Kap. 3.2). Der Marker POPX - Msp I wurde nach den 4 variablen Banden ausgewertet (ca. 300, 650, 700 und 800 bp), die fortlaufend mit „1“ bis „4“ bezeichnet wurden. In ähnlicher Weise wurden die drei variablen Banden nach Hinf I - Verdau (ca. 310, 400 und 500 bp) bezeichnet und ausgewertet.

Die Daten von einem Großteil der verfügbaren Pflanzen (ca. 190 Klone) wurden aufgenommen. Vollständig auswertbare Datensätze wurden von 73 Klonen erhalten. Schon bei oberflächiger Betrachtung schienen einige Markerbanden auch in dieser Sammlung von Hybridpappel-Klonen für bestimmte Gruppen von Klonen spezifisch zu sein. Abgesehen von den win3- und trnD-trnT-Mustern waren dies Banden bei PPAL, die für *P. deltoides* und *P. x euramericana* spezifisch waren. Die Bandenkombination D2 (Abb. 4-1) war in den beiden genannten Gruppen polymorph. Eine Bande bei POPX - Msp I (ca. 800 bp) war in einigen *P. nigra* und *P. x euramericana* zu finden, eine andere in diesem Muster (ca. 700 bp) schien auf *P. trichocarpa* und andere Balsampappeln hinzuweisen.

Die Hybridpappelklone wurden deshalb nach folgenden Kriterien gruppiert:

- 1) An- oder Abwesenheit der *P. deltoides* - spezifischen win3-Bande. Dadurch wurden die reinen *P. deltoides* - Klone und Hybriden mit *P. deltoides* als mütterlicher Komponente von den restlichen Klonen abgetrennt.
- 2) Trennung reiner *P. deltoides* von Hybriden: An- oder Abwesenheit der Hybrid-spezifischen win3-Bande.

- 3) Trennung *P. nigra* (+ Hybriden) von Balsampappeln: chloroplastischer Marker trnD-trnT.
- 4) Trennung der *P. nigra* - Gruppe mittels der variablen Banden in PPAL - Hae III, POPX - Hinf I und win3.
- 5) Trennung der Balsampappeln mit denselben Markern wie unter 4.
- 6) Auftrennung reiner *P. deltoides* mittels der polymorphen Marker D2 und POPX - Hinf I.
- 7) Auftrennung der „win3-Hybriden“ nach dem Chloroplasten-Typen (*P. deltoides*, *P. nigra* oder Balsam-Typ).
- 8) Auftrennung der *P. x euramericana* - Gruppe nach den variablen Banden in PPAL - Hae III und POPX - Msp I bzw. POPX - Hinf I.

Dadurch wurden die 73 Klone mit vollständigen Daten in 43 Untergruppen eingeteilt. Innerhalb der größten Gruppe der 38 *P. x euramericana* -Klone wurden 25 Untergruppen festgestellt. Dieselben Gruppen bildeten sich auch nach Clusteranalysen. Ein Beispieldendrogramm einer Clusteranalyse zeigt Abb. 4-1. Mit Hilfe dieser Methode war es auch relativ leicht, Klone mit fehlenden Daten einzuordnen.

Einige Detailergebnisse seien hervorgehoben: Die 4 „Robusta“-Klone der Tullner Sammlung zeigten voneinander nicht unterscheidbare Muster. Das deutet darauf hin, daß es sich entweder um identische Klone mit nicht gerechtfertigten Zusatzbezeichnungen („vernirubens“, „P“, „K“, „Gostynin“) oder um Sproßmutanten eines einzigen Klonen handelt. Eine Reihe von anderen Klonen, die unter verschiedenen Namen in Tulln vorhanden sind, zeigten erwartungsgemäß ebenfalls identische Muster. In den wenigen Fällen, bei denen Unterschiede in den Urdaten auftraten, waren diese meist auf Rest-Unsicherheiten bei der Auswertung der Banden zurückzuführen und konnten anhand der Originalfotos geklärt werden. Wiederholungsanalysen können solche Unklarheiten ebenfalls beseitigen.

Ein gegenteiliger Fall trat bei einer Pflanze der Bezeichnung „79/25 Blanc du Poitou“ auf. Diese Pflanze, die schon rein morphologisch eher zu den Balsampappeln gerechnet würde, war völlig verschieden von der „Blanc du Poitou“, die in der EUFORGEN-Sammlung enthalten ist. „79/25“ gruppierte sich mit den Balsampappeln, während die andere „Blanc du Poitou - EUFORGEN“ als typische *P. x euramericana* identifiziert wurde.

Der „Aukönig“ aus Haslau, eine alte Hybridpappel im Gebiet des Nationalparks Donau-Auen (siehe Kap. 3.3), konnte keiner der zur Verfügung stehenden Vergleichssorten zugeordnet werden. Da jedoch im

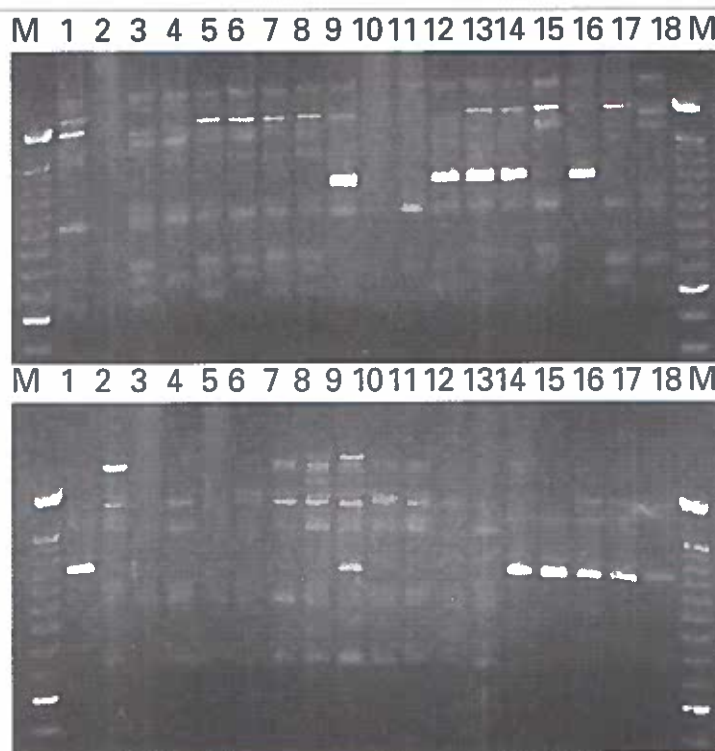
Abbildung 4-2:
RAPD-Analyse einer kontrollierten Kreuzung (A)
und einiger Pappelsorten (B).

A:

Vollgeschwisterfamilie „Sárvár 1“ (3 bis 15)
samt Eltern „S-9-2“ (*P. deltoides*, 16) und
„Lébény 211“ (*P. nigra*, 17) und weiterer
P. deltoides-Klone (1, 2, 18).

B:

Analyse von 5 „Robusta“-Klonen (14 bis 18:
„Robusta“ EUFORGEN, T215, T217, T251,
„Robusta Gostynin“) und den Klonen
„68/8 Knoblochsauce“ (1), „Vert de Garonne“
(2), „Italica“ (3, 4), „Vereecken“ (5), *P. nigra*
Mosonmagyaróvár (6, 7) und *P. nigra*



Tullner Sortiment einige typische „Altsorten“ mit ehemals weiter Verbreitung (MÜLLER & SAUER 1957-1961) fehlen, könnte eine Analyse unter Einbeziehung solcher Klone das Rätsel durchaus lösen.

Manche der Marker waren auch in Material mit sehr enger Verwandtschaft polymorph. Die ungarische Kreuzungsfamilie „Sárvár 2“ zeigte Segregation am Marker PPAL - Hae III - D2. Die Rückkreuzungen *P. x euramericana* x *P. nigra* aus Belgien und Italien spalteten erwartungsgemäß in den *P. deltoides* zurechenbaren Markern 1:1 auf. Einige weitere Feinheiten in den Mustern, die nicht für die Auswertung herangezogen wurden, können auch noch weitere Trennhilfen liefern. Innerhalb von Gruppen, die mit den hier besprochenen Markern nicht aufgelöst werden können, bieten sich noch immer RAPD-Analysen als weiteres Instrument an. Beispiele dafür sind in Abb. 4-2 zu sehen. Da in so einem Fall nur mehr die relativ wenigen Gruppen-Mitglieder miteinander verglichen werden müssen, ist diese Vorgangsweise zur Klonidentifizierung durchaus empfehlenswert.

4.4 Diskussion

Die hier vorgestellten Marker haben gegenüber bisher verwendeten Systemen zahlreiche Vorteile:

1) Die Unabhängigkeit vom entwicklungsphysiologischen Zustand des untersuchten Materials. Es

können als Extremfall Altbäume mit Baumschulpflanzen oder Steckhölzern verglichen werden.

- 2) Der geringe Bedarf an Probenmaterial: eine einzelne Knospe oder eine Triebspitze reicht für alle Analysen aus.
- 3) Die Schnelligkeit der Analysen, die innerhalb zweier Tage vorliegen können.
- 4) Die Möglichkeit des Aufbaus einer Datenbank samt weltweitem Austausch der Daten. Da schon die Analysenmethoden durch die Beschreibung der Primer, der Reaktionsbedingungen und der Muster eindeutig festgelegt sind, ist die Methode sehr leicht mit anderen Untersuchungslabors abzustimmen.
- 5) Die relativ einfache technische Durchführbarkeit. Dies ist ein Vorteil gegenüber anderen molekularbiologischen Systemen wie RFLP und Mikrosatelliten.
- 6) Die Möglichkeit, mit diesen Methoden reine Arten und Hybriden zu unterscheiden, und für die Hybriden den mütterlichen Elternteil festlegen zu können.
- 7) Der Polymorphiegrad, der manchmal sogar innerhalb von Vollgeschwistern zur Differenzierung führt. Ein zu hoher Polymorphiegrad, wie er bei manchen Isoenzymssystemen oder bei Mikrosatelliten zu erwarten ist, erhöht die Anfälligkeit des Systems für Analysenfehler. Allerdings ist hier festzuhalten, daß bei einem erheblichen Anwachsen der Datensätze die Polymorphismen nicht

mehr ausreichen werden, das Material in relativ kleine Gruppen zu unterteilen. In solch einem Fall wäre die schrittweise Entwicklung neuer Marker auf ähnlicher Grundlage empfehlenswert.

Praktische Einsatzmöglichkeiten, Empfehlungen

Während übereinstimmende Muster noch kein zwingender Grund für die Identität zweier getesteter Sorten sind, kann man bei ungleichen Mustern davon ausgehen, daß es sich um verschiedene Sorten handelt. Eine derartige Untersuchung kann somit unterstützende Daten für die Feststellung der Klonidentität und der Sortenreinheit, wie sie das Forstliche Vermehrungsgutgesetz fordert (FORSTLICHES VERMEHRUNGSGUTGESETZ 1996, FORSTLICHE VERMEHRUNGSGUT-VERORDNUNG 1996), liefern. Die ursprünglich in Österreich zum Handel zugelassenen Pappelsorten können mit den hier vorgestellten Markern zum Großteil voneinander unterschieden werden. Die Ausnahme der „Robusta“-Klone wurde bereits erwähnt. Da seit dem EU-Beitritt Österreichs jedoch auch die insgesamt ca. 130 Sorten aus den einzelnen Mitgliedsländern gehandelt werden dürfen (A. VALADON, CEMAGREF, F, persönliche Mitteilung), können allenfalls eingehendere Untersuchungen dieser Klone vorteilhaft sein.

Diese Verbreiterung des Angebots an Pappelsorten ist einerseits zu begrüßen. Andererseits werden damit die forstlichen Kontrollorgane vor eine unlösbar große Aufgabe gestellt, ist es doch selbst Experten oft erst nach langer Erfahrung möglich, bestimmte Sorten morphologisch zu erkennen. Der Baumschulkunde soll jedoch sicher sein können, das gewünschte oder versprochene Material auch tatsächlich zu bekommen. Hier können die vorgestellten Methoden unterstützend eingreifen. Langfristig ist zu erwarten, daß auch bei der Anmeldung und Beschreibung neuer Sorten auf solche Marker zurückgegriffen wird.

Um zukünftig für Identifizierungsaufgaben zur Verfügung zu stehen, sollten die Daten kontinuierlich betreut werden. Mikrosatelliten-Daten könnten aus der Literatur ergänzt werden, sobald sie vorliegen. Ein gewisser Grundstock an DNA der im Zuge des Projektes untersuchten Klone kann für zukünftige Vergleichszwecke eingelagert werden. Neuzugänge der Hybridpappel-Klonsammlung in Tulln sollten ebenfalls erfaßt werden. Die DNA müßte im Abstand mehrerer Jahre periodisch erneuert werden.

Die Haltung einer solchen Vergleichs-Sammlung in Tulln ist besonders wichtig im Hinblick auf die Mitgliedschaft in der Europäischen Union (EU), da

jede in einem Land der EU zugelassene Pappelsorte auch in Österreich vermarktet werden kann. Etliche Sorten dieser ca. 130 Eintragungen umfassenden Liste fehlen in der derzeitigen Sammlung.

Die Daten über die Hybridpappeln sollten sinnvollerweise am Internet international verfügbar gemacht werden, um eine internationale Abstimmung zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Pappeln sind Baumarten des Auwaldes. Die einheimischen Schwarzpappeln (*Populus nigra* L.) sind Charakterbäume und zentrale Elemente dieses Ökosystems. Das schnelle Wachstum der Hybridpappeln macht dessen Produktivität deutlich. Da durch das Nebeneinander von Hybrid- und Schwarzpappeln mit gegenseitiger Bestäubung gerechnet werden muß, könnten Zwischen- und Übergangsformen als Kreuzungsprodukte entstehen. Für die Unterscheidung dieser Formen von einheimischen Pappeln ebenso wie für die Unterscheidung der einzelnen Hybridpappelsorten können molekulargenetische Marker herangezogen werden.

Kapitel 2 beschreibt die aus der wissenschaftlichen Literatur bekannten biochemischen und molekulargenetischen Verfahren zur Unterscheidung der Pappelarten, zur Einordnung von Hybriden, zum Abschätzen der genetischen Variation, zur Klonunterscheidung und zum Verfolgen der Einkreuzung verschiedener Pappelarten. Dabei handelt es sich um Verfahren zur chromatographischen Analyse von Knospen- und Blattextrakten, um Proteinelektrophoresen für Isoenzym-Studien und um DNA-Analysen. Vor allem im Bereich der DNA-Verfahren sind verschiedene Wege vorgezeigt worden, die einer kritischen Betrachtung unterzogen werden. Für Untersuchungen größeren Umfangs und für schnelle Analysen bieten sich hauptsächlich Verfahren, die auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhen, an.

In Kapitel 3 wird die methodische Anpassung solcher PCR-Verfahren im Rahmen des Forschungsprojektes zur Untersuchung von möglicher Einkreuzung der Hybrid- und Schwarzpappeln beschrieben. Dazu werden Analysen der Chloroplasten-DNA (3.1) und von Zellkern-Genen (3.2) angewendet. Während bei Chloroplasten-DNA auf PCR-Verfahren mit breitem Anwendungsspektrum in verschiedenen Pflanzenarten zurückgegriffen werden konnte,

mußten für die Gene des Zellkerns spezifische PCR-Methoden entwickelt werden. Chloroplasten werden nur über den Samenbaum, nicht über Pollen vererbt. Es konnten mehrere Unterschiede im Chloroplasten-Genom der untersuchten Pappelarten entdeckt werden, darunter eine hochvariable Region. Diese Marker können Chloroplasten der Hybridpappel-Elternarten *P. nigra* und *P. deltoides* eindeutig und rasch unterscheiden. Drei Zellkern-Gene wurden gefunden, deren DNA-Sequenzen zwischen und innerhalb der Pappelarten variieren.

Mit diesen Methoden wurden Schwarzpappeln und Sämlinge aus großen Teilen Österreichs untersucht. Dazu wurden sowohl aus Samen gewonnene Pflanzen als auch Pflanzen aus vorhandenen Naturverjüngungen herangezogen. Außer bei Sämlingen weiblicher Hybridpappeln wurden nur wenige Pflanzen gefunden, die auf Kreuzungen zwischen Hybrid- und Schwarzpappeln zurückgehen müssen. Der Anteil solcher Pflanzen in den untersuchten Beständen blieb meist unter 10 %. Hybridpappel-Nachkommen können aber unter Schwarzpappel-Naturverjüngung gemischt sein (Introgression). Auch im Baumalter wurden Hybridpappel-beeinflußte Pflanzen in Schwarzpappelbeständen gefunden.

Die Chloroplasten- und Zellkern-spezifischen DNA-Marker wurden zur Unterscheidung von Hybridpappel-Sorten herangezogen (Kapitel 4). Die Klone in ihrer großen Formenvielfalt können mit nur 4 bis 5 Einzelanalysen in kleine Gruppen unterteilt werden, innerhalb derer mittels „genetischer Fingerabdrücke“ die Sortenidentität geprüft werden kann. Damit kann die Einhaltung gesetzlicher Bestimmungen über den Handel mit Pappelpflanzen effektiv überwacht werden. Die vorgestellten Marker können zum Aufbau einer Datenbank verwendet werden, die spätere Analysen erleichtert.

6 Summary

Poplars are trees of the floodplain forests. Native black poplars (*Populus nigra* L.) are characteristic and central elements of these habitats. The fast growth of hybrid poplars shows how productive this ecosystem is. Side-by-side culture of black and hybrid poplars may cause mutual pollination, resulting in intermediate forms. Distinguishing between them, and among hybrid poplar varieties, is possible with molecular genetic techniques.

Chapter 2 describes methods from the scientific literature that differentiate between poplar species, categorize hybrids, estimate genetic variation, distinguish single clones, and monitor introgression of different poplar species. Chromatographic analysis of leaf and bud exudates, protein electrophoresis of isozymes, and DNA methods are considered. DNA methods that cover aspects of the mentioned tasks are critically reviewed. Investigations on a larger scale, as well as fast analyses, may take advantage of the polymerase chain reaction (PCR).

In chapter 3, the methodical adaptation of DNA marker approaches to investigations into introgression of hybrid poplars, as done for project P/2/29, is described. Chloroplast (3.1) as well as nuclear DNA (3.2) was investigated. More universally applicable methods render it possible to transfer chloroplast DNA protocols between a range of plant species. Nuclear DNA is taxonomically much more specific, and suitable tests had to be developed. Chloroplasts are transmitted by seed only and not via pollen. Several markers were found that distinguish poplar species. A highly polymorphic region was among them. The mainly interesting *P. nigra* and *P. eltoides* chloroplasts can quickly be identified with these tests. Three nuclear genes were identified that show variation within and between poplar species.

Black poplars and seedlings from many sites in Austria were tested. Aside from seed collected under female hybrid poplars, only few plants showed signs of mixed heritage. The proportion of these plants was generally under 10 % of the stands. Hybrid poplar offspring mixed with black poplar seedlings. Also as adult trees, hybrids may still be present among black poplars.

The chloroplast and nuclear DNA markers were also used in hybrid poplar clone distinction (chapter 4). Only 4 to 5 individual tests establish a variety of small groups into which the many hybrid clones can be separated. Within these groups, 'genetic fingerprints' can further discriminate among the members. Law enforcement regarding plant trade regulations can greatly benefit from these tests. The marker data can be fed into a database for future reference.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen beteiligten Forstverwaltungen, Institutionen, Behörden und Einzelpersonen für das entgegengebrachte Interesse und die geleistete Unterstützung auf das herzlichste bedanken. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien

hier genannt: SR DI G. Haubenberger und SR DI R. Schreckeneder (FV Lobau - Gem. Wien), HR Dr. H. Otto (Stmk. LReg.), HR DI R. Weilharter, DI C. Jasser, Ing. F. Sternberger, Ing. W. Stöckl (LFI Oberösterreich), DI C. Fraissl (Nationalparkgesellschaft Donau-Auen), Univ.-Lektor OFR DI H. Hinterstoisser (Sbg. LReg.) und DI P. Ebner (W W F Austria); Ing. D. Auer, DI M. Mengl, W. Nebenführ (Institut für Forstgenetik FBVA), Ing. K. Sieberer, F. Henninger, L. Ott (Versuchsgarten FBVA); die Forstverwaltungen Grafenegg, Petronell und Mattighofen, Bezirksforstinspektionen Braunau und Eferding, die Stadtgemeinden Hainburg und Fischamend, Gemeinde Lochau (Hr. E. Ploss) sowie alle Institutionen, die Pappelsorten für Laboruntersuchungen zur Verfügung stellten: Institut für Waldbau und Wildhege/ Geraardsbergen, B; Istituto di Sperimentazione di Pioppicoltura/ Casale Monferrato, I; ERTI / Station Sárvár, H; Hessische Landesversuchsanstalt/ Hann. Münden, D. Ein Großteil der Laborarbeit lag in den Händen von E. Kickingeder, dem ich dafür ganz besonders danken möchte. Herrn HR DI U. Schultze danke ich für viele Hinweise nach der Durchsicht des Manuskriptes.

7 Literaturverzeichnis

- BARRETT J. W., RAJORA O. P., YEH F. C. H., DANCIC B. P. & STROBECK, C. 1993: *Mitochondrial DNA variation and genetic relationships of Populus species*. Genome, 36: 87-93.
- BERGMANN F. 1981: *Unterscheidung von Pappelklonen mit Hilfe von Isoenzym-Mustern*. Die Holzzucht, (Dezember): 24-27.
- BERGMANN F. 1987: *Characterization of multiclonal aspen cultivars using isozyme electrophoresis*. Forest Ecol. Manage., 22: 167-172.
- BÖRITZ S. 1962: *Papierchromatographische Differenzierung einiger Arten und Sorten der Gattung Populus*. Der Züchter, 32: 24-33.
- BRADSHAW H. D. JR., VILLAR M., WATSON B. D., OTTO K. G., STEWART S. & STETTLER R. F. 1994: *Molecular genetics of growth and development in Populus. 3. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers*. Theor. Appl. Genet., 89: 167-178.
- BUENO M.A., SANCHEZ N., ALBA N., MANZANERA J.A. & GRAU J.M. 1997: *Identification of autochthonous Populus tremula clones using RAPD fingerprints*. Abstract, Joint Meeting of the IUFRO Working Parties 2.04-07 and 2.04-06 Somatic Cell Genetics and Molecular Cell Genetics of trees, Quebec City, Canada, Aug. 12-16, 1997.
- CAETANO-ANOLLES G., BASSAM B. J. & GRESSHOFF P. M. 1991: *DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers*. Biotechnology, 9: 553-557.
- CAMACHO F. J., GERNANDT D. S., LISTON A. J., STONE K. & KLEIN A. S. 1997: *Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA*. Mol. Ecol., 6: 983-987.
- CASTIGLIONE S., WANG G., DAMIANI G., BANDI C., BISOFFI S. & SALA F. 1993: *RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (Populus spp) clones*. Theor. Appl. Genet., 87: 54-59.
- CERVERA M. T., GUSMAO J., STEENACKERS M., VAN GYSEL A., VAN MONTAGU M. & BOERJAN W. 1996: *Application of AFLP(TM)-based molecular markers to breeding of Populus spp*. Plant Growth Regulation, 20: 47-52.
- DEMESURE B., SODZI N., PETIT R. J. 1995: *A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants*. Mol. Ecol., 4: 129-131.
- DEMESURE B., COMPS B., PETIT R. J. 1996: *Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (Fagus sylvatica L.) in Europe*. Evolution, 50: 2515-2520.
- D'OVIDIO R., MUGNOZZA G. S. & TANZARELLA O. A. 1991: *rDNA cloning and rapid hybrid identification in Populus spp. (Salicaceae)*. Plant Syst. Evol., 177: 165-174.
- D'OVIDIO R., SCARASCIA MUGNOZZA G., TANZARELLA O. A. & MUGNOZZA, G. S. 1990: *Ribosomal RNA genes structure in some Populus spp. (Salicaceae) and their hybrids*. Plant Syst. Evol., 173: 187-196.
- DUMOLIN-LAPEGUE S., PEMONGE M. H. & PETIT R. J. 1997: *An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants*. Mol. Ecol., 6: 393-398.
- ECKENWALDER J. E. 1982: *Populus x inopina hybr. nov. (Salicaceae), a natural hybrid between the native North American P. fremontii s. Watson and the introduced Eurasian P. nigra*. Madroño, 29: 67-78.
- FAIVRE-RAMPANT P., CASTIGLIONE S., LE GUERROU B., BISOFFI S., LEFEVRE F. & VILLAR M. 1995: *Molecular approaches to the study of poplar systematics*. Abstracts, International Poplar Symposium, Seattle, 20-25 August 1995.
- FAIVRE-RAMPANT P., JEANDROZ S., LEFEVRE F., LEMOINE M., VILLAR M. & BERVILLE A. 1992: *Ribosomal DNA Studies in Poplars - Populus deltoides, P. nigra, P. trichocarpa, P. maximowiczii, and P. alba*. Genome, 35: 733-740.
- FLAVELL R. B. & MOORE G. 1996: *Plant genome constituents and their organisation*. In: FOSTER G. D. & TWEED D. (Hrsg.): *Plant Gene Isolation - Principles and Practice*. Chichester, John Wiley & Sons (ISBN 0-471-95538-8), 1-25.
- FÖRSTLICHES VERMEHRUNGSGUTGESETZ 1996. Bundesgesetzblatt Nr. 419/1996.
- FÖRSTLICHE VERMEHRUNGSGUT-VERORDNUNG 1996. Bundesgesetzblatt Nr. 512/1996.
- GERGACZ J. 1989/90: *A nyárák keresztezéses nemsítése terén elért eddigi eredmények [Results achieved in cross-breeding of poplars]*. Erdészeti Kutatások (Budapest), 80/81: 19-28.
- GREENAWAY W., ENGLISH S., WHATLEY F. R. & ROOD S. B. 1991: *Interrelationships of poplars in a hybrid swarm as studied by gas chromatography-mass spectrometry*. Can. J. Bot., 69: 203-208.
- GÖNZL, L. 1982: *Forstwirtschaftliche Beurteilung von in Österreich angebauten Pappelsorten mit einer Übersicht der im österreichischen Auwald vorkommenden Baumarten und deren Nutzungsmöglichkeiten*. Holzforschung und Holzverwertung, 34 (6): 93-100.
- HATTEMER, H.H. 1966: *Die Eignung einiger Blatt- und Verzweigungsmerkmale für die Unterscheidung von Schwarzpappel-Hybridklonen*. Der Züchter, 36: 317-327.

- HECKER K. H. & ROUX K. H. 1996: High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, 20: 478-485.
- HEINZE B. 1994a: RAPD reactions from crude plant DNA: Adding RNase A as a „helper enzyme“. *Mol. Biotechnol.*, 1: 307-310.
- HEINZE B. 1994b: Genetische Marker zur Beurteilung der genetischen Variation von Waldbäumen. In: GEBUREK T., MÜLLER F. & SCHULTZE U. (Hrsg.): *Klimaänderung in Österreich - Herausforderung an Forstgenetik und Waldbau*. FBVA-Berichte 81; Forstliche Bundesversuchsanstalt, Wien (ISSN 0374-9037), 49-65.
- HEINZE B. & GEBUREK T. 1995: Searching for DNA markers linked to leaf colour in copper beech, *Fagus sylvatica* L. var *atropunicea*. *Silvae Genetica*, 44: 339-343.
- HEINZE B. 1997: A PCR marker for a *Populus deltoides* allele and its use in studying introgression with native European *Populus nigra*. *Belgian J. Botany*, 129: 123-130.
- HEINZE 1998a: PCR-based chloroplast DNA assays for the identification of native *Populus nigra* and introduced poplar hybrids in Europe. *Forest Genetics*, 5: 31-38.
- HEINZE 1998b: Biochemical and molecular genetic methods available for the characterization of *Populus nigra* L. In: TUROK J. ET AL. (Hrsg.): *Populus nigra Network - Report of the forth meeting*. Rom, IPGRI, S. 42-70.
- HEINZE 1998c: *Erhaltung der Schwarzpappel in Österreich*. FBVA-Berichte 106, Forstliche Bundesversuchsanstalt, Wien (im Druck).
- HIPKINS V. D., MARSHALL K. A., NEALE D. B., ROTTMANN W. H. & STRAUSS S. H. 1995: A mutation hotspot in the chloroplast genome of a conifer (Douglas fir: *Pseudotsuga*) is caused by variability in the number of direct repeats derived from a partially duplicated tRNA gene. *Current Genetics*, 27: 572-579.
- HOLICK J. B. & GORDON M. P. 1995: Transgenic analysis of a hybrid poplar wound-inducible promoter reveals developmental patterns of expression similar to that of storage protein genes. *Plant Physiology*, 109: 73-85.
- UPOV 1981: Guidelines for the conduct of test for distinctness, homogeneity and stability, Poplar (TG/21/7). International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Genève, Schweiz.
- JANZEN A. 1997: Unterscheidung der beiden Schwarzpappelarten *Populus nigra* L. und *P. deltoides* Marsh. sowie ihrer Arthybride *P. x euramericana* (Dode) Guinier mit Hilfe von Isoenzymmustern. *Die Holzzucht*, 51 (Juli 1997), 17-23.
- JOHNSON D. A. & HATTORI J. 1996: Analysis of a hotspot for deletion formation within the intron of the chloroplast *trnI* gene. *Genome*, 39: 999-1005.
- KARP A., KRESOVICH S., BHAT K. V., AYAD W. G. & HODKIN T. 1997: Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin 2. Rom, IPGRI, 47 S.
- KEIM P., PAIGE K. N., WHITHAM T. G. & LARK K. G. 1989: Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional introgression. *Genetics*, 123: 557-565.
- LEGIONNET A., FAIVRE-RAMPANT P., VILLAR, M. & LEFEVRE F. 1997: Sexual and asexual reproduction in natural stands of *Populus nigra*. *Botanica Acta*, 110: 257-263.
- LEGIONNET A. & LEFEVRE F. 1996: Genetic variation of the riparian pioneer tree species *Populus nigra* L. I. Study of population structure based on isozymes. *Heredity* 77: 629-637.
- LEXER C., STREIFF R., STEINKELLER H. & GLOSSL J. 1997: Vater-schaftstests für Bäume mit Mikrosatelliten. *Österreichische Forst-Zeitung*, 6/1997, 43-44.
- LIN D., HUBBES M. & ZSUFFA L. 1994: Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiol.*, 14: 1097-1105.
- LIU Z. & FURNIER G. R. 1993: Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 97-105.
- MALVOLI M. E., BOCCONE A., FINESCHI S. & PACIUCCI M. 1991: Marcatori biochimici nella tassonomia del pioppo. *Monti e Boschi*, 1/1991: 49-56.
- MEINARTOWICZ M. 1991: Inheritance of chloroplast DNA in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.*, 82: 477-480.
- MORTON B. R., OBERHOLZER V. M. & CLEGG M. T. 1997: The influence of specific neighboring bases on substitution bias in noncoding regions of the plant chloroplast Genome. *J. Mol. Evol.*, 45: 227- 231.
- MÜLLER R. 1968: *Populus x generosa* Henry - Phänomen oder Phantom? *Silvae Genetica*, 17: 93-106.
- MÜLLER R. & SAUER E. 1972: *Urteilsgrundlagen für die trichocarpa-Pappel. Versuch einer Analyse auch der bisherigen Pappelwirtschaft*. Strassenhaus, Wirtschafts- und Forstverlag Euting KG, 152 S.
- MÜLLER R. & SAUER E. 1957-1961: *Altstammsorten der Schwarzpappelbastarde*. Sonderdrucke aus Holz-Zentralblatt (Stuttgart), Teile I und II, 44 und 167 S.
- MÜLLER-STARCK G. 1992: Genetic control and inheritance of isozymes in poplars of the Tacamahaca section and hybrids. *Silvae Genetica*, 41: 87-95.
- NEI M. 1987: *Molecular Evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press.
- OPEC 1951: *The American Poplar - its importance for Europe*. OPEC Documentation, Paris, Organisation for European Economic Co-Operation.
- OSAKABE Y., OHTSUBO Y., KAWAI S., KATAYAMA Y. & MOROHOSHI N. 1995: Structure and tissue-specific expression of genes for phenylalanine ammonia-lyase from a hybrid aspen, *Populus kitakamiensis*. *Plant Science*, 105: 217-226.
- OTTO K., BRADSHAW T., WATSON B. & STEWART S. 1994: *Mini DNA preparation from Populus*. Manuskript, Dept. of Biochemistry, University of Washington, Seattle, 2 S.
- PAIGE K. N., CAPMAN W. C. & JENNETTEN P. 1991: Mitochondrial inheritance patterns across a cottonwood hybrid zone: cytonuclear disequilibria and hybrid zone dynamics. *Evolution*, 45: 1360-1369.
- PINON J. & VALADON A. 1997: Comportement des cultivars de peupliers commercialisables dans l'Union européenne vis-à-vis de quelques parasites majeurs. *Ann. Sci. For.*, 54: 19-38.

- POSPÍŠKOVÁ M., BENETKA V. & VÁČKOVÁ K.: Isoenzyme analyses of the genus *Populus*. In: *Molecular Biology for Agriculture*, August 25-29, 1997, České Budejovice, Czech Republic, *Book of Abstracts*. České Budejovice, Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Science of the Czech Republic, S 156.
- PRADO E. A., FAIVRE-RAMPANT P., SCHNEIDER C. & DARMENCY M. A. 1996: Detection of a variable number of ribosomal DNA loci by fluorescent in situ hybridization in *Populus* species. *Genome*, 39: 1020-1026.
- RADETZKY R. 1990: Analysis of mitochondrial DNA and its inheritance in *Populus*. *Current Genetics*, 18: 429-434.
- RAJORA O. P. 1989a: Characterization of 43 *Populus nigra* L. clones representing selections, cultivars and botanical varieties based on their multilocus allozyme genotypes. *Euphytica*, 43: 197-206.
- RAJORA O. P. 1989b: Identification of some *Populus deltoides* Marsh. x *P. nigra* L. clones, developed in North America, with the aid of allozymes. *Euphytica*, 43: 207-213.
- RAJORA O. P. 1990a: Genetics of allozymes in *Populus deltoides* Marsh., *P. nigra* L., and *P. maximowiczii* Henry. *J. Hered.*, 81: 301-308.
- RAJORA O. P. 1990b: Marker allozyme genes and alleles for differentiation of *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii*, and their interspecific hybrids. *Can. J. Bot.*, 68: 990-998.
- RAJORA O. P., BARRETT J. W., DANCİK B. P. & STROBECK C. 1992: Maternal transmission of mitochondrial DNA in interspecific hybrids of *Populus*. *Current Genetics*, 22: 141-145.
- RAJORA O. P. & DANCİK B. P. 1992a: Allozyme variation and inheritance in leaves of *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii* and *P. x canadensis* in comparison to those in root tips. *Silvae Genet.*, 41: 289-292.
- RAJORA O. P. & DANCİK B. P. 1992b: Chloroplast DNA inheritance in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 280-285.
- RAJORA O. P. & DANCİK B. P. 1995a: Chloroplast DNA variation in *Populus* .1. Intraspecific restriction fragment diversity within *Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. maximowiczii*. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 317-323.
- RAJORA O. P. & DANCİK B. P. 1995b: Chloroplast DNA variation in *Populus* .2. Interspecific restriction fragment polymorphisms and genetic relationships among *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii*, and *P. x canadensis*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 324-330.
- RAJORA O. P. & DANCİK B. P. 1995c: Chloroplast DNA variation in *Populus* .3. Novel chloroplast DNA variants in natural *Populus x canadensis* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 90: 331-334.
- RAJORA O. P. 1997: Microsatellite DNA variation and genetic structure of old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) populations in Ontario. Joint Meeting of the IUFRO Working Parties 2.04-07 and 2.04-06 Somatic Cell Genetics and Molecular Cell Genetics of Trees, Quebec City, Canada, Aug. 12-16, 1997 (abstract).
- RASCHKA H.-D. 1997: Forstliche Biomasse im Kurzumtrieb. FBVA-Berichte 97, Forstliche Bundesversuchsanstalt, Wien (ISSN 1013-0713), 29 S.
- SABSCH M. 1992: Untersuchungen über inter- und intraspezifische Variation der cp DNA in der Gattung *Populus*. Göttingen, Universität Göttingen, Dissertation.
- SCHREINER E. 1949: *Poplars can be bred to order*. Yearbook of Agriculture, 1949: 153-157.
- SIMON P., CAPELLI N., FLACH J., OVERNY S., TONOLLI M., PENEL C. & GREPPIN H. 1996: The peroxidase family of *Arabidopsis thaliana*. In: Obinger C., Burner U., Ebermann R., Penel C. & Greppin H. (Hrsg.): *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. IV International Symposium 1996*. Wien und Genf, University of Agriculture Vienna and University of Geneva (ISBN 2-88164-008-7), 179-183.
- SMITH R. L. & SYTSMA K. J. 1990: Evolution of *Populus nigra* (sect. *Aigeiros*): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of *Populus alba* (sect. *Populus*). *Am. J. Bot.*, 77: 1176-1187.
- STETTNER R. F., BRADSHAW H. D., HEILMAN P. E. & HINCKLEY T. M. (Hrsg.): *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. Ottawa, Natl. Research Council Canada (ISBN 0-660-16506-6), 539 S.
- STOEHR M. U. & SINGH R. S. 1993: Restriction map and polymorphisms of nuclear ribosomal genes of *Populus balsamifera*. *Tree Physiology*, 12: 419-425.
- STOUT A. B. & SCHREINER E. J. 1934: Descriptions of ten new hybrid poplars. *Bull. Torrey Botanical Club*, 61: 449-460.
- SUBRAMANIAM R., REINOLD S., MOLITOR E. K. & DOUGLAS C. J. 1993: Structure, inheritance, and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase genes. *Plant Physiology*, 102: 71-83.
- SUGIURA M. 1992: The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.*, 19: 149-168.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G. & BOUVET J. 1991: Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 17: 1105-1109.
- THORSEN J., JORDE P. E., ARAVANPOULOS F. A., GULLBERG U. & ZSUFFA L. 1997: Inheritance and linkage of isozyme loci in the basket willow (*Salix viminalis* L.). *J. Heredity*, 88: 144-150.
- TUSKAN G. A., FRANCIS K. E., RUSS S. L., ROMME W. H. & TURNER M. G. 1996: RAPD markers reveal diversity within and among clonal and seedling stands of aspen in Yellowstone National Park, U.S.A. *Can. J. Forest Research*, 26: 2088-2098.
- VORNAM B., HERZOG S., PREISIG-MÜLLER R. & HATTEMER H. H. 1994: Restriction fragment length polymorphisms of a chloroplast photosystem II gene from poplar and their use for species identification. *Genome* 37: 747-750.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- WANG G., CASTIGLIONE S., CHEN Y., LI L., HAN Y., TIAN Y., GABRIEL D. W., HAN Y., MANG K. & SALA F. 1996: Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transgenic Research*, 5: 289-301.

- WANG J. & HALL R. 1995: *Comparison of DNA content and chromosome numbers in species and clones of poplar*. International Poplar Symposium, Seattle, 20-25 August 1995 (abstract).
- WEBER J.C. & STETTLER R.F. 1981: *Isoenzyme variation among ten populations of Populus trichocarpa Torr. et Gray in the Pacific Northwest*. *Silvae Genetica*, 30: 82-87.
- WELSH J. & MCCLELLAND M. 1990: *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. *Nucl. Acid Res.*, 18: 7213-7218.
- WESTMANN A.L. & KRESOVICH S. 1997: *Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation*. In: CALLOW J.A., FORD-LLOYD B.V. & NEWBURY H.J. (Hrsg.): *Biotechnology and Plant Genetic Resources (Biotechnology in Agriculture Series: 19)*. Wallingford (Oxon., U.K.), CAB International (ISBN 0-85199-142-4), 9-47.
- WETTSTEIN W. 1930: *Die Züchtung von Pappeln (Populus)*. *Der Züchter*, 2: 219-220.
- WETTSTEIN W. & VIEGHOFER L. 1958: *Physiologische Unterschiede morphologisch nicht unterscheidbarer Pappelklone. Prüfungsergebnisse der sog. Drapal-Pappel*. *Holzforschung*, 11: 139-142.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. & TINGEY S. V. 1990: *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucl. Acid Res.*, 18: 6531-6535.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. 1990: *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J. (Hrsg.) *PCR Protocols - A guide to methods and applications*. New York, Academic Press (ISBN 0-12-372181-4), 315-322.
- WWF ÖSTERREICH & NÖ. LANDSCHAFTSFOND 1998: *Seltene Bäume - 11 Kostbarkeiten der heimischen Baumflora*. Wien, UMC Verlagsgesellschaft, 32 S.
- YEH F. C., CHONG D. K. X. & YANG R. C. 1995: *RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (Populus tremuloides Michx.) from Alberta*. *J. Heredity*, 86: 454-460.

Verfasser: Dipl.-Ing. Dr. Berthold Heinze
Forstliche Bundesversuchsanstalt
Institut für Forstgenetik
Hauptstraße 7
1140 Wien

FBVA-Berichte
Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien

Preis in ÖS

1953	1	Forstliche Arbeitslehre und Menschenführung. Referate von der GEFFA-Tagung 1952 in Ort bei Gmunden (Oberösterreich). 137 Seiten	vergriffen
1954	2	FRAUENDORFER, R. Forstliche Hilfstafeln. 167 Seiten	vergriffen
1955	3	LOHWAG, K. Erkenne und bekämpfe den Hausschwamm und seine Begleiter! 61 Seiten	vergriffen
1955	4	GRÖLL, H.; TRAUNINGER, W. Neuzeitliche Forstsaatguterzeugung in Pflanzplantagen. I. Teil, Plusbaumauswahl und Pflanzung. 73 Seiten	20.—
1956	5	HAFNER, F.; HEDENIGG, W. Planiergerät im forstlichen Straßen- und Wegebau. 75 Seiten	20.—
1957	6	FRAUENDORFER, R. Planung und Durchführung von Stichprobenahmen. 65 Seiten	vergriffen
1958	7	FRAUENDORFER, R. Betriebswirtschaftliche Untersuchungen im steirischen Bauernwald. (Gemeinde Haslau 1955). 157 Seite	50.—
1985	8	POLLANSCHÜTZ, J. Waldzustandsinventur 1984. Ziele - Inventurverfahren - Ergebnisse. 29 Seiten	vergriffen
1985	9	GLATTES, F.; SMIDT, S.; DRESCHER, A.; MAJER, C.; MUTSCH, F. Höhenprofil Zillertal. Untersuchung einiger Parameter zur Ursachenfindung von Waldschäden. Einrichtung und Ergebnisse 1984. 81 Seiten	vergriffen
1985	10	MERWALD, I. Lawinenereignisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1974/75, 1975/76 und 1976/77. 76 Seiten	80.—
1986	11	STAGL, W.; DRESCHER, A. Wild - Vegetation - Forstschäden. Vorschläge für ein Beurteilungsschema. 19 Seiten	30.—
1986	12	NATHER, J. Proceedings of the International Symposium on Seed Problems under Stressfull Conditions, Vienna and Gmunden, Austria June 3.-8. 1985. 287 Seiten	vergriffen
1986	13	SMIDT, S. Bulkmessungen in Waldgebieten Österreichs. Ergebnisse 1984 und 1985. 32 Seiten	vergriffen
1986	14	EXNER, R. Die Bedeutung des Lichtfaktors bei Naturverjüngung. Untersuchungen im montanen Fichtenwald. 48 Seiten	vergriffen
1986	15	MERWALD, I. Lawinenereignisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1977/78, 1978/79 und 1979/80. 81 Seiten	90.—
1986	16	HAUK, E.; HÖLLER, P.; SCHAFFHAUSER, H. Lawinenereignisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1984/85 und 1985/86. 90 Seiten	90.—
1987	17	MERWALD, I. Lawinenereignisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1980/81 und 1981/82. 74 Seiten	80.—
1987	18	EXNER, R. Erhaltung und Verjüngung von Hochlagenbeständen. Strukturanalysen im subalpinen Fichtenwald (Niedere Tauern, Radstadt/Salzburg). 102 Seiten	100.—

1987	19	HAUPOLTER, R. Baumsterben in Mitteleuropa. Eine Literaturübersicht. Teil I: Fichtensterben. KREHAN, H.; HAUPOLTER, R. Forstpathologische Sondererhebungen im Rahmen der Österreichischen Waldzustandsinventur 1984-1988. Kiefernbestände - Bucklige Welt.. 73 Seiten	vergriffen
1987	20	GLATTES, F.; SMIDT, S. Höhenprofil Zillertal. Untersuchung einiger Parameter zur Ursachenfindung von Waldschäden. Ergebnisse von Luft-, Niederschlags- und Nadelanalysen 1985. 65 Seiten	vergriffen
1987	21	RUETZ, W.; NATHER, J. Proceedings of the IUFRO Working Party on Breeding Strategy for Douglas-Fir as an Introduced Species. Working Party: S2.02-05. Vienna, Austria June 1985. 300 Seiten	300,—
1987	22	JOHANN, K. Standraumregulierung bei der Fichte. Ausgangsbaumzahl - Stammzahlreduktion - Durchforstung - Endbestand. Ein Leitfaden für den Praktiker. 66 Seiten	60,—
1987	23	POLLANSCHÜTZ, J.; NEUMANN, M. Waldzustandsinventur 1985 und 1986. Gegenüberstellung der Ergebnisse. 98 Seiten	100,—
1987	24	KLAUSHOFER, F.; LITSCHAUER, R.; WIESINGER, R. Waldzustandsinventur Untersuchung der Kronenverlichtungsgrade an Wald- und Bestandesrändern. 94 Seiten	100,—
1988	25	JOHANN, K. Ergebnisse einer Rotfäuleuntersuchung in sehr wüchsigen Fichtenbeständen. 88 Seiten	90,—
1988	26	SMIDT, S.; GLATTES, F.; LEITNER, J. Höhenprofil Zillertal. Meßbericht 1986. Luftschadstoffmessungen, Meteorologische Daten, Niederschlagsanalysen. 114 Seiten	120,—
1988	27	SMIDT, S. Messungen der nassen Deposition in Österreich. Meßstellen, Jahresmeßergebnisse, Literatur. 72 Seiten	80,—
1988	28	Forum Genetik - Wald - Forstwirtschaft. Bericht über die 5. Arbeitstagung von 6. bis 8. Oktober 1987. Kongresshaus Innsbruck. 192 Seiten	200,—
1988	29	KRISSL, W.; MÜLLER, F. Mischwuchsregulierung von Fichte und Buche in der Jungwuchsphase. 52 Seiten	50,—
1988	30	MARCU, GH.; TOMICZEK, C. Eichensterben und Klimastress. Eine Literaturübersicht. 23 Seiten	30,—
1988	31	KILIAN, W. Düngungsversuche zur Revitalisierung geschädigter Fichtenbestände am Ostrong. 50 Seiten	50,—
1988	32	SMIDT, S.; GLATTES, F.; LEITNER, J. Höhenprofil Zillertal, Meßbericht 1987. 234 Seiten	250,—
1988	33	ENK, H. 10 Jahre Kostenuntersuchung bei Tiroler Agrargemeinschaften und Gemeindewäldern. 124 Seiten	130,—
1988	34	KREHAN, H. Forstpathologische Sondererhebungen im Rahmen der Österreichischen Waldzustandsinventur 1984-1988. Teil II: Fichtenbestände im Ausserfern (Tirol) und im grenznahen Gebiet des Mühl- und Waldviertels. 60 Seiten	60,—
1988	35	SCHAFFHAUSER, H. Lawineneignisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1986/87. 138 Seiten	145,—
1989	36	Beiträge zur Wildbacherosions- und Lawinenforschung (8). IUFRO-Fachgruppe S1.04-00. Vorbeugung und Kontrolle von Wildbacherosion, Hochwässer und Muren, Schneeschäden und Lawinen. 128 Seiten	130,—

1989	37	RACHOY, W.; EXNER, R. Erhaltung und Verjüngung von Hochlagenbeständen. 100 Seiten	105.—
1989	38	MERWALD, I. Lawinenereignisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1982/83, 1983/84. 92 Seiten	100.—
1989 Sonderheft		SCHNEIDER, W. Verfahren, Möglichkeiten und Grenzen der Fernerkundung für die Inventur des Waldzustandes. 118 Seiten	200.—
1989	39	KREHAN, H. Das Tannensterben in Europa. Eine Literaturstudie mit kritischer Stellungnahme. 58 Seiten	60.—
1989	40	KRISSL, W.; MÜLLER, F. Waldbauliche Bewirtschaftungsrichtlinien für das Eichen-Mittelwaldgebiet Österreichs. 134 Seiten	140.—
1990	41	KILLIAN, H. Bibliographie zur Geschichte von Kloster, Forstlehranstalt und Forstlicher Versuchsanstalt Mariabrunn - Schönbrunn. 162 Seiten	165.—
1990	42	JEGELTSCH, F. Wildbachereignisse in Österreich 1974 - 1976 und Kurzfassung der Wildbachereignisse in Österreich in den Jahren 1974 - 1987. 98 Seiten	100.—
1990	43	Beiträge zur Wildbacherosions- und Lawinenforschung (9). IUFRO-Fachgruppe S1.04-00. Vorbeugung und Kontrolle von Wildbacherosion, Hochwässer und Muren, Schneeschäden und Lawinen. 80 Seiten	80.—
1990	44	SMIDT, S.; HERMAN, F.; LEITNER, J. Höhenprofil Zillertal. Meßbericht 1988. Luftschadstoffmessungen, Meteorologische Daten, Niederschlagsanalysen. 33 Seiten	35.—
1990	44A	SMIDT, S.; HERMAN, F.; LEITNER, J. Höhenprofil Zillertal. Meßbericht 1988 (Anhang). Luftschadstoffmessungen, Meteorologische Daten, Niederschlagsanalysen. 230 Seiten	280.—
1990 Sonderheft		KILIAN, W.; MAJER, C. Österreichische Waldboden-Zustandsinventur. Anleitung zur Feldarbeit und Probenahme. 58 Seiten	70.—
1990	45	NEUMANN, MARKUS; SCHADAUER, K. Waldzustandsinventur. Methodische Überlegungen und Detailauswertungen. 88 Seiten	90.—
1990	46	Zusammenkunft der Deutschsprachigen Arbeitswissenschaftlichen und Forsttechnischen Institute und Forschungsanstalten. Bericht über die 18.Zusammenkunft vom 18.-20.April 1990. 286 Seiten	340.—
1991	47	SMIDT, S. Beurteilung von Ozonmeßdaten aus Oberösterreich und Tirol nach verschiedenen Luftqualitätskriterien. 87 Seiten	90.—
1991	48	ENGLISCH, M.; KILIAN, W.; MUTSCH, F. Österreichische Waldboden-Zustandsinventur. Erste Ergebnisse. 75 Seiten	80.—
1991	49	Österreichisches Waldschaden-Beobachtungssystem. Ziele, Methoden und erste Ergebnisse. 128 Seiten	130.—
1991	50	SMIDT, S. Messungen nasser Freilanddepositionen der Forstlichen Bundesversuchsanstalt. 90 Seiten	90.—
1991	51	HOLZSCHUH, C. Neue Bockkäfer aus Europa und Asien, I. 33 neue Bockkäfer aus der palaearktischen und orientalischen Region (Coleoptera, Cerambycidae). 75 Seiten	200.—

1991	52	FÜRST, A. Der forstliche Teil der Umgebungsüberwachung des kalorischen Kraftwerkes Dürnrohr. Ergebnisse von 1981 bis 1990. 42 Seiten	45.—
1991	53	JEGLITSCH, F. Wildbachereignisse in Österreich 1977-1979. 80 Seiten	80.—
1991	54	JEGLITSCH, F. Wildbachereignisse in Österreich 1980-1982. 78 Seiten	80.—
1991	55	WIESINGER, R.; RYS, J. Waldzustandsinventur: Untersuchung der Zuwachsverhältnisse an Wald- und Bestandesrändern. 60 Seiten	60.—
1991	56	RACHOY, W.; EXNER, R. Erhaltung und Verjüngung von Hochlagenbeständen. 60 Seiten	95.—
1991	57	SMIDT, S.; HERMAN, F.; LEITNER, J. Höhenprofil Zillertal. Meßbericht 1989/90. 28 Seiten	30.—
1991	58	STAGL, W.; HACKER, R. Weiden als Prosshölzer zur Äsungsverbesserung. 56 Seiten	60.—
1991	59	HOLZER, K.; OHENE-COFFIE, F.; SCHULTZE, U. Vegetative Vermehrung von Fichte für Hochlagenaufforstungen. Physiologische und phänologische Probleme der Anpassung. 73 Seiten	75.—
1991	60	HOLZSCHUH, C. Neue Bockkäfer aus Asien II. 63 neue Bockkäfer aus Asien, vorwiegend aus China und Thailand, (Coleoptera: Disteniidae und Cerambycidae). 71 Seiten	140.—
1992	61	STAGL, W. Auswertung der "Trakte" zum Staatsvertrag "Vereinbarung zwischen Bund und dem Land Kärnten über gemeinsame Maßnahmen zur Sicherung eines ausgewogenen Verhältnisses von Wald und Wild". 62 Seiten	105.—
1992	62	JEGLITSCH, F. Wildbachereignisse in Österreich 1983-1985. 72 Seiten	75.—
1992	63	FÜRST, A. Blatt- und nadelanalytische Untersuchungen im Rahmen des Waldschaden Beobachtungssystems. Ergebnisse 1989. 37 Seiten	40.—
1992	Sonderheft 1	DRAGOVIC, N. Terminologie für die Wildbachverbauung. Fachwörterbuch deutsch - serbokroatisch. Terminologija Uredjenja Bujicnih Tokova. Recnik Strucnih Termina Srpskohrvatsko - Nemacki. 43 Seiten	50.—
1992	64	JEGLITSCH, F. Wildbachereignisse in Österreich 1986-1988. 91 Seiten	95.—
1992	65	NATHER, J. (HRSG.) Proceedings of the meeting of IUFRO - WP S2.02-21 on "Actual problems of the legislation of forest reproductive material and the need for harmonization of rules at an international level". Gmunden / Vienna - Austria, June 10. - 14. 1991. 180 Seiten	200.—
1992	66	JEGLITSCH, F. Wildbachereignisse in Österreich 1989. 60 Seiten	60.—
1992	67	Ökosystemare Studien in einem inneralpinen Tal. Ergebnisse aus dem Projekt "Höhenprofil Zillertal". 152 Seiten	180.—
1992	68	LUZIAN, R. Lawinenergebnisse und Witterungsablauf in Österreich. Winter 1987/88, 1988/89, 1989/90, 1990/91. 188 Seiten	200.—

1992	69	HOLZSCHUH, C. Neue Bockkäfer aus Asien III. 57 neue Bockkäfer aus Asien. Vorwiegend aus China, Thailand und Vietnam (Coleoptera, Cerambycidae). 63 Seiten	120.—
1992	70	Ökosystemare Studien im Kalkalpin. Erste Ergebnisse aus dem Projekt "Höhenprofile Achenkirch". 103 Seiten	100.—
1992	71	Österreichisches Waldschaden-Beobachtungssystem. Beiträge zum WBS-Seminar vom 23. April 1992. 111 Seiten	115.—
1992	72	VOSHMIGIR, D. (BEARB.). Das Schrifttum der Forstlichen Bundesversuchsanstalt. Teil IV: 1974 bis 1990. 115 Seiten	80.—
1993	73	MÜLLER, F. Auswahl und waldbauliche Behandlung von Gen-Erhaltungswäldern. 24 Seiten	25.—
1993	74	Lawinenbericht 1991/92. Dokumentation und Fachbeiträge. 110 Seiten	80.—
1993	75	HOLZSCHUH, C. Neue Bockkäfer aus Europa und Asien IV. 60 neue Bockkäfer aus Asien, vorwiegend aus China und Thailand (Coleoptera: Cerambycidae). 63 Seiten	100.—
1994	76	SCHADAUER, K. Baumartenatlas für Österreich. Die Verbreitung der Baumarten nach Daten der Österreichischen Waldinventur. 160 Seiten	200.—
1994	77	KAISER, A. Projekt "Höhenprofil Zillertal" Analyse der vertikalen Temperatur- und Windstruktur und ihr Einfluß auf die Immissionskonzentrationen. 95 Seiten	80.—
1994	78	HERMAN, F.; SMIDT, S. Ökosystemare Studien im Kalkalpin. Höhenprofil Achenkirch. Ergebnisse aus dem Bereich Phyllosphäre. 134 Seiten	120.—
1994	79	FÜRST, W.; JOHANN, K. Modellkalkulationen zum Naturverjüngungsbetrieb. 53 Seiten	55.—
1994	80	ANDRECS, P. Schadensereignisse in Wildbacheinzugsgebieten Österreichs 1990 und 1991. 47 Seiten	50.—
1994	81	GEBUREK, T.; MÜLLER, F.; SCHULTZE, U. Klimaänderung in Österreich. Herausforderung an Forstgenetik und Waldbau. 113 Seiten	100.—
1994	82	KILIAN, W.; MÜLLER, F.; STARLINGER, F. Die forstlichen Wuchsgebiete Österreichs Eine Naturgliederung nach walddökologischen Gesichtspunkten. 60 Seiten	70.—
1995	83	JOHANN, K. Ergebnis der Großdüngungsversuche St. Martin und Flachau Ertragskundlicher Abschlußbericht. 102 Seiten	100.—
1995	84	HOLZSCHUH, C. Beschreibung von 65 neuen Bockkäfern aus Europa und Asien, vorwiegend aus Thailand und China (Coleoptera: Disteniidae und Cerambycidae). 63 Seiten	60.—
1995	85	KRISTÖFEL, F.; POLLANSCHÜTZ, J. Entwicklung von Fichtenpflanzen nach Triebrückschnitten. 17 Seiten	20.—
1995	86	CECH, T.; TOMICZEK, C. Forstpathologische Erhebungen im Gebiet Achenkirch. 46 Seiten	50.—
1995	87	HERMAN, F., SMIDT, S. Ökosystemare Studien im Kalkalpin - Bewertung der Belastung von Gebirgswäldern, Schwerpunkt Rhizosphäre. 288 Seiten	450.—

1995	88	CECH, T.; PERNY, B.; DONAUBAUER, E. Wipfelsterben an Jungfichten in Österreich und beteiligte Mikropilze. 32 Seiten	50.—
1995	89	MARKART, G.; KOHL, B. Starkregensimulation und bodenphysikalische Kennwerte als Grundlage der Abschätzung von Abfluß- und Infiltrationseigenschaften alpiner Boden- / Vegetationseinheiten. Ergebnisse der Beregnungsversuche im Mustereinzugsgebiet Löhnersbach bei Saalbach in Salzburg. 38 Seiten	60.—
1995	90	LANG, E. Starkregensimulation - Ein Beitrag zur Erforschung von Hochwasserereignissen . 70 Seiten	100.—
1995	91	LUZIAN, R.; RAMMER, L.; SCHAFFHAUSER, H. Lawinenbericht 1992/93 - Dokumentation und Fachbeiträge. 52 Seiten	80.—
1995	92	SCHIELER, K.; BÜCHSENMEISTER, R.; SCHADAUER, K. Österreichische Forstinventur - Ergebnisse 1986/90. 262 Seiten	250.—
1996	93	NEUMANN, M. (HRSG.) Österreichisches Waldbeobachtungssystem Beiträge zum 4. WBS-Seminar in Wien am 23. November 1995. 177 Seiten	260.—
1996	94	HERMAN, F.; SMIDT, S. Ökosystemare Studien im Kalkalpin Abschätzung der Gefährdung von Waldökosystemen. 291 Seiten	350.—
1997	95	MÜLLER, F. Waldbau an der unteren Waldgrenze. 129 Seiten	190.—
1997	96	LANG, E.; STARY, U.; KOHL, B.; MARKART, G.; PROSKE, H.; TRINKAUS, P.; ANDRECS, P.; GOTTSCHLING, H. Beiträge zur Wildbachforschung. 51 Seiten	80.—
1997	97	RASCHKA, H.-D. Forstliche Biomasseproduktion im Kurzumtrieb. 29 Seiten	50.—
1997	98	KELLER, G. Mykosoziologische Studie über die Mykorrhizapilze der Zirbe - Artenspektrum und Sukzession in der hochsubalpinen Stufe der Tiroler Zentralalpen. 74 Seiten	110.—
1997	99	SMIDT, ST. Lexikon für waldschädigende Luftverunreinigung mit Index Deutsch-Englisch/Englisch-Deutsch. 209 Seiten	318.—
1997	100	KRONFUSS, H. Das Klima einer Hochlagenaufforstung in der subalpinen Höhenstufe - Haggen im Sellraintal bei St. Sigmund, Tirol (Periode 1975 - 1994). 331 Seiten	400.—
1998	101	NEUMANN, M. Waldwachstumskundlicher Rauchhärte-test „Arnodstein“ - Auswertung einer 25jährigen Fallstudie . 42 Seiten	60.
1998	102	JUNGWIRTH, P. Zuwachsuntersuchungen an Fichte in verschiedenen Seehöhenstufen in den südlichen Zwischenalpen Österreichs . 54 Seiten	80.—
1998	103	SCHULTZE, U. Untersuchung der Angepaßtheit von Fichtensämlingen an die Seehöhe Klimakammertestung der Fichtenbeerntungen der Reifejahre 1991 und 1992. 38 Seiten	60.—
1998	104	ENGLISCH, M. & KILIAN, W. (HRSG.). Anleitung zur Forstlichen Standortskartierung in Österreich. 112 Seiten	170.—
1998	105	HEINZE, B. Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridpappelklonen. 44 Seiten	70.—

