

Isoenzymatische Untersuchungen an einem Apfelbaum (*Malus*, Rosaceae) in Stubbendorf, Landkreis Rostock, zur Klärung des Einflusses von *Malus x domestica* BORKH. auf den Wildstatus

Wolf-Peter Polzin¹, Dr. Iris Wagner²

¹ Untere Naturschutzbehörde, Landkreis Rostock, Am Wall 3-5, 18273 Güstrow, wolf-peter.polzin@Lkros.de

² Forschungsinstitut Pro Arbore, Gustav-Adolf-Str. 3, 01219 Dresden, iriswagner@aol.com

Zusammenfassung

An einem ca. 220 Jahre alten Apfelbaum wurden isoenzymatische Untersuchungen vorgenommen und mit morphologischen Merkmalen verglichen, um klären zu helfen, ob es sich bei dem Exemplar um einen Wildapfel handelt. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Baum mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als *Malus sylvestris* angesprochen werden kann, auch wenn einige der morphologischen Befunde einen geringen Kultureinfluß nahelegen.

Einleitung

Der Holz-Apfel (*Malus sylvestris* (L.) MILL.) ist die einzige in Mitteleuropa heimische *Malus*-Art. Sie stammt wahrscheinlich aus dem Verwandtschaftskreis des Kaukasus-Apfels (*Malus orientalis* UGLITZK.) und drang nach der letzten Eiszeit aus Zentralasien nach Westen vor und etablierte sich in Europa als eigenständige Art (KUTZELNIGG, 1995; MEUSEL et al., 1965). Erst später gelangten Kulturapfelarten aus Asien entlang der Seidenstraße nach Europa und wurden hier weiter gezüchtet und verbreitet (HARRIS 2002; SCHWEINGRUBER, 1979; ZOHARY & SPIEGEL-ROY, 1975). Aufgrund seiner standortbedingten Konkurrenzschwäche einerseits und der Lebensraumfragmentierung

durch den Menschen andererseits zählt der Holz-Apfel zu den seltensten Gehölzen der europäischen Flora und gilt als stark gefährdet (KLEINSCHMIT et al., 1998).

Ein zusätzliches Gefährdungspotential entsteht durch die Hybridisierungsmöglichkeit zwischen Wild- und Kulturapfel (LARSEN et al., 2008). Wie weit die genetische Vermischung tatsächlich stattgefunden hat, ist bislang qualitativ und quantitativ unzureichend geklärt. Auch nach der vollständigen Sequenzierung eines Kulturapfel-Genoms durch VELASCO et al. (2010) ist die Frage weiterhin strittig, welche Rollen die beiden Wildarten *M. sylvestris* und *M. sieversii* (LEBED.) M. ROEM. bei der Domestikation spielten (COART et al., 2003, 2006; CORNILLE et al., 2012;

HARRISON & HARRISON, 2012; LARSEN et al. 2006; MICHELETTI et al., 2011).

Auf dem Treffpunkt der Gemarkungsgrenzen von Stubbendorf, Ehmendorf (Landkreis Rostock) und Kölzow (Landkreis Vorpommern-Rügen) wächst ein Apfelbaum, dessen Wildstatus seit langer Zeit angenommen wird. Das Alter des Baumes ist seinerzeit mit bis zu 500 Jahren geschätzt worden, was aber allein auf der Interpolation des Zuwachses an einem abgebrochenen Ast beruhte (KOKESCH, 1984). Wahrscheinlich wird sein tatsächliches Alter auf 200 – 250 Jahre korrigiert werden müssen. Im Dezember 2006 brach einer von drei verbliebenen Stämmlingen. Die beiden anderen folgten in den Jahren 2008 und 2010, behielten aber eine physiologische Verbindung zum Stamm und blühten im Mai 2013 reichlich. An der Stelle, an der ein wahrscheinlich in den 1970er Jahren gebrochener Stämmling den Boden berührt, haben sich zwei große Apfelsträucher entwickelt.

Der Apfelbaum ist als Naturdenkmal ausgewiesen, seine Umgebung, zu der eine Grenzeiche und eine Ulme gehören, wurde als Geschützter Landschaftsbestandteil festgesetzt.

Die vorliegende Arbeit soll klären helfen, ob es sich bei dem Apfel um einen echten Holz-Apfel handelt und wie groß ggf. der Kultureinfluß ist. Neben morphologischen Merkmalen wurde dazu eine genetische (Isoenzyme) Untersuchung durchgeführt.

Material und Methode

Für die biochemische Untersuchung wurden im März 2010 mehrere Langtriebe von ca. 30 bis 50 cm Länge mit vegetativen Knospen entnommen. Im Labor wurden die Knospen zum Austrieb gebracht und die frisch ausgetriebenen Blätter für die Isoenzymanalyse vorbereitet. Je Probe wurden ca. 1 cm² Blattmaterial unter Verwendung von

zwei Extraktionspuffern homogenisiert. Für die Tris-Citrat-/Lithiumborat-Enzymsysteme wurde ein 0,1 M-Tris-Maleat-Extraktionspuffer (pH 7,4) verwendet, der 20 % Glycerol, 10 % lösliches PVP-40, 25 % Triton X-100 und 14 mM 2-Mercaptoethanol enthielt. Den Histidin-Systemen angepaßt war ein 0,05 M Kaliumphosphat-Extraktionspuffer (pH 7,0) mit 14 mM 2-Mercaptoethanol. Die Analysen fanden auf Stärkegelelektrophorese in zwei unterschiedlichen Elektrodenpuffern statt. Die Gelscheiben des Tris-Citrat-/Lithiumborat-Puffer (pH 8,4) wurden auf Aspartataminotransferase (AAT, EC 2.6.1.1), Glycosephosphat-Isomerase (GPI/PGI, EC 5.3.1.9) und Triosephosphat-Isomerase (TPI, EC 5.3.1.1) angefärbt. Die Gelscheiben des Histidinpuffers (pH 6,5) sind auf Diaphorase (DIA, EC 1.6.4.3), 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGD, EC 1.1.1.44), Phosphoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1), Malat-Dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) und Isocitrat-Dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42) gefärbt worden.

Insgesamt wurden 13 Enzymmarker (10 polymorphe Genorte, 3 polymorphe Zonen) untersucht, die sich folgendermaßen auf die 8 Enzymsysteme verteilen: GPI: 1, TPI: 1, AAT: 2, DIA: 2, PGM: 3, 6PGD: 2, MGD: 1, IDH: 1.

Grundsätzliches zur Isoenzymanalyse ist HATTEMER et al. (1993) zu entnehmen. Der Interpretation von Isoenzym-Phänotypen liegen die Arbeiten von WEEDEN & LAMB (1985, 1987), WENDEL & WEEDEN (1989), WAGNER & WEEDEN (2000, 2001) sowie schriftliche Mitteilungen von MANGANARIS (2001) und WEEDEN (2001) zugrunde.

Ergebnisse

Das Ergebnis der Isoenzymanalyse ist in der Tabelle 1 dargestellt.

An keinem der hier untersuchten Genorte läßt sich ein Kultureinfluß auf den Stubbendorfer Apfel nachweisen. Zumindest liefert die Analyse der Enzy-

me keine entsprechenden Hinweise. Die Einschätzung, daß der Baum ein naturnahes bzw. kulturfernes Genom trägt, ist möglich, nachdem eine bestimmte Anzahl kulturapfeltypischer Genvarianten geprüft und ausgeschlossen werden konnte. Auch in einem statistischen Vergleich mit mehreren hundert vermeintlichen Wild- und Kulturäpfeln (vgl. WAGNER, 2011) hat der Stubbendorfer Apfel einen hohen Zugehörigkeitskoeffizienten; die Wahrscheinlichkeit, daß er zur abgeleiteten Wildgruppe gehört, ist sehr hoch. Das phänotypische Bild des Apfelbaumes liefert keine ganz eindeutigen Hinweise auf seinen Status. Die über mehrere Jahre beobachteten und in gewissen Grenzen variierenden Merkmale sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Merkmale wurden aus KÜHN (1997) übernommen, verändert und ergänzt; diejenigen Merkmale mit einer so großen Variabilität, daß eine Zuordnung nicht möglich ist, wurden nicht berück-

Enzymsystem / Genort bzw. Zone*	Enzymvariante (internationale Bezeichnung)
GPI – B* [-2]	XI
TPI – E [-5]	aa
AAT – A [-1]	bb
AAT – B [-2]	aa
PGM – A [-1]	cc
PGM – D* [-4]	II
PGM – E [-5]	aa
DIA – B [-2]	aa
DIA – D [-4]	ab
6PGD – A [-1]	ab
6PGD – B* [-2]	I
MDH – D [-4]	aa
IDH – A [-1]	bb

Tabelle 1: Die an den jeweiligen Genorten gefundenen Enzymvarianten für den Stubbendorfer Apfel

sichtigt. Aus der Übersicht in der Tabelle 2 wird deutlich, daß die meisten morphologi-

Merkmal	Stubbendorfer Apfel	Holz-Apfel (<i>M. sylvestris</i>)	Kulturapfel (<i>M. x domestica</i>)
Habitus	altersbedingt breite, sparrige Krone, licht, im Feinastbereich dicht	besenartig, ± aufstrebend, lichte Krone	breite, „sparrige“, dichte Krone
Rinde	fein- bis altersbedingt grobrissig	feinrissig (eschenähnlich)	plattig (bergahornähnlich)
Zweige Farbe Behaarung	rotbraun fast kahl	rotbraun bis oliv gering	braun, silbrig scheinend behaart
Knospen Form Farbe Behaarung	klein, spitz rotbraun kahl	klein, spitz rotbraun gering	größer, rundlich braun, silbrig scheinend ± stark
Blätter Form Behaarung Spitze	länglich-rund fehlend (0) schief	länglich-rund gering oder fehlend (0-1) schief	± länglich ± stark (2-3) gerade
Blüte Kronblätter Ø Kelchblatt-Behaarung Blütenbecher-Behaarung Blütenstiel-Behaarung	sich selten berührend 3,0 – 4,5 cm gering (1) mittel (2) gering bis mittel (1-2)	sich nicht berührend 2,8 – 4,5 cm gering oder fehlend (0-1) gering oder fehlend (0-1) gering oder fehlend (0-1)	meist sich deckend 4 – 5 cm mittel bis stark (2-3) mittel bis stark (2-3) mittel bis stark (2-3)
Frucht Ø Stielgrube Kelchgrube Fruchtstiel Fruchtfarbe Geschmack	2,5 – 4,5 cm flach, deutlich vorhanden flach dünn unreif grün, reif gelb herbsauer, bitter	2 – 4 cm ± flach fehlend oder sehr flach dünn unreif grün, reif gelb herbsauer, bitter	> 3,5 cm ± tief ± tief ± dick verschieden sauer, süß, nicht bitter
Wasserreiser	ja, wenige	ja, vor allen an Schadstellen	nein
Bedornung	nein	ja, v.a. bei Stammaustrrieben	nein
Feuerbrandanfälligkeit	nicht beobachtet	nicht bekannt	ja

Tabelle 2: Vergleich der morphologischen Merkmale von Holz- und Kulturapfel mit denen des Stubbendorfer Apfels

schen Merkmale des untersuchten Baumes in Richtung Holz-Apfel tendieren, bei einigen gibt es Überschneidungen und zumindest eine nicht eindeutige Zuordnung. Insgesamt wird ein – wenn auch geringer, aber immerhin unverkennbarer – Sorteneinfluß signalisiert. Besonders deutlich wird das bei der Behaarung von Blütenstiel und Blütenbecher.

Diskussion

Das Ergebnis der isoenzymatischen Untersuchung läßt den zweifelsarmen Schluß zu, daß es sich bei dem Stubbendorfer Apfel tatsächlich um einen Holz-Apfel handelt. Bemerkenswert ist das insoweit, als es sich bei dem Standort um einen Gemarkungstripelpunkt handelt und dieser ganz offensichtlich bepflanzte wurde, um eine weit hin sichtbare Landmarke zu schaffen. Die Stiel-Eiche (*Quercus robur*, ca. 120 Jahre) des Standortes steht dabei zu je einem Drittel in den betroffenen Gemarkungen, ist also ein typischer Grenzbaum. Auch die beiden anderen Bäume, eine Ulme (*Ulmus spec.*, ca. 40 Jahre) und der Apfelbaum, dürften angepflanzt worden sein. Die Auswertung alten Kartenmaterials ergab, daß zur fraglichen Zeit an diesem Standort kein Wald stockte. Das trifft im Übrigen auch für den Zeitraum zu, die man für ein Alter von 500 Jahren betrachten müßte. Damit scheidet die Annahme aus, das Feldgehölz könne das Relikt eines gerodeten Waldes sein.

Bei einem geschätzten Alter von 200 bis 250 Jahren fällt die Pflanzung damit in eine Zeit, zu der in Mecklenburg bereits eine intensive und erfolgreiche Obstbaukultur gepflegt wurde (MLT, 1996). Es wäre ungewöhnlich, aber nicht ausgeschlossen, an einer so prominenten Stelle einen – in den Augen vieler eher minderwertigen – Wildapfel zu pflanzen anstelle etwa einer Mecklenburger Sorte jener Zeit. Ausgeschlossen ist das schon deswegen

nicht, weil auch die Früchte des Holz-Apfels beständig genutzt wurden, wenn gleich nicht als Tafeläpfel.

Ist auf der genetischen Ebene die Zuordnung zur Wildart *M. sylvestris* zunächst eindeutig, so ist anzumerken, daß sich diese Aussage auf die hier untersuchten Genorte bezieht. Es ist also nicht ausgeschlossen, an anderen Genorten nicht doch den Einfluß des Kulturapfels nachweisen zu können.

Seit der Apfelbaum unter behördlicher Beobachtung steht (nicht zuletzt wegen der Fragen der Verkehrssicherheit), wird das Problem der kulturbeeinflussten Merkmale diskutiert; insbesondere die Behaarung der Blütenteile (Blütenbecher, -stiel) zeigt dies an. Einige der morphologischen Merkmale treten in die Mitte zwischen Wild- und Kulturform, so daß die Zuordnung morphologisch schon deswegen zu nicht ganz eindeutigen Ergebnissen führt. Daß genetische und morphologische Befunde am Einzelbaum nicht immer und nicht zwingend zu kongruenten Resultaten führen, ist auch von anderen Baumarten bekannt. Ungeachtet dessen sprechen die vorliegenden Daten dafür, daß es sich bei dem Stubbendorfer Apfel mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um *M. sylvestris* handelt, in dem sich an der ein oder anderen Stelle Einkreuzungsereignisse manifestiert haben und die in geringem Umfang phänotypisch sichtbar werden. Vertiefende Untersuchungen, insbesondere an der Chloroplasten-DNA (die nur von der Mutter vererbt wird) könnten weiteren Aufschluß über den Status geben.

LITERATUR

CORNILLE, A., P. GLADIEUX, M.U.M. SMULDERS, I. ROLDÁN-RUIZ, F. LAURENS et al. (2012): New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet.* 8 (5): 1-12

COART, E. (2003): Molecular contributions to the conservation of forest genetic resources in Flanders: Genetic diversity of

Malus sylvestris, *Quercus* spp. and *Carpinus betulus*. Diss Univ. Gent

COART, E., S. VAN GLABEKE, M. DE LOOSE, A.S. LARSEN & I. ROLÁDN-RUI (2006): Chloroplast diversity in the genus *Malus*. New insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) MILL.) and the domesticated apple (*Malus domestica* BORKH.). *Molec. Ecol.* 15: 2171-2182

HARRISON, N. & R.J. HARRISON (2011): On the evolutionary history of the domesticated apple. *Nat. Genet.* 43: 1043-1044

HATTEMER, H.H., F. BERGMANN & M. ZIEHE (1993): Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. Frankfurt/M.: Sauerländer

KLEINSCHMIT, J., R. STEPHAN & I. WAGNER (1998): Wild fruit trees (*Prunus avium*, *Malus sylvestris* and *Pyrus pyraeaster*). In: J. Turok, E. Colin, B. Demesure, G. Eriksson, J. Kleinschmit, M. Rusanen & R. Stephan (comp.): European forest genetic resources programme: Noble hardwood network, Report of the second meeting, 22-25 March 1997, Lourizán, Spain: 51-60

KOKESCH F. (1984): Stärkster Wildapfelbaum Mecklenburgs? Naturschutzarbeit in Mecklenburg 27 (2): 116

KÜHN, R. (1997): Holzapfel und Holzbirne – wie man sie erkennt, sucht, schützt und vermehrt.. *Natursch. Alb-Neckar* 3/97: 1-17

KUTZELNIGG (1995): *Malus*. In: G. Hegi: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. IV Teil 2B: 298-328. Berlin: Blackwell

LARSEN, A.S., C.B. ASMUSSEN, E. COART, D.C. OLRİK & E.D. KJÆR (2006): Hybridization and genetic variation in Danish populations of european crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genet. Genom* 2 (2): 86-97

LARSEN, A.S., M. JENSEN & E.D. KJÆR (2008): Crossability between wild (*Malus sylvestris*) and cultivated (*M. x domestica*) apples. *Silv. Genet.* 57 (3): 127-130

MEUSEL, H., E. JÄGER & E. WEINERT (1965): Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Text und Karten, Bd. 1. Jena: Fischer

MICHELETTI, D., M. TROGGIO, A. ZHARKIKH, F. COSTA, M. MALNOY, R. VELASCO & S. SALVI (2011): Genetic diversity of the genus *Malus* and implications for linkage mapping with SNPs. *Tree Genetics and Genomes* 7: 857-868

MLT – MECKLENBURGER LANDSCHAFTS- UND TERRITORIALENTWICKLUNG WARNOW-OST e.V. (1996): Streuobstkartierung in Mecklenburg-Vorpommern vor dem geschichtlichen Hintergrund obstbaulicher Tradition. Dummerstorf (unpubl.)

VELASCO, R., A. ZHARKIKH, J. AFFOURTIT, A. DHINGRA, A. CESTARO, A. KALYANARAMAN, P. FONTANA, S.K. BHATNAGAR, M. TROGGIO, D. PRUSS, S. SALVI, M. PINDO et al. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* BORKH.). *Nature Genetics* 42 (10): 833-842

WAGNER, I. (2011): Bestimmen von Kulturferne bei Wildobst – Beispiel *Malus sylvestris* (L.) MILL. In: D. Maurer & B. Haase (Hrsg.): Holzproduktion auf forstgenetischer Grundlage im Hinblick auf Klimawandel und Rohstoffverknappung. *Mitt. FAWF RP* 69: 187-194

WAGNER, I., W. MAURER, H.P. SCHMITT & U. TABEL (2004): Isozyme polymorphism and genetic structure of *Malus sylvestris* (L.) MILL. native in eastern areas of Germany with respect to *Malus domestica* BORKH. In: XI Eucarpia Symp. *Fruit Breeding Genet.* 663: 545-550

WAGNER, I. & N.F. WEEDEN (2000): Isozyme in *Malus sylvestris*, *Malus domestica* and related *Malus* species. *Acta Hort* 538: 51-56

WAGNER, I & N.F. WEEDEN (2001): Genetische Identifizierung von *Malus sylvestris* als Voraussetzung für seine nachhaltige Nutzung. *Schrift. Sächs. Landesanst. For.*: 145-150

WEEDEN, N.F. & R.C. LAMB (1985): Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110 (4): 509-514

WEEDEN N.F. & R.C. LAMB (1987): Genetics and linkage analysis of 19 isozyme loci in apple. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112 (5): 865-872

WENDEL, J.F. & N.F. WEEDEN (1989): Visualization and interpretation of plant isozymes. In: D.E. Soltis & P.S. Soltis (eds.): *Isozymes in plant biology*. Portland (OR): Dioscorides: 5-45

ZOHARY, D. & P. SPIEGEL-ROY (1975): Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science* 187: 319-327