Extended Abstract

DNA-Barcoding – Pflanzen im Wald

Berthold Heinze, Daniela Jahn, Giovanni Zucca,
Emmanuele Farris & Franz Starlinger

Für manche Laien mögen Wälder von der Baumarten-Zusammensetzung her botanisch manchmal etwas eintönig wirken, tatsächlich beherbergen sie aber in der Begleitflora natürlich auch zahlreiche weitere Pflanzenarten. Waldgesellschaften können nach der Zusammensetzung ihrer Baumschicht gruppiert werden, aber eine verfeinerte pflanzensoziologische Gliederung, die auch Böden, Standortstypen und letztlich auch ihre Produktivität wiederspiegelt, basiert auf Charakter- und Differentialarten hauptsächlich aus der Kraut- und Strauchschicht (z.B. Willner & Grabherr 2007, Staudinger & Willner 2014). Nichtsdestotrotz ist die Bestimmung von Arten der Bodenvegetation oft schwierig, weil unter einem schattigen Baumbestand nur vegetative Teile zu finden sind und Blüten oder Früchte fehlen. Tatsächlich kommen nach aktuellen Schätzungen ca. 1150 Samenpflanzen (Spermatophyten) in Österreichs Wäldern vor (Farne - Pteridophyten und Moose sind in dieser Zählung den „Kryptogamen und Pilzen" zugerechnet und nicht extra ausgewiesen). Von den insgesamt 2785 Spermatophyten kommen demnach 41 % im Wald vor, von den Farnpflanzen und Moosen 42 %. Neophyten sind aus diesem Zensus ausgeklammert. Der Begriff „Wälder" ist hier in einem weiteren Sinn zu verstehen, also einschließlich der Schlagvegetation und solcher Arten, die sowohl in Waldbeständen als auch außerhalb von Wäldern regelmäßig vorkommen. Von den 51 Baumarten gelten derzeit fünf als „*endangered*" und sechs als „*vulnerable*"; unter den Spermatophyten im Wald finden sich drei ausgestorbene („*extinct in the wild*"), 22 sind „*critically endangered*", 86 „*endangered*" sowie 159 „*vulnerable*" (Niklfeld 1986, 1999).

Das Bundesforschungszentrum für Wald (BFW) versucht derzeit, ein Barcoding-Projekt für diese „Wald-Pflanzen" zu initiieren. Falls die Finanzierung gelingt, kann die „Forschungs-Infrastruktur" des BFW dazu genutzt werden; die Österreichische Waldinventur wurde auf permanente Erhebungen umgestellt, d.h. die „Erhebungstrupps", die die Messungen, Zählungen und Beobachtungen im Inventur-Stichproben-Netzwerk machen, können (nach entsprechender Einschulung) auch Pflanzen für Barcoding sammeln. Herbar und DNA-Labors stehen zur Verfügung. Die Identifizierung von Pflanzenarten wird derzeit vom BFW bereits als Serviceleistung angeboten. Dabei wird, je nach Fragestellung, auf verschiedene DNA-basierende Untersuchungsmethoden zurückgegriffen. Die Sequenzierung von Chloroplasten-DNA, wie sie für Pflanzen-Barcoding verwendet wird, ist nur eine davon.

Ein Pilotversuch zum Barcoding von Pflanzen in Wäldern wurde in Eichenwäldern in Nord-Sardinien (Italien) gestartet. Die wärmeliebenden Eichen Sardiniens werden als *Quercus pubescens sensu latu* zusammengefasst und bedecken Standorte der Insel von den (oft nordseitigen) Bergrücken (ca. 1500 m Seehöhe) bis zu Taleinschnitten in Küstennähe. Da die weitere Untergliederung der Eichen umstritten ist, wurden in dem Pilotversuch bis zu 20 stetige Begleitarten (krautige, Sträucher und Farne) von jeweils 20 Standorten aufgesammelt, soweit möglich in mehreren Exemplaren. Die Häufigkeiten dieser Arten an den

einzelnen Standorten werden derzeit im Hinblick auf ihre Eignung zur Ausweisung verschiedener Vegetationstypen geprüft. Diese Auswertung ist natürlich durch anthropogene Landschaftveränderungen (Weidewirtschaft, Holznutzung, Landwirtschaft, Zersiedelung und Verbauung in den Ballungszentren und an der Küste) erschwert. Bisher wurden in einem *Next Generation Sequencing*-Experiment 384 DNA-Proben von acht Arten untersucht. Dafür wurden bis zu acht PCR-amplifizierte DNA-Fragmente pro DNA gemischt, mittels DNA-*tag* gekennzeichnet, und mit der Illumina-Technologie auf einem MiSeq v3 Gerät sequenziert. Die erhaltenen ca. 17 Millionen Einzelsequenzen (*reads*) werden derzeit analysiert. Die durchschnittliche Länge der reads beträgt 81 Basenpaare (bp), nach Anwendung eines Filters für hohe Qualität des *basecall*. Meist wurden zwischen 25.000 und 50.000 *reads* pro DNA-Probe erhalten. Eine erste Durchsicht der Daten scheint zu bestätigen, dass die Methode die gewünschten Sequenzen liefert, wenn auch die bekannten Probleme, z.B. bei Mononukleotid-*repeat*-Sequenzen, auftauchen.

Auf diesen Grundlagen werden die Erfolgsaussichten für das DNA-Barcoding der Pflanzen in österreichischen Wäldern im Vortrag diskutiert.

Heinze B., Jahn D., Zucca G., Farris E. & Starlinger F., 2017: Berthold Heinze et al. 2017: DNA-barcoding – plants in the forest.
To the non-expert, forests may seem monotonous aggregations of ever the same botanical species; while in fact, they harbor much diversity in the ground flora composition. Plant communities of forests can be grouped by their tree species composition, but a refined phytosociological classification, reflecting soils, site type and lastly also productivity, is based on characteristic and differential species mostly of the herb and shrub layer (e.g., Willner & Grabherr 2007, Staudinger & Willner 2014). Nevertheless, the identification of the ground vegetation species in forests often is difficult, because under a shady canopy only vegetative parts are found and flowers or fruits are missing. The current estimate of spermatophyta naturally present in Austria's forest is ca. 1150 (41 % of all spermatophyta), and similarly for ferns and bryophytes (42 %). Five of 51 tree species are considered "endangered", six more are "vulnerable". For the rest of the spermatophyta (in forests), three are "extinct in the wild", 22 "critically endangered", 86 are "endangered", and 159 "vulnerable" (Niklfeld 1986, 1999).
The Austrian Federal Research Centre for Forests (BFW) is currently trying to initiate a DNA barcoding project for "forest plants". If funded, the available "research infrastructure" of BFW can be utilized; the Austrian forest inventory is permanently sending small groups to a network of forest sampling points, for measurements and observations; sampling plants for barcoding would be rather easy for them. A herbarium and DNA laboratories are also available. We are offering DNA-based identification of plant species as a paid-for service to the public. Chloroplast DNA sequencing is one of the methods for this service.
A pilot trial for barcoding of forest plants was initiated in Northern Sardinia (Italy), in pubescent oak (*Quercus pubescencs s.l.*) forests, which cover sites from the mountain slopes (approx. 1500 m a.s.l) down to coastal valleys, corresponding to different vegetation types (Bacchetta et al. 2004). The idea is to characterize these forests according to any variation found in chloroplast DNA of the ground vegetation. Up to 20 recurring species (multiple samples per species if possible) were collected from each of 20 sites. Frequencies of the species are being analyzed for use as a classification tool. The assessment is clearly hampered by human-induced changes (agriculture, pasture, wood extraction, settlements). In a first next generation sequencing experiment, 384 specimens of eight species were included. Up to eight successfully amplified DNA fragments were mixed, tagged and sequenced in bulk on an Illumina MiSeq v3 machine. The resulting approx. 17 million single sequences are currently being analyzed. Average read length is 81 basepairs (after quality filtering), and 25,000 to 50,000 reads were obtained for each DNA sample. A first check seems to confirm the presence of the desired sequences, though the known issues of this technique, e.g. with mononucleotide repeat tracts, are there as well.

Based on these circumstances and experiences, the perspectives for success will be discussed in this presentation.

Keywords: DNA barcoding, forest plants, phytosociology, forest vegetation, next generation sequencing, *Quercus pubescens.*

Literatur

Bacchetta G., Biondi E., Farris E., Filigheddu R. & Mossa L., 2004: A phytosociological study of the deciduous oak woods of Sardinia (Italy). Fitosociologia 41, 53–65.

Niklfeld H., 1986: Rote Listen gefährdeter Pflanzen Österreichs. Grüne Reihe des Bundesministeriums für Gesundheit und Umweltschutz 5, Wien, 202 pp.

Niklfeld H., 1999: Rote Listen gefährdeter Pflanzen Österreichs. Grüne Reihe des Bundesministeriums für Umwelt, Jugend und Familie 10, Wien, 291 pp.

Staudinger M. & Willner W., 2014: Die Waldgesellschaften in den Kernzonen des Biosphärenparks Wienerwald (Vegetation units of woods in the core areas of the Biosphere Reserve Wienerwald). Wiss. Mitt. Niederösterr. Landesm. 25, 269–296.

Willner W. & Grabherr G. 2007: Die Wälder und Gebüsche Österreichs. Spektrum Akademischer Verlag, München, 302 pp.

Anschriften:

DI Dr. Berthold Heinze, Bundesforschungszentrum für Wald, Institut für Waldgenetik, Seckendorff-Gudent-Weg 8, A-1130 Wien. E-Mail: berthold.heinze@bfw.gv.at

Daniela Jahn, BSc, MSc, Bundesforschungszentrum für Wald, Institut für Waldgenetik, Seckendorff-Gudent-Weg 8, A-1130 Wien. E-Mail: daniela.jahn13@gmail.com

Dr. Giovanni Michele Zucca, University of Sassari, Department of Sciences for Nature and Environmental Resources, Via E. De Nicola, IT-07100 Sassari.
E-Mail: gmzucca@uniss.it

Dr. Emmanuele Farris, University of Sassari, Department of Sciences for Nature and Environmental Resources, Via Piandanna 4, IT-07100 Sassari. E-Mail: emfa@uniss.it

DI Dr. Franz Starlinger, Bundesforschungszentrum für Wald, Institut für Waldökologie und Boden, Seckendorff-Gudent-Weg 8, A-1130 Wien. E-Mail: franz.starlinger@bfw.gv.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien. Frueher: Verh.des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien. seit 2014 "Acta ZooBot Austria"

Jahr/Year: 2017

Band/Volume: 154

Autor(en)/Author(s): Heinze Berthold, Jahn Daniela, Zucca Giovanni, Farris Emmanuele, Starlinger Franz

Artikel/Article: DNA-Barcoding – Pflanzen im Wald 193-195