

# Genetische Methoden zur Abstammungsanalyse und Prüfung von Sortenechtheit und -reinheit

Hanna Wypukol, Sascha Liepelt, Birgit Ziegenhagen, Karl Gebhardt

## Zusammenfassung

Mikrosatelliten Marker der Zellkern-DNA wurden an Pappel und Buche eingesetzt, um zu prüfen, ob sie für eine Identifizierung bzw. Herkunftskontrolle von in Verkehr gebrachtem forstlichen Vermehrungsgut geeignet sind. Bei den untersuchten Pappel-Hybridklonen, den so genannten Max-Klonen, überzeugte die Methode, da schon drei Mikrosatelliten-Genorte ausreichten, um eine gesicherte Aussage über Sortenechtheit und -reinheit zu gewährleisten. Interessanterweise stellte sich heraus, dass zwei (Klon 1 und Klon 4) von den fünf zugelassenen Max-Klonen nicht unterscheidbar sind. Bei der Buche (*Fagus sylvatica* L.) gelingt mit den verwendeten Kern-Mikrosatelliten-Marker eine eindeutige Individualidentifizierung. Eine direkte Zuordnung von Eckern zum Mutterbaum war möglich, wenn die verwendeten vier Mikrosatelliten-Marker für einen genetischen Fingerabdruck an der Eckernschale eingesetzt wurden. Die Unterscheidung von fünf hessischen Buchenbeständen und die Zuordnung der geernteten Samen zu den Altbäumen war aufgrund privater Allele möglich. Auch eine individuelle Herkunftskontrolle ist technisch möglich, aber durch die notwendige vorherige Vollinventur der Saatgutbestände kostenintensiv. Eine Zuordnung über Stichproben, die zwangsläufig frequenzbasiert ist, zeigte sich als noch nicht belastbar genug, so dass auf Referenzproben bzw. Rückstellproben im Zuge von Kontrollverfahren derzeit noch nicht verzichtet werden kann.

**Schlagwörter:** *Fagus sylvatica* L., *Populus nigra* × *P. maximowiczii*, DNA Mikrosatelliten, Sortenechtheit, Sortenreinheit, Herkunftskontrolle

## Molecular genetic methods for seed source identification and control of variatal identity and the variatal purity

### Abstract

Nuclear microsatellite markers were applied in poplar and beech in order to test their suitability for individual identification, or seed source identification respectively. This is important for control purposes within the chain of custody of forest reproductive material. In poplar three microsatellite loci were already sufficient to guarantee the unambiguous variatal identification of poplar hybrid clones, in our case the so-called Max-clones. Surprisingly, clone 1 is not distinguishable from clone 4 with this method. In beech (*Fagus sylvatica* L.) the four nuclear microsatellite markers used were well suited for an unambiguous individual identification. It was possible to directly assign seeds to their mother trees when beechnut shells were subjected to a DNA fingerprinting. The distinction of five Hessian beech stands and the allocation of the harvested seeds to the adult trees was due to private alleles. A one-by-one assignment of seeds and mother trees, however, relies on a previous full inventory of the seed source populations and will be expensive. Furthermore, we have tested the alternative of a frequency-based assignment but it proved to be not reliable enough. The results revealed that with the microsatellite method used, there is no possibility to disclaim the reference samples.

**Key words:** *Fagus sylvatica* L., *Populus nigra* × *P. maximowiczii*, DNA microsatellite, variatal identity, variatal purity, provenance control

## 1. Einleitung

Die folgenden Untersuchungen basieren auf der molekulargenetischen Methode der Mikrosatelliten-Marker oder auch SSR („simple sequenz repeats“) genannt. Es handelt sich hierbei um neutrale, kodominante Kern-Genmarker. Diese kurzen Sequenzen kommen wiederholt an nicht kodierenden Stellen im Genom vor. Ihre Variabilität beruht auf Unterschieden in der Anzahl der Wiederholungen, was in indirekter Form durch Längenvariationen der mithilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifizierten DNA-Fragmente dokumentiert werden kann.

Im Folgenden wird die Verwendbarkeit dieser Methode im Hinblick auf die Prüfung der Sortenechtheit und Sortenreinheit der Max-Klone (*Populus nigra* × *P. maximowiczii*) geprüft. Laut WEISGERBER (1983) wurde diese Kreuzung in Japan auch als natürliche Hybridisation beobachtet. Nach eingehenden Untersuchungen des damaligen Forschungsinstitutes für schnellwachsende Baumarten wurden fünf im Wachstumsrhythmus ähnliche weibliche Klone zu einer Mehrklonsorte (Klonmischung mit festgelegten Anteilen) zusammengefasst. Diese Max-Klonsorten sind seit 1981 als „Geprüftes Vermehrungsgut“ mit dem Registerzeichen D 309 zugelassen. Nach den Vorgaben des derzeit gültigen FoVG darf die für den Vertrieb bestimmte Erzeugung nur durch angemeldete Forstsamen-/ Forstpflanzenbetriebe und nur von zugelassenem Ausgangsmaterial der Kategorie „Geprüft“ erfolgen. Als Zulassungseinheit gelten die im Erntezulassungsquartier (EZR) eingetragenen Mutterquartiere mit den zur Anzucht getrennt gehaltenen Klonen. Die Erzeugung von Vermehrungsgut ist anzeigepflichtig. Im Sinne der EU-Richtlinie 1999/105/EG und des FoVG sollen Klone, die bei der amtlichen Stelle zugelassen und registriert wurden, anhand von Unterscheidungsmerkmalen identifizierbar sein. Hierbei steht im Vordergrund der Nachweis von Verwechslungen bei der Erzeugung des

vegetativen Vermehrungsgutes aber auch Kontrollen bei den schon auf den Markt gekommenen Steckhölzern.

Im zweiten Teil der Untersuchung werden die Mikrosatelliten-Marker auf Verwendbarkeit in der Herkunftskontrolle am Beispiel der europäischen Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) getestet. In Anbetracht des Klimawandels gewinnt eine naturnahe und nachhaltige Forstwirtschaft immer mehr an Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird die Rotbuche laut SPERBER & HATZFELD (2007) zum Hoffnungsträger der deutschen Waldwirtschaft. Alte Buchenwälder werden als Saatgutspender regional bewährter Herkünfte für das Wiederaufforsten der Klima-Katastrophenflächen eingesetzt. Den Ausgangspunkt für diese genetische Untersuchung bildet die bekannte Tatsache, dass sich diese Genmarker durch eine hohe Anzahl von Allelen an den jeweiligen Genorten auszeichnen, die in unterschiedlichen Frequenzen in den Populationen vorhanden sind (VORNAM 2004). Für die Untersuchung werden die Samenschalen der Bucheckern verwendet, da sie aus dem Muttergewebe entstehen. Somit findet sich in der Samenschale als auch im Blatt des Mutterbaumes die selbe genetische Information. Eine eins zu eins Zuordnung wird damit ermöglicht, was auch schon bei *Abies alba* und *Quercus robur* sowie neuerlich an Buche gezeigt werden konnte (ZIEGENHAGEN et al. 2003; ZIEGENHAGEN et al. 2007).

Auf der Basis dieser zwei Themenkomplexe ergeben sich für die im Folgenden dargestellten Untersuchungen zwei Fragen:

- Ist es möglich mithilfe der nuklearen Mikrosatelliten-Marker die Max-Klone auf Sortenechtheit und Sortenreinheit zu prüfen?
- Ist es möglich mithilfe der nuklearen Mikrosatelliten-Marker Saatgut aus hessischen Buchenbeständen einem dieser Bestände zuzuordnen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bestände und Stichprobendesign

#### Max-Klone

Die untersuchten Max-Klone stammen aus vier Standorten innerhalb Deutschlands (Tab. 1). Zusätzlich dazu wurden Klone aus Tulln in Österreich aufgrund eines Verdachtes auf Verwechslung untersucht. Haferfeld-Vaake und das Populetum 4 aus dem Forstamt Reinhardshagen sind als Mutterquartiere für die Max-Klone zugelassen. Für die Untersuchung wurden die jungen Blätter der Knospen der Bäume verwendet, wobei von allen Standorten ein Individuum pro Klon außer in Neukirchen drei Individuen pro Klon beprobt wurden.

Tabelle 1: Standorte und Bezeichnungen der untersuchten Max-Klone (VF: Versuchsfläche)

Table 1: Locations and identification of the studied Max-Clones (VF: sample area)

Standort	Max-Klone	Parzellen-Baumnr.
Mehrklonquartier Handtuch	1-5	
Forstamt Neukirchen, Abt. 1079	1	4-5; 31-1; 41-8
	2	27-1; 15-5; 44-9
	3	47-4; 16-8; 18-2
	4	14-6; 21-8; 37-1
	5	30-6; 13-3; 35-1
Vaake, Haferfeld	1-5	
Tulln, Österreich	1-5	
Eberswalde, VF Lindhorst	1, 3, 4	
Populetum 4	1-5	

#### Buche

In die genetische Untersuchung der Buche wurden fünf hessische Bestände im Jahr 2006, die zu den Forstämtern in Lampertheim, Weilburg, Romrod, Hess. Lichtenau und Schlüchtern (Abb. 1) gehören, eingebunden. Pro Bestand gingen 14 bis 15 Bäume in die Untersuchung mit ein. Die Eckernstichprobe wurde im Rahmen des in der Forstwirtschaft üblichen Netzerntever-

fahrens entnommen und zwar bis zu 10 Samen pro Baum. Zusätzlich wurden direkt von jedem untersuchten Altbaum Knospen abgenommen. Das macht insgesamt 73 untersuchte Altbäume und 701 Samen, von denen nur die DNA der Samenschalen extrahiert wurde.



Abb. 1: Lage der untersuchten hessischen Buchenbestände (Hrsg.: Hessen-Forst)

Fig. 1: Position of the studied beech populations in Hesse (publ.: Hessen-Forst)

### 2.2 Molekulargenetische Untersuchung

#### Aufschluss der DNA

Für die Isolierung der DNA aus den jungen Blättern der Knospen bzw. aus den Samenschalen wurde die ATMAB-Methode angewendet, wie sie von DUMOLIN et al. (1995) beschrieben wurde und von uns durch den Einschluss eines RNase-Verdau leicht modifiziert wurde. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Spektrophotometers (peQLab ND-1000) bestimmt und eine 10 ng/µl DNA-Lösung für die Knospen-

blätter der Buche und der Max-Klone und eine 20 ng/μl DNA-Lösung für die Samenschalen der Buche hergestellt.

**Analyse der Mikrosatelliten-Loci**

Zur Beantwortung beider Fragestellungen wurden nukleare Mikrosatelliten-Marker verwendet, die an den jeweiligen Baumarten selbst bzw. an nahe verwandten Arten entwickelt worden sind (Tab. 2 und 3). Die

Optimierung der PCR und die darauffolgende Vermehrung der spezifischen DNA-Abschnitte erfolgte mithilfe der Thermocycler von peQLab (Primus 96 advanced) und von PERKIN ELMER (GeneAmp PCR System 9600). Die Fragmentgröße der amplifizierten DNA-Sequenzen wurde mittels eines DNA-Analysers 4300 von LICOR mithilfe der Automated Mikrosatellite Software Saga™ festgestellt.

Tabelle 2: Beschreibung der Primer zur PCR-Amplifizierung der Mikrosatelliten-Loci für die Überprüfung der Sortenechtheit und Sortenreinheit der Max-Klone

Table 2: Description of the primers for PCR amplification of the microsatellite loci for identification of the variental identity and variental purity of the Max-Clones

Bezeichnung	Sequenz	Fragmentgröße (bp)	Literatur
WPMS05_for WPMS05_rev	5'-TTC TTT TTC AAC TGC CTA ACT T-3' 5'-TGA TCC AAT AAC AGA CAG AAC A-3'	268-298	VAN DER SCHOOT ET AL. (2000)
WPMS09_for WPMS09_rev	5'-CTG CTT GCT ACC GTG GAA CA-3' 5'-AAG CAA TTT GGG TCT GAG TAT CTG-3'	250-294	VAN DER SCHOOT ET AL. (2000)
WPMS14_for WPMS14_rev	5'-CAG CCG CAG CCA CTG AGA AAT C-3' 5'-GCC TGC TGA GAA GAC TGC CTT GAC-3'	248-281	SMULDERS ET AL. (2001)
WPMS18_for WPMS18_rev	5'-CCT CAC ATA GGA CAT AGC AGC ATC-3' 5'-CAC CAG AGT CAT CAC CAG TTA TTG-3'	226-241	SMULDERS ET AL. (2001)
WPMS20_for WPMS20_rev	5'-GTG CGC ACA TCT ATG ACT ATC G-3' ATC TTG TAA TTC TCC GGG CAT CT-3'	222-228	SMULDERS ET AL. (2001)
PMGC14_for PMGC14_rev	5'-TTC AGA ATG TGC ATG ATG G-3' 5'-GTG ATG ATC TCA CCG TTT G-3'	197-212	<a href="http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm">http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm</a>

Tabelle 3: Beschreibung der Mikrosatelliten-Loci für die Abstammungsanalyse der Buche

Table 3: Description of the microsatellite loci for the derivation analysis of the beech

Bezeichnung	Sequenz	Fragmentgröße (bp)	Literatur
MFC5_for MFC5_rev	5'-ACT GGG ACA AAA AAA CAA AA-3' 5'-GAA GGA CCA AGG CAC ATA AA-3'	274-324	TANAKA ET AL. (1999)
MFC11_for MFC11_rev	5'-ACA GAT AAA AAC AGA AGC CA-3' 5'-TTT GGT TTT GTT GAG TTT AG-3'	312-330	TANAKA ET AL. (1999)
FS1-3_for FS1-3_rev	5'-CAC AGC TTG ACA CAT TCC AAC-3' 5'-TGG TAA AGC ACT TTT TCC CAC T-3'	75-163	PASTORELLI ET AL. (2003)
FS1-15_for FS1-15_rev	5'-TCA AAC CCA GTA AAT TTC TCA-3' 5'-GCC TCA ATG AAC TCA AAA AC-3'	96-140	PASTORELLI ET AL. (2003)
MFC9-2_for MFC9-2_rev	5'-TTC CCT CCT CTT CTC AAA T-3' 5'-TTA TAC TTC CTC TCT CAT CCC-3'	-	TANAKA ET AL. (1999)
FS1-11_for FS1-11_rev	5'-TGA ATT CAA TCA TTT GAC CAT TC-3' 5'-GGA AGG GTG CTT CAA TTT GG-3'	-	PASTORELLI ET AL. (2003)
FS1-25_for FS1-25_rev	5'-GAC CCA TAC CTC TCA GCT TC-3' 5'-AGA GAT CAT TGC AAC CAA AC-3'	-	PASTORELLI ET AL. (2003)

Für die Untersuchung der Max-Klone wurden sechs Primer mit modifizierten PCR-Programmen als auch PCR-Zusammensetzungen (Rathmacher, unveröffentlichte Daten) aus der angegebenen Literatur verwendet und für die Max-Klone optimiert (Tab. 4, 5, 6: WPMS05, WPMS09, WPMS14, WPMS18, WPMS20 und PMGC14. Die Gesamtmenge der Reaktions-

lösung betrug pro Reaktionsgefäß 25 µl. Darin enthalten waren 1,5 bis 1,75 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (je nach Primer siehe Tab. 6), je 2,5 µl Primer (2 µM), 1 µl dNTPs (je 5 mM), 5 µl Reaktionspuffer (5x GoTaq® Flexi Puffer, Promega), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 Units/µl, Promega) und 1-3 µl DNA (10 bzw. 20 ng/µl siehe Tab. 6).

Tabelle 4: PCR-Grundprogramm für die Primer: WPMS05, WPMS09, WPMS14, WPMS18. (X: primer-spezifische Annealingtemperatur; für X und die Wiederholungsanzahl von Schritt 2.-4., s. Tab. 6)

Table 4: Basic PCR-program for the primers: WPMS05, WPMS09, WPMS14, WPMS18. (X: primer-specific Annealingtemperature, X and the number of repeats for the steps 2.-4. see Tab. 6)

	Temperatur in °C	Zeit
1.	94	3 min
2.	94	45 sek
3.	X	45 sek
4.	72	105 sek
5.	72	10 min
6.	4	forever

Tabelle 5: PCR-Grundprogramm für die Primer: WPMS20, PGMC14. (X: primerspezifische Annealingtemperatur; für X als auch für die Wiederholungsanzahl von Schritt 2.-4., s. Tab. 6)

Table 5: Basic PCR-program for the primers: WPMS20, PGMC14. (X: primer-specific Annealingtemperature, X and the number of repeats for the steps 2.-4. see Tab. 6)

	Temperatur in °C	Zeit
1.	94	3 min
2.	94	5 sek
3.	X	15 sek
4.	72	1 min
5.	72	10 min
6.	4	forever

Tabelle 6: Zusätzliche PCR-Informationen für die Max-Klone.

Table 6: Additional information on PCR conditions for the Max-Clones.

Primer	µl MgCl <sub>2</sub> pro Ansatz	µl DNA (10ng/µl) pro Ansatz	Annealing-Temperatur in °C	Zykluswiederholungen
WPMS05	1,75	1	50	32
WPMS09	1,75	1	55	26
WPMS14	1,75	3	60	26
WPMS18	1,75	1	55	30
WPMS20	1,5	3	60	30
PGMC14	1,75	3	50	28

Für die Fragestellung bei der Buche wurden insgesamt sieben Primer getestet: MFC5; MFC9-2; MFC11; FS1-3; FS1-11; FS1-15 und FS1-25. Vier davon konnten optimiert werden: MFC5, MFC11, FS1-3, FS1-15 (Tab. 7, 8). Die Gesamtmenge der Reaktionslösung betrug pro Reaktionsgefäß 25 µl. Darin enthalten waren 1,75 bis 2,1 µl

MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (je nach Primer siehe Tab. 7), 0,2 µl BSA (Bovine Serum Albumin, Fermentas), je 2,5 µl Primer (2 µM), 1 µl dNTPs (je 5 mM), 5 µl Reaktionspuffer (5x GoTaq® Flexi Puffer, Promega), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 Units/µl, Promega) und 1-4 µl DNA (10 bzw. 20 ng/µl siehe Tab. 7).

Tabelle 7: Zusätzliche PCR-Informationen für die Buche je nach verwendetem Primer und je nach verwendetem Gewebe (S: Samenschale, K: Blätter aus Knospen)

Table 7: Additional information on PCR conditions for the beech depending on the primer and the used tissue (S: seed coat, K: bud leaves)

Primer	µl MgCl <sub>2</sub> pro Ansatz	µl DNA pro Ansatz		Annealing-Temperatur in °C	Zykluswiederholungen	
		S (20ng/µl)	K (10ng/µl)		S	K
<b>MFC5</b>	1,75	4	1	57	27	27
<b>MFC11</b>	2	4	4	48	37	37
<b>FS1-3</b>	2,1	3	1	56	27	29
<b>FS1-15</b>	1,75	3	1	54	29	27

Tabelle 8: PCR-Grundprogramm für die Primer MFC5; MFC11; FS1-3; FS1-15. (X: primerspezifische Annealingtemperatur, für X als auch für die Wiederholungsanzahl der Schritte 2.-4. siehe Tab. 7)

Table 8: Basic PCR-program for the primers: MFC5; MFC11; FS1-3; FS1-15. (X: primer-specific Annealingtemperature, X and the number of repeats for the steps 2.-4. see Tab. 7)

	Temperatur in °C	Zeit
1.	94	4 min
2.	94	30 sek
3.	X	45 sek
4.	72	30 sek
5.	72	10 min
6.	4	forever

### 2.3 Auswertungsmethoden

Für die Auswertung der Ergebnisse der Mikrosatelliten-Marker bei den Max-Klonen war ein Vergleich der Multilocus Genotypen ausreichend. Es waren keine Auswertungs-

programme erforderlich. Die deutlich größere Menge an Proben der Buche und die größere Komplexität der Fragestellung erforderte eine Reihe von unterschiedlichen Auswertungsmethoden:

#### Populationsgenetische Parameter

Die folgende Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms GenAlEx Version 6.

Für einen Überblick der an den untersuchten Genorten vorhandenen Variation wurden die Allelzahl, die „Privatallelanzahl“ und die Multilocus Genotypenanzahl bestimmt. Als „Privatallele“ werden die Allele bezeichnet, die nur in einem Bestand vorkommen und in den anderen nicht vorhanden sind. Anhand der ermittelten Genotypen konnten dann die Allelfrequenzen wie folgt berechnet werden:

$$p_i = P_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{j=1}^k P_{ij}, \quad \text{wobei}$$

$p_i$  = Allelfrequenz des Allels  $A_i$

$P_{ii}$  = Frequenz des Genotyps  $A_iA_i$

$P_{ij}$  = Frequenz des Genotyps  $A_iA_j$

$k$  = Anzahl Allele des Locus A und  $j \neq i$  (HEDRICK 2000)

Für jeden Locus und Bestand wurde der beobachtete und der erwartete Heterozyotenanteil berechnet. Mit dem  $\chi^2$  ( $X^2$ )-Test auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HW-GG) war es möglich Abweichungen von der Null-Hypothese festzustellen. Diese besagt, dass in der untersuchten Population bei dem untersuchten Locus Zufallspaarungen stattfinden. Die Population befindet sich also im Bezug auf den benachbarten Locus im HW-GG (HEDRICK 2000). Die Voraussetzung dafür ist, dass Ereignisse wie Mutationen, genetische Drift oder Inzucht nicht stattgefunden haben. Selektion kann auf Grund der Neutralität der Marker aus der Betrachtung entfallen. Nach der Ermittlung der Signifikanzwerte kann die Null-Hypothese bestätigt oder verworfen werden. Abweichungen vom Gleichgewicht können u. a. auch auf Genotypisierungsfehler hinweisen.

### Genetische Differenzierung

Um die genetische Ähnlichkeit der untersuchten Altbäume und Samenschalen aus allen fünf Beständen zu analysieren, wurde der Cluster-Algorithmus „Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean“ (UPGMA) nach SOKAL & MICHENER (1958) verwendet. Die grundlegende Idee der Distanzmethoden beruht darauf, die Anzahl gemeinsamer bzw. abweichender Merkmale zu bestimmen, daraus ein Ähnlichkeitsmaß zu berechnen und die Distanzwerte zu einem Baum zu verrechnen. Die Qualität der Merkmale bleibt dabei unberücksichtigt, da die aus den Fragmentunterschieden resultierenden Merkmalsänderungen zu einem einzigen Distanzwert reduziert werden. Die Berechnung erfolgte mit dem PHYLIP-Package Version 3.6 und zwar mit dem „neighbor“-Programm. Basis war hier die genetische Distanz-Matrix nach NEI (1973), berechnet mithilfe des Programms GenAEx Version 6. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm „drawtree“ aus dem PHYLIP-Package und GSview Version 4.7.

Der Fixierungs-Index  $F_{ST}$  nach WRIGHT (1978) oder seine von NEI & LI (1973)

definierte multiallele Entsprechung  $G_{ST}$  sind Maßzahlen für die genetische Differenzierung zwischen den Beständen. Sie wurden auch mit dem Programm GenAEx Version 6 berechnet. Die Indices nutzen als Messgröße das Ausmaß der genetischen Fixierung auf Allele. Eine Einordnung des statistischen Maßes variiert zwischen dem Wert 0 für keine Differenzierung, d. h. die genetische Struktur der Populationen ist identisch, während bei einem Wert von 1 die Populationen keine Allele gemeinsam haben. Die Genpool-Diversität  $v$  als Maß für die Anzahl vorherrschender genetischer Typen wurde zum möglichen Vergleich (IBLEIB & KRABEL 2007) mit Isoenzym-Analysen mit dem Programm GSED (GILLET 1994) berechnet.

### Statistische Verfahren

Auch hier wurden alle Berechnungen, wenn es nicht anders aufgeführt ist, mit dem Programm GenAEx Version 6 durchgeführt.

Zur Berechnung von Varianzkomponenten (genetische Variation zwischen den Beständen und innerhalb der Bestände) wurde die AMOVA („Analysis of Molecular Variance“) nach EXCOFFIER et al. (1992) verwendet. Basis der Berechnung ist die paarweise genetische Distanzmatrix der in den fünf Beständen vorkommenden Multilocus Genotypen. Um die Variabilität der genetischen Distanzen zwischen diesen Genotypen zu visualisieren und somit wesentliche Strukturen innerhalb der Daten sichtbar machen zu können, wurde eine multivariate Technik, eine Hauptkoordinatenanalyse („Principal Coordinates Analysis“, PCoA) durchgeführt.

Zur Prüfung der statistischen Aussagekraft der Markerkombination im Hinblick auf eindeutige Individuenerkennung wurde der  $P_{ID}$ -Wert (Probability of Identity) berechnet. Es handelt sich hier um die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig gezogene Individuen aus einer Population denselben Multilocus Genotyp besitzen.

Was die Fragestellung der möglichen Zuordnung von Testprobensätzen zu den untersuchten Beständen anhand von allelfrequenzbasierten Berechnungen angeht, wurde das Programm GeneClass Version 2.0.h (©INRA/CIRAD 2003) benutzt. Die Berechnung basiert auf der Publikation von PAETKAU et al. (1995). Weiterhin wurde eine Wahrscheinlichkeitsberechnung nach Monte-Carlo mit dem Simulationsalgorithmus nach PEATKAU et al. (2004) mit 1000 simulierten Individuen ausgewählt. Da die Stichprobenanzahl der Altbäume pro Bestand gering ausgefallen ist, wurden die unterschiedlichen Multilocus Genotypen der Eckernschalen als Kollektive von Altbaumgenotypen angesehen. Dies ist möglich, da die Schalen den Geweben von beprobten bzw. nicht beprobten Altbäumen entsprechen. So konnte diese Methode trotzdem auf ihre Verwendbarkeit geprüft werden. Der Gesamtheit der Multilocus-Genotypen aus den jeweiligen Beständen wurde zufällig ein

Fünftel der Proben entnommen und als Testsatz definiert. Die Berechnung der Zuordnungswahrscheinlichkeiten erfolgte individuenweise.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Ist es möglich mithilfe der nuklearen Mikrosatelliten-Marker die Max-Klone auf Sortenechtheit und Sortenreinheit zu überprüfen?

Zunächst wurde festgestellt (Tab. 9), dass die Max-Klone 1 und 4 mithilfe der untersuchten Mikrosatelliten-Loci nicht getrennt werden können, während alle anderen gut zu unterscheiden sind. Diese Aussage konnte auch schon mithilfe der Isoenzymanalyse an der NW-FVA gemacht werden. Es ist also anhand dieser Untersuchungen davon auszugehen, dass es sich bei den Max-Klonen 1 und 4 um ein und denselben Klon handelt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Mikrosatelliten-Untersuchung der Max-Klone an drei Genorten. Allele gleicher Länge sind mit derselben Farbe markiert

Table 9: Results of the microsatellite analysis of Max-Clones at three genloci. Alleles with the same length are marked with the same colour

Standort	Mikrosatelliten Locus	Max1 Allel1-Allel2 (bp)	Max2 Allel1-Allel2 (bp)	Max3 Allel1-Allel2 (bp)	Max4 Allel1-Allel2 (bp)	Max5 Allel1-Allel2 (bp)
Populetum	WPMS09	250-280	250-294	250-294	250-280	250-280
Haferfeld	WPMS09	250-280	250-294	250-294	250-280	250-280
Handtuch	WPMS09	250-280	250-294	250-294	250-280	250-280
Neukirchen	WPMS09	250-280	250-294	250-294	250-280	250-280
Eberswalde	WPMS09	250-280	250-294	250-294	250-280	250-280
Tulln	WPMS09	250-280	250-280	250-294	250-280	250-294
Populetum	WPMS14	260-281	248-260	257-281	260-281	248-260
Haferfeld	WPMS14	260-281	248-260	257-281	260-281	248-260
Handtuch	WPMS14	260-281	248-260	257-281	260-281	248-260
Neukirchen	WPMS14	260-281	248-260	257-281	260-281	248-260
Eberswalde	WPMS14	260-281	248-260	257-281	260-281	248-260
Tulln	WPMS14	260-281	260-281	257-281	260-281	248-260
Populetum	PGMC14	197-212	197-206	197-206	197-212	197-206
Haferfeld	PGMC14	197-212	197-206	197-206	197-212	197-206
Handtuch	PGMC14	197-212	197-206	197-206	197-212	197-206
Neukirchen	PGMC14	197-212	197-206	197-206	197-212	197-206
Eberswalde	PGMC14	197-212	197-206	197-206	197-212	197-206
Tulln	PGMC14	197-212	197-212	197-206	197-212	197-206

Weiter stellte sich heraus, dass für die Prüfung der Sortenechtheit und Sortenreinheit, wie in Tabelle 9 zu sehen ist, nur drei Mikrosatelliten-Loci für die Unterscheidung der Klone ausreichend sind. Es handelt sich hierbei um die Loci WPMS09, WPMS14 und PGMC14. Die anderen drei Loci WPMS05, WPMS18 und WPMS20 tragen zu der Aussage keine weiteren Informationen bei und können demnach ausgeschlossen werden. Es ist zu sehen, dass die untersuchten Bäume der vier unterschiedlichen Standorte den Max-Klonen aus dem Populetum 4 mithilfe der Methode gut zugeordnet werden können. Die zusätzlichen Proben aus Österreich konnten anhand der Basenpaar-Angaben der Allele identifiziert werden (Tab. 9). Max 1, Max 3 und Max 4 aus Tulln stimmen an den untersuchten Loci mit den anderen untersuchten Klonen überein. Sie können also auch als diese identifiziert und bezeichnet werden. Max 2 aus Tulln ist jedoch laut den Ergebnissen als Max1 und Max 5 als Max 2 identifiziert worden. Somit zeigt sich, dass die Überprüfung der Sortenechtheit und Sortenreinheit bei den Max-Klonen schon mittels nur drei Mikrosatelliten-Markern möglich ist.

### **3.2 Ist es möglich mithilfe der nuklearen Mikrosatelliten-Marker Saatgut aus hessischen Buchenbeständen einem dieser Bestände zuzuordnen?**

Die Untersuchungen zeigen eine große Variabilität der fünf Genloci, wobei die Anzahl von 10 unterschiedlichen Allelen am Locus MFC11 bis zu 29 Allelen am Locus FS1-3 reicht (Tab. 10). Tabelle 11 zeigt die Allelanzahlen der vier untersuchten Loci in den jeweiligen Beständen. Die Anzahlen übersteigen die Probenanzahl der Altbäume und weisen somit auf eine zu kleine Stichprobe hin. Auch die Multilocus Genotypen zeigen eine enorme Vielfalt (Tab. 11). Im Bestand Weilburg ergab die Untersuchung 104 Multilocus Genotypen bei 163 Proben (Knospen und Samen zusammen). Daraus wird deutlich, dass für eine genetische

Charakterisierung des Bestandes eine höhere Stichprobenanzahl nötig ist.

Ebenso zeigen die Allelfrequenzen der einzelnen Loci bezogen auf die einzelnen Bestände eine große Variation. Dabei kommen nur wenige Allele mit einer Frequenz von über 0,1 in allen fünf Beständen vor. Am Locus MFC5 konnte nur ein solches Allel (300 bp) der insgesamt 25 Allele identifiziert werden. MFC11 zeigt zwei von 10 solchen Allelen (318 und 324 bp), FS1-3 zwei von 29 (89 und 95 bp) und FS1-15 auch nur einen von 18 Allelen (112 bp). Ansonsten treten nur noch ein (bei MFC5: 302 bp) bis zwei Allele (bei FS1-15: 120 und 122 bp) mit einer Frequenz von über 0,1 in vier der fünf Beständen auf. Die restlichen Allele sind mit einer viel geringeren Frequenz bzw. nur in einzelnen Beständen zu finden. Die Abbildung 2 zeigt beispielhaft für den Locus FS1-15 eine solche Verteilung in der Form eines Diagramms. Es sind Unterschiede in den Frequenzen zwischen den Beständen zu sehen. Außerdem weisen alle Bestände an unterschiedlichen Loci einen bis fünf „Privatallele“ auf (Tab. 10). Die unterschiedlichen Allelfrequenzen zwischen den Beständen und das Vorkommen von „Privatallelen“ als qualitatives Merkmal sind Möglichkeiten zur Unterscheidung der Bestände (VORNAM 2004). Da die „Privatalle“ jedoch eine sehr geringe Frequenz aufweisen, haben sie für die Herkunftskontrolle keine Bedeutung.

Die Werte der Genpool-Diversität  $v$  liegen zwischen 2,8 und 4,0. In die Berechnung gingen die Altbäume und die Samen der Bestände gesondert mit ein.

Die AMOVA-Untersuchung ergab, dass der größte Anteil der Variation mit 98 % durch die Varianz innerhalb der Bestände erklärt wird (Tab. 12). Die Varianz zwischen den Beständen wird also nur durch einen äußerst geringen Anteil an der gesamten Variation erklärt. Ein dazu passendes Ergebnis liefert die Hauptkoordinatenanalyse (Abb. 3). In diese Berechnung gingen alle Multilocus-

Genotypen aus den fünf untersuchten Buchenbeständen mit ein. Jedem Bestand mit seinen Multilocus-Genotypen wurde eine bestimmte Farbe zugeordnet. Die Hauptkoordinate 1 erklärt hierbei 22,54 % und die Hauptkoordinate 2 22,52 % der Variabilität. Die Verteilung im Diagramm

zeigt keine Struktur. Somit besteht kein Zusammenhang bezogen auf die genetische Distanz zwischen den Multilocus-Genotypen bestimmter Bestände. Auch der  $F_{ST}$ -Wert ist mit 0,018 klein und bestätigt eine geringe genetische Differenzierung der Bestände.

Tabelle 10: Beobachtete Allel- und „Privatallelanzahl“ insgesamt in allen fünf untersuchten Buchenbeständen je nach Mikrosatelliten-Locus

Table 10: Observed number of allele and ”privatallel“ overall five studied beech populations depend on the microsatellite genolocus

Mikrosatelliten Genolocus	Allel-anzahl insgesamt	Privatallel-anzahl in Lampertheim	Privatallel-anzahl in Weilburg	Privatallel-anzahl in Romrod	Privatallel-anzahl in Lichtenau	Privatallel-anzahl in Schlüchtern
MFC5	25	-	2	-	-	-
MFC11	10	-	1	-	1	-
FS1-3	29	1	2	5	4	1
FS1-15	18	3	-	-	-	-

Tabelle 11: Beobachtete Allelanzahl und Anzahl der Multilocus-Genotypen in den jeweiligen fünf untersuchten Buchenbeständen

Table 11: Observed number of alleles and multilocus genotypes overall five studied beech populations

Bestand	MFC5	MFC11	FS1-3	FS1-15	Multilocus Genotypen insgesamt
Lampertheim	19	6	13	15	88
Weilburg	25	7	15	14	104
Romrod	21	6	14	10	62
Lichtenau	17	7	14	8	59
Schlüchtern	17	6	14	8	62

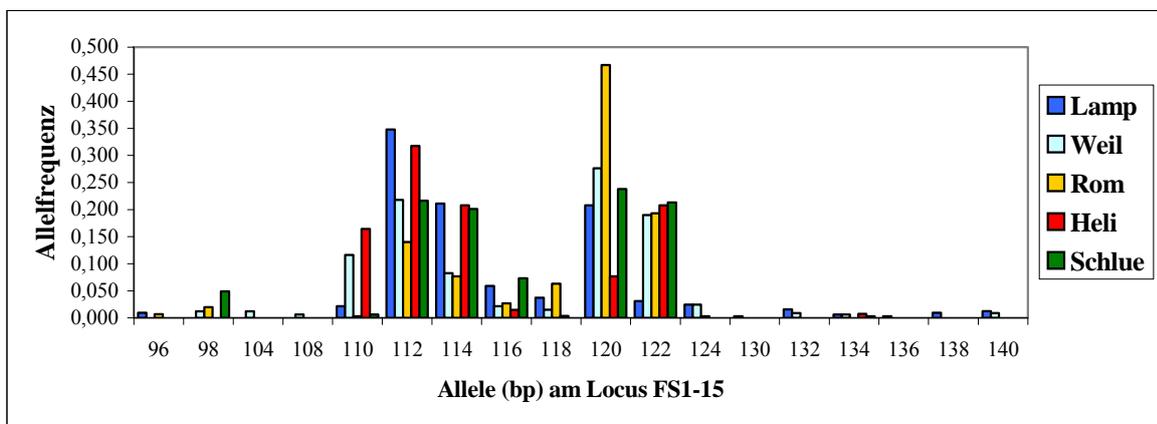


Abb. 2: Allelfrequenzen für den Locus FS1-15 in der Buche (Bestände: Lamp: Lampertheim, Weil: Weilburg, Rom: Romrod, Heli: Hess. Lichtenau, Schlue: Schlüchtern)

Fig. 2: Allel frequencies at the locus FS1-15 in the beech (populations: Lamp: Lampertheim, Weil: Weilburg, Rom: Romrod, Heli: Hess. Lichtenau, Schlue: Schlüchtern)

Tabelle 12: Ergebnisse der AMOVA („Analysis of Molecular Variance“). SSD: Quadrat der Standardabweichung  
 Table 12: Results of the AMOVA („Analysis of Molecular Variance“). SSD: square of the standard deviation

Quelle der Variation	SSD	Varianz-Komponenten	Prozentsatz der Varianz
Zwischen den Beständen	26,852	0,057	2
Innerhalb der Bestände	898,670	2,377	98
insgesamt	925,523	2,435	100

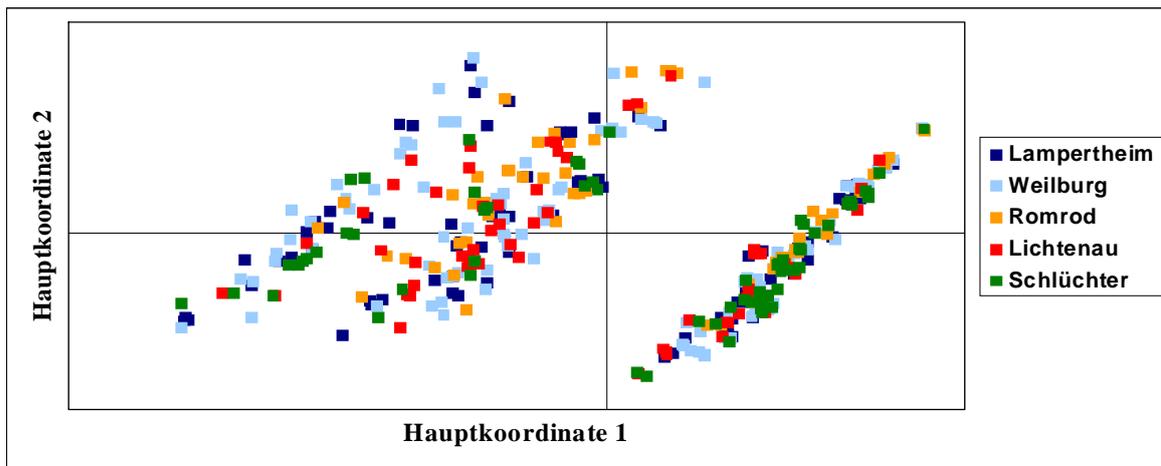


Abb. 3: Hauptkoordinatenanalyse mit den Multilocus-Genotypen aus allen fünf untersuchten Buchenbeständen, die hier mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet sind  
 Fig. 3: The Principal Coordinates Analysis with all multilocus genotypes of the five studied beech populations which are marked with different colours

Aus den  $P_{ID}$ -Werten in Tabelle 13 ist zu erkennen, dass die eindeutige Individualerkennung mit der Anzahl der untersuchten Genloci immer wahrscheinlicher wird. Mithilfe der vier untersuchten Genloci können in 3 bis 10 von 100 000 Fällen zwei Individuen nicht von einander unterschieden werden. Der Vergleich der Multilocus-Genotypen der Altbäume und der Samenschalen aus den Absaaten mit Netzernte ergab, dass insgesamt 63 der 701 Samen dem Baum zugeordnet werden konnten, unter dem sie gesammelt wurden. Das macht einen Prozentsatz von 8,98 % über alle Bestände hinweg. Von Bestand zu Bestand ändern sich jedoch diese Prozentangaben. So konnte im Hess. Lichtenau und in Schlüchtern nicht ein Same dem Altbaum, unter dem

er gesammelt wurde, zugeordnet werden. In Lampertheim waren es 7,53 %, in Weilburg 10,81 % und in Romrod 25,74 %. Diese Prozentsätze stehen in der Annahme, dass die hier eingehende gelbasierte Trennschärfe des verwendeten Sequenzierautomaten fehlerfrei funktioniert. Aus den unterschiedlichen Ergebnissen wird deutlich, dass auf die Verteilung der Samen am Waldboden unterschiedliche Faktoren einen Einfluss ausüben können. So z. B. die Dichte der jeweiligen Bestände, die Wetterbedingungen, denen sie in der Beerntungszeit ausgesetzt waren oder die Fruktifikationsraten der beprobten und benachbarten Bäume. Bucheckern können 25 m (JANSSEN 2000), über 50 m (MÜLLER-STARCK 1996), bis zu 90 m (IBLEIB & KRABEL 2007) weit vom Baum

fallen. Die Bäume in den Beständen weisen durchaus geringere Distanzen als 50 m zueinander auf. So besteht die Möglichkeit, dass bei der Einzelbaumberntung mit Netz Samen benachbarter Bäume ins Netz fallen. Dies konnte auch in Einzelfällen mit den

Mikrosatelliten-Markern bei beprobten Bäumen mit einer geringeren Distanz nachvollzogen werden. Ähnliche Ergebnisse und Erklärungsmöglichkeiten fanden ZIEGENHAGEN et al. (2007). Eine andere Erklärung für diese geringen Prozentsätze der Überein-

Tabelle 13: Wahrscheinlichkeiten ( $P_{ID}$ ) für übereinstimmende Genotypen bei nicht verwandten Individuen pro Bestand und mit zunehmender Locusanzahl

Table 13: The probability  $P_{ID}$  for not related individuals with the same genotype for each population and increasing number of loci

Bestand	FS1-3	FS1-3+MFC11	FS1-3+MFC11+FS1-15	FS1-3+MFC11+FS1-15+MFC5
Lampertheim	0,15	0,033	0,0025	0,000032
Weilburg	0,14	0,029	0,0016	0,000027
Romrod	0,24	0,074	0,0085	0,000118
Hess. Lichtenau	0,11	0,017	0,0014	0,000038
Schlüchtern	0,10	0,028	0,0019	0,000058

Tabelle 14: Test auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HW-GG).  $H_o$ : beobachteter und  $H_e$ : erwarteter Heterozygotenanteil, \*\*\* hoch signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 0,001$ ), \*\* signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 0,01$ )

Table 14: Test for Hardy-Weinberg Equilibrium (HW-GG).  $H_o$ : observed and  $H_e$ : expected heterozygosity, \*\*\* high significant (probability of error  $\leq 0.001$ ), \*\* significant (probability of error  $\leq 0,01$ )

Bestand		FS1-3	mfc11	FS1-15	mfc5
Lampertheim	$H_o$	0,689	0,472	0,714	0,590
	$H_e$	0,650	0,574	0,784	0,916
	$X^2$ -Test auf HW-GG	***	***	***	***
Weilburg	$H_o$	0,650	0,380	0,650	0,767
	$H_e$	0,672	0,579	0,818	0,902
	$X^2$ -Test auf HW-GG	**	***	***	***
Romrod	$H_o$	0,573	0,447	0,467	0,640
	$H_e$	0,526	0,467	0,714	0,913
	$X^2$ -Test auf HW-GG	***	***	***	***
Hess. Lichtenau	$H_o$	0,584	0,635	0,277	0,577
	$H_e$	0,715	0,644	0,780	0,870
	$X^2$ -Test auf HW-GG	***	***	***	***
Schlüchtern	$H_o$	0,866	0,372	0,555	0,689
	$H_e$	0,721	0,509	0,803	0,868
	$X^2$ -Test auf HW-GG	***	***	***	***

stimmungen von Samen und darüber stehenden Altbäumen bieten sogenannte technische Genotypisierungsfehler, die z. B. in Folge von Nullallen entstehen können. Die gefundenen Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 14) sind jedoch nicht groß genug, um als Folge von Genotypisierungsfehlern interpretiert zu werden. Die Null-Hypothese wird bestätigt.

Trotz dieser Ergebnisse zu den „Einzelbaumabsaaten“ waren die Samenschalen aus den jeweiligen Beständen den aus ihrem Bestand stammenden Altbäumen genetisch am ähnlichsten. Dieser Zusammenhang wird im UPGMA-Diagramm deutlich (Abb. 4). Für die Berechnung der genetischen Distanzen nach NEI (1972) wurden die Ergebnisse der Bestände in die Kollektive „Altbäume“ und „Samenschalen“ aufgeteilt, wobei letztere ja ebenfalls Altbaumgenotypen repräsentieren. Die genetischen Unterschiede sind jedoch nicht besonders groß (Tab. 15). Die Ähnlichkeiten der berechneten genetischen Distanzen zwischen Altbäumen und Samenschalen aus einem Bestand sind bei diesem Probensatz darauf zurück zu führen, dass die Multilocus-Genotypen der wenigen Altbäume zu fast 40 % nur in den Samenschalen aus ihrem Bestand zu finden sind. Die restlichen 60 % sind Einzelvorkommen. So ist auch hier nochmals auf die zu geringe Stichprobenanzahl zu verweisen.

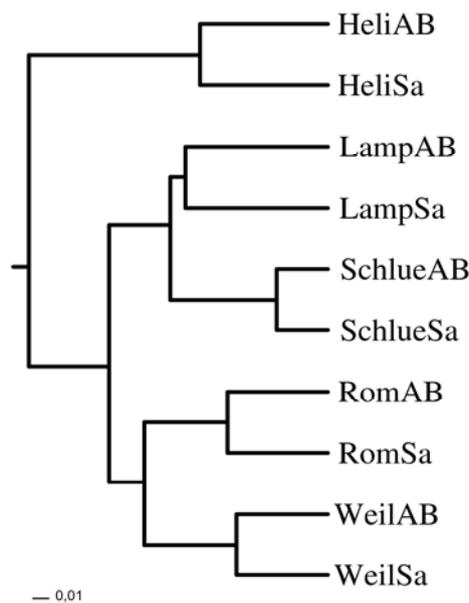


Abb. 4: „Unrooted tree“ der UPGMA-Methode („Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean“) der Multilocus Genotypen der Buche aus den fünf Beständen. (Heli: Hess. Lichtenau, Lamp: Lampertheim, Schlue: Schlüchtern, Rom: Romrod, Weil: Weilburg, AB: Altbäume, Sa: Samenschalen)

Fig. 4: ”Unrooted tree“ with the UPGMA-method (”Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean“) with the multilocus genotypes in the beech of the five populations. (Heli: Hess. Lichtenau, Lamp: Lampertheim, Schlue: Schlüchtern, Rom: Romrod, Weil: Weilburg, AB: trees, Sa: seed coat)

Tabelle 15: Genetische Distanzmatrix nach NEI (1972) für die Buche auf der Basis der vier Mikrosatelliten-Loci: MFC11, MFC9, FS1-3 und FS1-15. (Lamp: Lampertheim, Weil: Weilburg, Rom: Romrod, Heli: Hess. Lichtenau, Schlue: Schlüchtern, AB: Altbäume, Sa: Samenschalen)

Table 15: Genetic distance matrix (NEI 1972) for the beech based on four microsatellite loci: MFC11, MFC9, FS1-3 and FS1-15. (Lamp: Lampertheim, Weil: Weilburg, Rom: Romrod, Heli: Hess. Lichtenau, Schlue: Schlüchtern, AB: trees, Sa: seed coat)

	LampAB	WeilAB	RomAB	HeliAB	SchlueAB
LampAB	0,000	0,122	0,129	0,186	0,095
WeilAB	0,122	0,000	0,106	0,214	0,125
RomAB	0,129	0,106	0,000	0,273	0,171
HeliAB	0,186	0,214	0,273	0,000	0,091
SchlueAB	0,095	0,125	0,171	0,091	0,000
LampSa	0,078	0,129	0,183	0,095	0,066
WeilSa	0,098	0,050	0,147	0,134	0,089
RomSa	0,098	0,067	0,055	0,218	0,098
HeliSa	0,182	0,166	0,259	0,054	0,087
SchlueSa	0,083	0,112	0,164	0,097	0,034

Für die Prüfung der möglichen Zuordnung von zufälligen Testsätzen zu den fünf untersuchten Beständen mithilfe einer frequenzbasierten Methode wurde das GeneClass2 Programm verwendet. Die Individuen, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit dem richtigen Bestand zugeordnet wurden, wurden gezählt und als Prozentzahl in Tabelle 16 dargestellt (HANSEN 2006). Die Testsätze aus Lampertheim, Hess. Lichtenau, Weilburg und Schlüchtern wurden mit Prozentsätzen von 26,32 % bis 56,52 %

ihrem Ursprungsbestand zugeordnet. Lediglich der Testsatz Romrod konnte nicht richtig zugeordnet werden. Diese Ergebnisse fordern Folgeuntersuchungen, die zunächst eine größere Stichprobe der Altbäume und dann weitere Bestände aus Hessen als auch aus den für den illegalen Handel potenziellen Ländern beinhalten. Erst dann kann entschieden werden, inwieweit die frequenzbasierte Methode für die Herkunftskontrolle anwendbar ist.

Tabelle 16: Ergebnisse des Programms GenClass2 mit der frequenzbasierten Methode nach PAETKAU et al. (1995). Dargestellt sind Prozentangaben, der mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zum jeweiligen Bestand zugeordneten Individuen aus den Testsätzen. Wahrscheinlichkeit mit < 0,1 % wurden nicht mit aufgenommen.

Table 16: Results of the program GenClass2 with the frequency based method according to PAETKAU et al. (1995). Overall percentage of correctly assigned individuals are given. Percentages < 0,1 % were not included.

Testsatz aus dem Bestand	Referenz Lampertheim	Referenz Hess. Lichtenau	Referenz Weilburg	Referenz Romrod	Referenz Schlüchtern
Lampertheim	<b>56,52 %</b>	8,70 %	8,70 %	-	17,39 %
Hess. Lichtenau	14,81 %	<b>48,15 %</b>	11,11 %	-	14,81 %
Weilburg	10,53 %	10,53 %	<b>26,32 %</b>	15,79 %	21,05 %
Romrod	11,11 %	11,11 %	-	22,22 %	27,78 %
Schlüchtern	19,05 %	4,76 %	14,29 %	-	<b>47,62 %</b>

### Schlussfolgerung: Abstammungsanalyse der Buche

Der Vergleich der Untersuchungen der Buche mithilfe der genetischen Marker, Allozyme und nukleare Mikrosatelliten-Marker, zeigt zunächst keine großen Unterschiede, was die Differenzierung von nahe beieinander liegenden Beständen angeht. So finden sich auch in der Literatur bei der Isoenzym-Analyse vergleichbare Ergebnisse (DEGEN 2005; GEBHARDT 2004; VORNAM 2004; WANG 2002; SANDER et al. 2001), d. h. geringe genetische Variation zwischen nahe beieinander liegenden Beständen und große genetische Variation innerhalb der Bestände. Diese sichert den ortsfesten und langlebigen Arten die genetische Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen (SEITZ et al. 2007). Auch die Analyse der uniparental vererbten Chloroplasten-DNA lässt bei der Buche eine vergleichsweise kleinräumige Zuordnung zu Herkunftsgebieten nicht zu (VORNAM 2004). GAILING & WUEHLISCH (2004) fanden in ganz Deutschland nur einen bzw. DEMESURE et al. (1996) einen und MAGRI et al. (2006) drei Chloroplasten-Haplotypen in ganz Nord-, Ost- und Zentraleuropa. Die Analyse der Organellen-DNA ist gerade für nacheiszeitliche Rückwanderungsprozesse auf einer großen Raumskala eine geeignete Methode. In Tabelle 17 findet sich eine Auflistung einiger Untersuchungen der Buche mithilfe dieser unterschiedlichen Methoden. Die Ergebnisse der beiden Kategorien von Maßen ( $F_{ST}$  und  $G_{ST}$ ) können sehr unterschiedlich sein insbesondere bei Genmarkern mit einer hohen genetischen Variation. Sie sind daher nicht immer direkt vergleichbar. Außerdem hängt die Höhe der Fixierungsindices stark von der jeweiligen Untersuchungsmethode ab (biparentale bzw. uniparentale Vererbung der Marker) (SEITZ et al. 2007; DEGEN 2005). Die Werte können also nur innerhalb einer Methode in Beziehung gesetzt werden. Es stellte sich heraus, dass die Mikrosatelliten-Marker durch den eins zu eins Vergleich der Samenschalen mit den

Altbäumen als auch die unterschiedlichen Allelfrequenzen der Bestände, die erfolgversprechendste der vorgestellten Methoden ist. Hier besteht jedoch noch Optimierungsbedarf. Da mit jedem weiteren polymorphen Genlocus neue Informationen hinzu kommen, kann mit einer höheren Anzahl an Mikrosatelliten bei den Untersuchungen eine Erniedrigung des  $P_{ID}$  bei der eins-zu-eins-Methode erreicht werden. Eine genetische Inventarisierung aller Altbäume der Bestände und damit eine 100 % eins zu eins Zuordnung der Samen wird aus finanziellen Gründen jedoch nicht möglich sein. Somit bleibt die frequenzbasierende Zuordnung. Möglicherweise könnten weitere polymorphe Genmarker (z. B. ESTs, SNPs) für die frequenzbasierte Untersuchung von Nutzen sein und somit bessere Differenzierungseigenschaften zwischen Beständen aufweisen. Im Weiteren stellt sich die Frage, ob in Zukunft mit der Mikrosatelliten-Methode auf die Referenzproben verzichtet werden kann. Dies ist eindeutig mit einem „nein“ zu beantworten. Auch mit dieser Methode wird die Herkunftskontrolle nicht ohne Referenzproben auskommen können. Die Referenz-Probennahme muss jedoch nicht jährlich erfolgen. Es bleibt aber nicht aus, die Inventarisierung der Genotypen der Bestände in gewisser Zeit, wie alle 10 Jahre, zu wiederholen. Ein Grund dafür ist z. B. der möglicherweise von Ernte- zu Ernteperiode wechselnde Pollenflug aus der unmittelbaren Umgebung des Bestandes, durch den die Allelfrequenzen im Bestand selbst beeinflusst werden können (Pollenflug Buche > 500 m nach MÜLLER-STARCK 1996). Dabei ist die Anzahl der Referenzproben pro Bestand nach dieser Untersuchung noch nicht eindeutig.

Tabelle 17: Genetische Differenzierung von Populationen bzw. Beständen der Buche gemessen als Ausmaß der Fixierung ( $G_{ST}$ ,  $F_{ST}$ ) mithilfe unterschiedlicher Untersuchungsmethoden

Table 17: Genetic differentiation of beech populations measured as fixation ( $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$ ) with different methods

Untersuchungsmethode	Populationen bzw. Bestände	Gebiet	Anzahl der Genorte	$G_{ST}$ bzw. $F_{ST}$	Literatur
Isoenzym-Analyse	279	West-Europa	12	$F_{ST} = 0,032$	GÖMÖRY et al. 2007
	389	Europa	12	$F_{ST} = 0,059$	COMPS et al. 2001
Chloroplasten PCR-RFLP	23	Europa		$G_{ST} = 0,74$	PETIT et al. 2003
	352	Europa	4	$G_{ST} = 0,78$	MAGRI et al. 2006
Chloroplasten-Mikrosatelliten	468	Europa	3	$G_{ST} = 0,81$	MAGRI et al. 2006
	67	Italien	2	$G_{ST} = 0,855$	VETTORI et al. 2004
Kern-Mikrosatelliten	10	Europa	4	$F_{ST} = 0,058$	BUITEVELD et al. 2007

## Danksagung

Der Dank geht zunächst an WOLFGANG HÜLLER für das Sammeln und Bereitstellen der Bucheckern. Dann folgt ein großes Dankeschön nach Marburg zur CHRISTINA MENGEL und GEORG RATHMACHER für die ersten Hilfestellungen im Umgang mit der Buche und hilfreiche PCR-Programme für die Pappeln. Und als letztes auch ein Dankeschön an ULRIKE SEIFERT für die Unterstützung bei der Laborarbeit in Hann. Münden.

## Literatur

- BUITEVELD, J.; VENDRAMIN, G.G.; LEONARDI, S.; KAMER, K.; GEBUREK, T. (2007): Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history. *Forest Ecology and Management* 247: 98-106
- COMPS, B.; GÖMÖRY, D.; LETOUZEY, J.; THIEBAUT, B.; PETIT, R. J. (2001): Diverging Trends Between Heterozygosity and allelic Richness During Postglacial Colonization in the European Beech. *Genetics* 157 (1): 389-397
- DEGEN, B. (2005): Etablierte Methoden zur genetischen Differenzierung von forstlichen Genressourcen als Voraussetzung der Generhaltung im Forst. *Schriften zu Genetischen Ressourcen* 24: 15-26
- DEMESURE, B.; COMPS, B.; PETIT, R.J. (1996): Chloroplast DNA phylogeography of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520
- DUMOLIN, S.; DEMESURE, B.; PETIT, R.J. (1995): Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. (1992): Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
- GAILING, O.; VON WUEHLISCH, G. (2004): Nuclear Markers (AFLPs) and Chloroplast Microsatellites Differ Between *Fagus sylvatica* and *F. orientalis*. *Silvae Genetica* 53: 105-110
- GEBHARDT, K. (2004): Genetische Diversität der Buche (*Fagus sylvatica* L.) im hessischen Staatswald. Mitteilungen aus der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz 52/04: 189-196
- GILLET, E. (1994): GSED – Genetic structure from electrophoresis data. User's Manual Version 1.0. Univ. Göttingen: 49 pp.
- GÖMÖRY, D.; PAULE, L.; VYSNY, J. (2007): Patterns of allozym variation in western Eurasien *Fagus*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 165-174
- HANSEN, O. K. (2006): Interating molecular genetic methods in seed source management and breeding activities of Nordmann fir. Danish Center for Forest, Landscape and Planning, KVL, Horsholm Kongevej 11: 2970
- HEDRICK, P.W. (2000): *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett, Sudbury, MA: 553 pp.
- IBLEIB, D.; KRABEL, D. (2007): Genetische Strukturen der Naturverjüngung in Buchenwäldern (*Fagus sylvatica* L.). *Forst und Holz* 62, (1): 15-18
- JANSSEN, A. (2000): Untersuchung zur genetischen Variation der Buche in Hessen: Der Einfluss von Ernteverfahren auf die genetische Struktur von Saatgut eines Buchenbestandes. Hessische Landesanstalt für Forsteinrichtung, Waldforschung und Waldökologie, Forschungsbericht, Band 27
- MAGRI, D.; VENDRAMIN, G.G.; COMPS, B.; DUPANLOUP, I.; GEBUREK, T.; GÖMÖRY, D.; LATALOWA, M.; LITT, T.; PAULE, L.; ROURE, J.M.; TANTAU, I.; VAN DER KNAAP, W.O.; PETIT, R.J.; BEAULIEU, J.-L. (2006): A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221
- MÜLLER-STARCK, R. (1996): Genetische Aspekte der Reproduktion der Buche (*Fagus sylvatica*) unter Berücksichtigung waldbaulicher Gegebenheiten. *Berichte des Forschungszentrums Waldökosysteme, Reihe A, Bd. 135*
- NEI, M. (1972): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321-3323
- Nei, M.; Li, W-H. (1973) Linkage disequilibrium in subdivided populations. *Genetics* 75: 213-219
- PASTORELLI, R.; SMULDERS, M.J.M.; VAN'T WESTENDE, W.P.C.; VOSMAN, B.; GIANNINI, R.; VETTORI, C.; VENDRAMIN G.G. (2003): Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Notes* 3: 76-78
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. (1995): Microsatellite analysis of population struktur in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354
- PAETKAU, D.; SLADE, R.; BURDEN, M.; ESTOUP, A. (2004): Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13: 55-65
- PETIT, R.J.; AGUINAGALDE, I.; BEAULIEU, J.-L.; BITTKAU, C.; BREWER, S.; CHEDDADI, R.; ENNOS, R.; FINESCHI, S.; GRIVET, D.; LASCoux, M.; MOHANTY, A.; MÜLLER-STRACK, G.; DEMESURE-MUSCH, B.; PALME, A.; MARTIN, J.P.; RENDELL, S.; VENDRAMIN, G.G. (2003): Glacial Refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565

- SMULDERS, M.J.M.; VAN DER SCHOOT, J.; ARENS, P.; VOSMAN, B. (2001): Trinukleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes* 1: 188-190
- SANDER, T, ROTHE, G. M., WEISGERBER, H. & JANSSEN, A. (2001): Allelic and genotypic variation of 13 European beech (*Fagus sylvatica* L.) –populations in Hesse, Germany. *Forest Genetics*, 8, 13-24
- SEITZ, B.; JÜRGENS, A.; KOWARIK, I. (2007): Erhaltung genetischer Vielfalt: Kriterien für die Zertifizierung regionalen Saat- und Pflanzenguts, BfN-Skripten 208, 48 S.
- SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. (1958): Statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas science bulletin* 38: 1409-1438
- SPERBER, G.; HATZFELDT, H.G. (2007): Hat die Buche eine forstliche Perspektive in Deutschland. *Natur und Landschaft* (9/10): 436-437
- TANAKA, K.; TSUMURA, Y.; NAKAMURA, T. (1999): Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. japonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 11-15
- VAN DER SCHOOT, J.; POSPIŠKOVÁ, M.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M.J.M. (2000): Development and characterization of mikrosatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 317-322
- VETTORI, C.; VENDRAMIN, G.G.; ANZIDEI, M.; PASTORELLI, R.; PAFFETTI, D.; GIANNINI, R. (2004): Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theor Appl genet* 109: 1-9
- VORNAM, B. (2004): Identifizierung von Buchenherkünften (*Fagus sylvatica* L.) mittels DNA-Markern. Forstwissenschaftliche Fakultät der Universität Freiburg und Forstliche Versuchs- und Forschungsanstalt Baden Württemberg, Heft 54, 93-98
- WANG, K.-S. (2002): Genetic diversity and Temporal Genetic Structure in European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica* 52: 100-106
- WEISGERBER, H. (1983): Wuchsverhalten und Anbaumöglichkeiten einiger neu zum Handel zugelassener Balsampappeln und Aspen. *Die Holzzucht* 37 (1/2): 2-10
- WRIGHT, S. (1978): Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Univ. of Chicago Press, Chicago
- ZIEGENHAGEN, B.; LIEPELT, S.; KUHLENKAMP, V.; FLADUNG, M. (2003): Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissues of their fruits or seeds. *Trees* 17: 345-350
- ZIEGENHAGEN, B.; MENGEL, C.; SCHMITT, H.-P.; LIEPELT, S. (2007). Seed dispersal distances in beech (*Fagus sylvatica* L.) made visible by DNA fingerprints of the beechnut shell. Abstract Band of the 36<sup>th</sup> Annual Conference of the Ecological Society of Germany, Switzerland and Austria, Marburg 11-15 October 2007.

**Anschrift der Autoren:**

HANNA WYPUKOL; Dr. KARL GEBHARDT  
 Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung Waldgenressourcen  
 Prof.-Oelkers-Str. 6, 34346 Hann. Münden, Deutschland

Dr. SASCHA LIEPELT; Prof. Dr. BIRGIT ZIEGENHAGEN  
 Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Naturschutzbiologie  
 Karl-von-Frisch-Str. 8, 35032 Marburg, Deutschland