

Tagungsband

Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden

ISBN 978-3-00-024808-5



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

PTJ
Projektträger Jülich
Forschungszentrum Jülich

 **HELMHOLTZ
ZENTRUM FÜR
UMWELTFORSCHUNG
UFZ**

“Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden“.

Tagungsband des Symposiums „Herkunftskontrolle“ vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587

Herausgeber:
Dr. Karl Gebhardt
(Koordinator des BMBF-Verbundprojektes Herkunftskontrolle)

Dr. Mirko Liesebach
(Redaktion)

Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
Abteilung C: Waldgenressourcen
Prof.-Oelkers-Str. 6
34346 Hann. Münden
Deutschland

(<http://www.nw-fva.de/Herkunftskontrolle/>)

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0330587 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Alle Rechte vorbehalten.
Nachdruck, auch auszugsweise, sowie fototechnische Wiedergabe nur mit Genehmigung des Herausgebers

Umschlaggestaltung:
Julia Gabler
Metronom | Agentur für Kommunikation und Design GmbH
Sigismundstraße 6
04317 Leipzig

August, 2008

ISBN 978-3-00-024808-5

Verbundpartner

Bayerisches Amt für forstliche Saat- u. Pflanzenzucht
Forstamtsplatz 1
83317 Teisendorf



Agroisolab GmbH
Karl-Heinz-Beckurts-Str. 13
52428 Jülich



Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
Abt. Waldgenressourcen
Prof.-Oelkers-Str. 6
34346 Hann. Münden



Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	4
Vorwort	5
Bedeutung der Herkunftswahl bei forstlichem Vermehrungsgut <i>Alwin Janßen</i>	7
Die natürliche Variation und die Messung der stabilen Isotope als Kontrollmethode <i>Hilmar Förstel</i>	16
Umwelt- und pflanzenbedingte Variation von Stabilisotopen <i>Wilfried Steiner, Bernhard Hosius</i>	37
Unterscheidung von Saatgutpartien der Buche und Roterle anhand der Stabilisotopen-Signaturen (¹³ C/ ¹⁵ N) und Elementgehalte von Kohlenstoff und Stickstoff <i>Karl Gebhardt</i>	51
Genetische Methoden zur Abstammungsanalyse und Prüfung von Sortenechtheit und -reinheit <i>Hanna Wypukol, Sascha Liepelt, Birgit Ziegenhagen, Karl Gebhardt</i>	67
Umsetzung und Verbesserung des ZüF-Verfahrens mit Hilfe genetischer Analysen und der Stabilisotopen-Methode am Beispiel von Bergahorn, Fichte und Weißtanne <i>Monika Konnert, Eva Cremer, Hilmar Förstel</i>	85
Nachweis der Herkunft von Saatgutpartien des Bergahorns, der Fichte und der Weißtanne mit Hilfe stabiler Isotopen <i>Karl Gebhardt, Monika Konnert, Hilmar Förstel</i>	101
GPS-gestützte Dokumentation der Saatguternten bei Waldbäumen: Erfahrungen und Perspektiven <i>Wolfgang Hüller, Karl Gebhardt</i>	111
Situation der amtlichen Herkunftskontrolle (in Bayern) <i>Anton Paulus</i>	118
Herkunftskontrolle im Rahmen von PEFC <i>Dirk Teegelbeekers</i>	125
Zur Kontrolle und Zertifizierung von forstlichem Vermehrungsgut unter Nutzung von Labormethoden <i>Monika Konnert, Bernhard Hosius</i>	132
Perspektiven einer verbesserten Herkunftskontrolle: Schlussfolgerungen aus der Forschungsarbeit <i>Karl Gebhardt</i>	140

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
Abt. (comp.)	Abteilung (engl. compartment)
ALF / ÄLF	Amt / Ämter für Landwirtschaft und Forsten
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
ASP	Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht, Teisendorf
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Bonn
DFZR	Deutscher Forst-Zertifizierungsrat
DKV	Gütegemeinschaft für forstliches Vermehrungsgut e. V. (bis Feb. 2005: Deutsche Kontrollvereinigung für forstliches Saat- und Pflanzgut e. V.)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy-ribonucleic acid)
EST	Expressed Sequence Tag
EZR	Erntezulassungsregister
FfV	Forum für forstliches Vermehrungsgut e. V.
FoVG	Forstvermehrungsgutgesetz
GISP	Greenland ICE Sheet Precipitation
GPS	Global Positioning System
IAEA	Internationale Atomenergiebehörde, Wien
IRMS	isotope ratio mass spectroscopy (Isotopenverhältnis-Massenspektrometer)
NIST	National Institute of Standards and Techniques, Gaithersburg / USA
NRW	Nordrhein-Westfalen
NW-FVA	Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	PeeDee Belemnite - Internationaler Standard für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
PEF	Polyethylenfolie
PEFC	Programme for the Endorsement of Forest Certification Schemes
PEFCC	Pan European Forest Certification Council
P _{ID}	Probability of Identity
PRM	Primary Reference Material (= Primärstandard)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SMOW	Standard Mean Ocean Water - Inter. Standard für $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPL	Samenplantage
SSR	Simple Sequence Repeats (Mikrosatelliten)
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
TKG	Tausendkorngewicht / -masse
ZüF	Zertifizierungsring für überprüfbare Forstliche Herkunft Süddeutschland e. V.

Vorwort von Dr. Karl Gebhardt



**Werte Teilnehmer
(innen) des
Symposiums
„Herkunfts-
kontrolle“ vom 7.-8.2.
2008 in Kassel,
geschätzte Lese-
rinnen und Leser
dieses Tagungs-
bandes**

„Zukunft braucht Herkunft“ - unter dieses Motto stellte Bundespräsident Köhler am 13.4.2008 die Öffnung des Domschatzes in Halberstadt. Eine Feststellung, die nicht nur für die bundesdeutsche Gesellschaft gilt, sondern auch für die Waldgesellschaft, mit der sich das BMBF-Verbundprojekt „Herkunftskontrolle“ beschäftigt hat.

Der Wald und der Rohstoff Holz sind in Deutschland Sinnbild für Natürlichkeit, Lebensqualität und Beständigkeit. Die Leistungen des Waldes für die Umwelt und für die Gesellschaft sind vielfältig und von erheblichem Wert. Leistungs- und Anpassungsfähigkeit von Waldbäumen werden entscheidend durch genetische Strukturen geprägt, die sich über sehr lange Zeiträume hin in unterschiedlichen Populationen entwickelt haben. Sie sind damit Grundlage einer nachhaltigen, stabilen Entwicklung von Wäldern. Forstliches Vermehrungsgut muss zum einen an die Bedingungen des Standortes, für das es verwendet wird angepasst sein, zum anderen muss es eine ausreichende genetische Vielfalt aufweisen, damit die daraus hervorgehenden Waldbestände ihre Anpassungsfähigkeit an Klimaänderungen bewahren.

Im Wissen um den Wert unterschiedlicher genetischer Strukturen wurden von allen Staaten der EU verbindliche forstsaatgutrechtliche Regelungen getroffen (siehe

Richtlinie des Rates 1999/105/EG), die von allen mit Erzeugung und Vertrieb von forstlichem Vermehrungsgut befassten Akteuren einschließlich den Waldbesitzern zu beachten sind. In Deutschland gelten seit 1.1.2003 die Bestimmungen des Forstvermehrungsgutgesetzes und die Forstsaat-Herkunftsgebietsverordnung.

Erhebliche Erschwernisse der Herkunftskontrolle ergeben sich durch:

- zunehmenden Saatgut- und Pflanzenhandel über Landesgrenzen hinweg
- hohen Zeit- und Kostenaufwand der amtlichen Kontrolle
- immer weniger Personal in den Behörden und bei den Forstbetrieben

Nachlassende oder ungenügende Kontrolle begünstigt die Verwendung nichtangepasster Herkünfte, führt zu Schäden der Waldentwicklung, Gewinneinbußen der Forstbetriebe, hohen Folgekosten für Ersatzaufforstungen und Vermeidung oder Reparatur von Umweltschäden. Für gesetzestreue Erzeuger von forstlichem Vermehrungsgut, die sich wie die Mitglieder der DKV- Gütegemeinschaft für forstliches Saat- und Pflanzgut e.V. oder des Erzeugerringes „Süddeutschland“ einer selbstauferlegten Qualitätskontrolle (Zertifizierung überprüfbarer Herkünfte) unterwerfen, ergeben sich bei mangelnder Herkunftskontrolle Wettbewerbsnachteile. In Zeiten hohen Pflanzenbedarfes, wie nach den Stürmen Lothar, Wiebke, Kyrill und Emma beschäftigt dies Baumschulen, Waldbesitzer und andere Verwender von forstlichem Vermehrungsgut stärker denn je.

Zertifizierung und Herkunftskontrolle sind nur so gut wie die Methoden, die dabei zur Anwendung kommen. Deshalb war es erklärtes Ziel des BMBF-Verbundprojektes

„Herkunftskontrolle“, FKZ 0330587, neben den genetischen Methoden auch die Stabilisotopen-Methodik zu erproben.

Ein erster Dank gilt deshalb denen, die sich durch ihre Unterstützung und ihren Zuspruch schon in der Planungsphase des Projektes als Geburtshelfer betätigt haben. Dazu zählen wir Herrn MR Michael Buhlmann vom Hess. Ministerium für Umwelt, ländlichen Raum und Verbraucherschutz, Herrn Forstdirektor Rolf Schulzke und Herrn Forstamtsrat Eitel Klein vom RP Kassel sowie Herrn Abtlg. Dir. Detlev Stys als stellvertr. Landesbetriebsleiter von Hessen-Forst.

Stellvertretend für die positive Begutachtung des Antrages danken wir Herrn Prof. Dr. Bo Larsen (Univ. Kopenhagen). Frau Dr. Renate Loskill, Ref. 724 des BMBF danken wir für den Zulassungsbescheid und das spürbare Interesse am Projektfortschritt.

Mit dem Kickoff-Meeting am 17.8.2005 begann die eigentliche Projektarbeit und die Betreuung durch den Projektträger Jülich. Frau Heike Neumann und Frau S. Kintscher danken wir für die angenehme Zusammenarbeit während der Projektphase in der es nicht weniger als sieben interne Treffen der Verbundpartner auszurichten galt.

Mit der Auftaktveranstaltung des Förderschwerpunktes „Nachhaltige Waldwirtschaft“ am 6.7.2005 in Berlin wurden wir mit dem Leiter der Wissenschaftlichen Begleitung Herrn Prof. Dr. Fritz und seinem Team bekannt gemacht. Ihm danken wir besonders für die Ausrichtung der Workshops und Seminare des Förderschwerpunktes am Helmholtz-Zentrum für Umwelt-

forschung GmbH (UFZ) in Leipzig. Die Beteiligung der Firma Agroisolab bei der „Woche der Umwelt“ des Bundespräsidenten verdanken wir seiner Initiative. Nicht zuletzt stand Herr Prof. Dr. Fritz uns als Moderator des Abschluss Symposiums vom 7. bis 8.2.2008 in Kassel zur Verfügung.

Herr Joachim Pein, der Vorsitzende der DKV-Gütegemeinschaft für forstliches Vermehrungsgut e. V. übernahm dankenswerter Weise bei dieser Veranstaltung die Leitung der lebhaften Diskussion (siehe AFZ-Der Wald 2008, S. 476-478) mit über siebenzig Vertretern der Praxis und Wissenschaft.

In den vergangenen Monaten konnte die Projektarbeit bei mehreren wissenschaftlichen Veranstaltungen vorgestellt werden. Erste Ergebnisse sind auf nationalen Veranstaltungen, in der deutschsprachigen Fachpresse und in der Zeitschrift „Austrian Journal of Forest Science“ für ein internationales Publikum publiziert.

Die Methodik und die Untersuchungsergebnisse werden detailliert auf den folgenden Seiten vorgestellt; daneben wird auch die aktuelle Situation der amtlichen Kontrolle und der privaten Zertifizierung immer wieder thematisiert damit die vorgestellten neuen Methoden Eingang in die Praxis der Herkunftskontrolle und Zertifizierung finden können.

Allen Akteuren, den helfenden und fördernden Personen und Institutionen, nicht zuletzt der Leitung der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt ein herzliches Dankeschön für ihre Unterstützung !

Bedeutung der Herkunftswahl bei forstlichem Vermehrungsgut

Alwin Janßen

Zusammenfassung

Bei Pflanzungen und Saaten werden durch die Wahl einer geeigneten Herkunft die Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen und das Produktionspotential der Waldbäume festgelegt. Während der nächsten 50 bis 200 Jahre bis zur Bestandsernte kann mit waldbaulichen Maßnahmen nur noch korrigierend eingegriffen werden. Deshalb kommt der Herkunftswahl eine entscheidende Bedeutung zur Erreichung der Bestandesziele zu.

Nach einem kurzen geschichtlichen Abriss der Herkunftsforschung wird die Vererbung von Merkmalen anhand von Beispielen gezeigt. Die ökonomische Bedeutung der Herkunftswahl wird hervorgehoben. Aufgrund der prognostizierten Klimaänderungen wird ein erheblicher Anteil der in Deutschland auf etwa 11 Millionen ha stockenden Bestände als nicht oder nicht mehr standortgerecht bzw. risikobehaftet eingestuft werden. Ein Baumartenwechsel und damit die Wahl einer geeigneten Herkunft sind somit auch aus ökologischen Gründen zwingend erforderlich. Dafür muss die Zahl der für die Erzeugung von qualifiziertem und geprüftem Vermehrungsgut zugelassenen Ernteeinheiten deutlich erhöht werden.

Schlagwörter: forstliches Vermehrungsgut, Herkunft, Adaption, Forstwirtschaft

Importance of origin of forest reproductive material

Abstract

Adaptability and potential capacity of sown and planted stands are given as a result of choice of a suitable provenance. During the course of the next 50 to 200 years until the harvest of stands takes place the silvicultural practise will allow only corrective actions. Therefore, the choice of provenance is important to fulfil the goals of stand management.

After a short historical outline of provenance research the heredity of traits is described on the basis of examples. The economic importance of choice of provenance is highlighted. Because of the projected climate change, a significant part of about 11 million hectares woodland including managed forest stands in Germany will be no longer sufficiently adopted but becomes a matter of risk. A change of tree species and the new choice of a suitable provenance will be necessary for environmental reasons. This requires a substantially increased number of approved harvest units for the production of qualified and tested forest reproductive material.

Key words: forest reproductive material, provenance, adaptation, forest management

Einleitung

Schon seit Jahrtausenden wird der Wald vom Menschen genutzt. Zunächst geschah diese Nutzung völlig unregelmäßig. Erst mit Einführung der Nieder- und Mittelwaldwirtschaft ab dem frühen Mittelalter konnten die Erträge aus dem Wald in jährlich ähnlicher Größenordnung gehalten werden. Bei diesen Bewirtschaftungsformen nutzte man zum ersten Mal gezielt auch eine künstliche Verjüngungsform, nämlich die vegetative Vermehrung über Stockausschläge (HAMBERGER 2003).

Bedingt durch den rasanten Bevölkerungsanstieg wurde im Mittelalter der Wald um die Städte dermaßen übernutzt, dass natürliche Verjüngung nicht mehr ausreichte und zur Walderhaltung Saaten eingesetzt werden mussten. Ab Mitte des 14. Jahrhunderts wurden ausgedehnte Saaten, wie beispielsweise im Nürnberger Reichswald oder im Frankfurter Stadtwald, ausgeführt. Zum ersten Mal wurde das für die Saaten verwendete Forstsaatgut gezielt über weite Entfernungen verfrachtet.

Leider zeitigten diese Maßnahmen aufgrund fehlender oder nicht ausreichender Regelungen der Holznutzungen, verstärkt noch durch Waldweide und Streunutzungen, insgesamt keine großen Auswirkungen, so dass der Wald immer mehr verwüstet wurde.

Geschichte der Herkunftsforschung

Seit Mitte des 18. Jahrhunderts musste der vielerorts devastierte Wald in immer größerem Ausmaß künstlich verjüngt werden. Neben der falschen Baumartenwahl führte die Wahl ungeeigneter Herkünfte sehr oft zu unbefriedigenden Ergebnissen. Ein bekanntes Beispiel sind die so genannten „Darmstädter Kiefern“, in der Rhein-Main-Ebene mit ursprünglich aus Frankreich stammendem Saatgut angelegte Kiefernbestände, die

einen hohen Anteil an starkästigen, krummen und drehwüchsigen Bäumen hatten.

Leider werden aber auch heute noch jüngere Bestände mit einer ungeeigneten Herkunft begründet, die die in sie gesetzten wirtschaftlichen Erwartungen nicht erfüllen können. So ist in Abbildung 1 eine etwa zehnjährige Kirschenpflanzung im damaligen Hessischen Forstamt Hofheim zu sehen, die viele Verzweigungen und unerwünschte Stammformen aufweist. Das Ziel der Erzeugung wertvollen Holzes kann hier nicht oder nur mit sehr großem waldbautechnischem Aufwand erreicht werden.

Aufgrund des Bedarfs an gutem Kiefernholz begann DU MONCEAU bereits 1745 mit der Anbauprüfung verschiedener Kiefernherkünfte. Er erkannte als Erster, dass der Anteil von Bäumen mit erwünschten phänotypischen Merkmalen bzw. mit bestimmten qualitativen und quantitativen Eigenschaften herkunftsabhängig ist. Es dauerte allerdings noch weitere 150 Jahre bis zu Beginn des 20. Jahrhunderts, bis die Herkunftswahl als eine entscheidende Größe bei der künstlichen Anlage von Beständen anerkannt worden ist. So legten ab Beginn des 20. Jahrhunderts unter anderem CIESLAR, ENGLER und SCHOTT systematisch Provenienzversuche an. Näheres zur Geschichte der forstlichen Herkunftsforschung ist bei LANGLET (1971) und KLEINSCHMIT (1974) nachzulesen.

Erst nach dem Ende des Zweiten Weltkriegs sind in Deutschland forstliche Züchtungsinstitutionen gegründet worden. Auf den Ergebnissen dieser Institute gründen sich die folgenden Beispiele zur Bedeutung der Herkunftswahl.



Abb. 1: Habitus einer etwa zehnjährigen Kirschenpflanzung im ehemaligen Hessischen Forstamt Hofheim

Fig. 1: Habit of a stand of planted cherries, age 10, located at the former Hessian forest district Hofheim

Vererbung von Merkmalen

Die äußere Erscheinung eines Baumes, sein Phänotyp, ist vereinfachend ausgedrückt das Ergebnis aus seiner genetischen Veranlagung und aus den herrschenden Umweltbedingungen. Während einzelne Merkmale einer starken Vererbung unterliegen, wie beispielsweise der Austriebszeitpunkt, sind Höhen- und Durchmesserwuchsleistung sehr stark von den Umweltbedingungen geprägt. Andere qualitative Merkmale wie Geradschaftigkeit oder Drehwuchs werden etwa gleichermaßen durch Vererbung und Umwelt beeinflusst. In Abbildung 2 sind einige Vererbungsgrade von Merkmalen nach GEBUREK (2004) aufgeführt.

Auch Herkünfte unterscheiden sich in den Häufigkeiten ihrer Merkmalausprägung aufgrund der Anpassungsprozesse voneinander, die durch die an ihrem jeweiligen Ursprungsort herrschenden Umweltbedingungen hervorgerufen werden. Dies belegen die Ergebnisse langjähriger Herkunftsversuche. So unterscheiden sich nach RAU (2005) beispielsweise Douglasienherkünfte im Nadelverlust bzw. in ihrer Schütte-Anfälligkeit signifikant (Abb. 3).

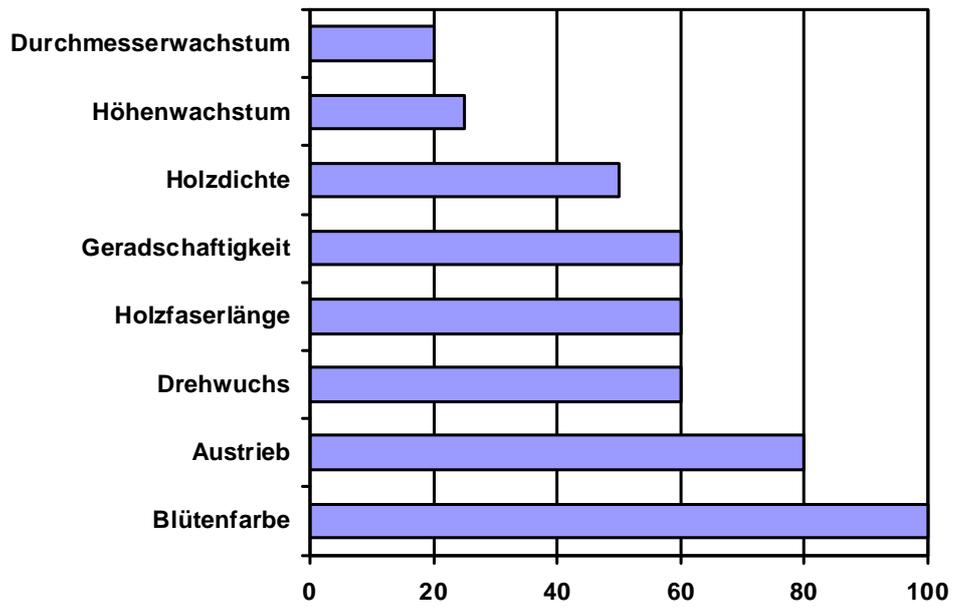


Abb. 2: Vererbungsgrad von Merkmalen (GEBUREK 2004)

Fig. 2: Heredity of traits (GEBUREK 2004)

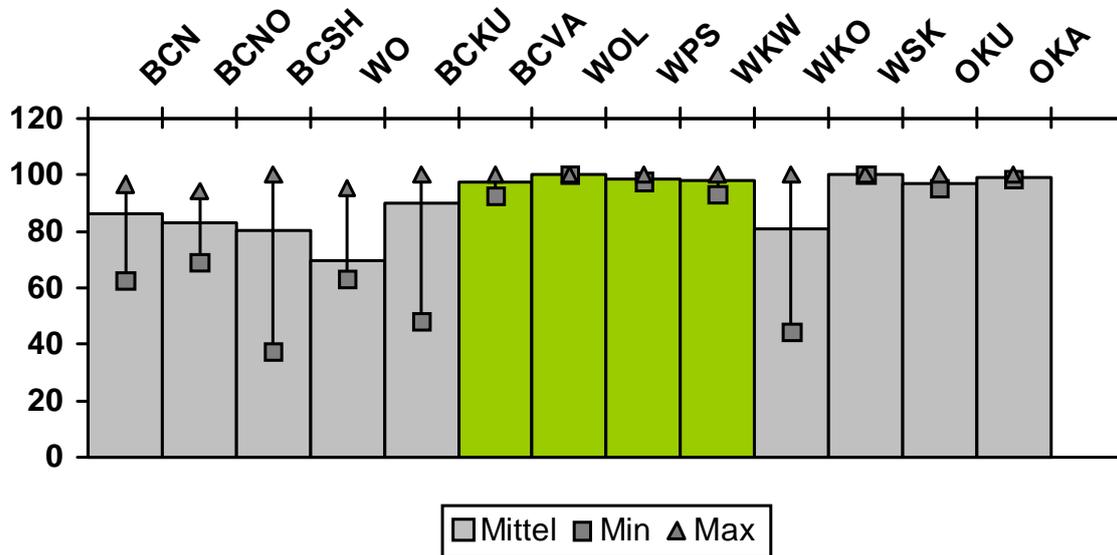


Abb. 3: Nadelverlust diverser Herkünfte aus dem Douglasien-Provenienzversuch Serie I im Alter 27 (RAU 2005)

Fig. 3: Needle losses of various provenances of Douglas fir which were test units in a provenance trial series I at age 27 (RAU 2005)

Zur Veranschaulichung werden in den folgenden Abbildungen 4 und 5 jeweils eine ungeeignete (links) eine geeigneten Herkunft (rechts) bei den Baumarten Buche (Abb. 4) und Birke (Abb. 5) gegenübergestellt. Vor

allem der Anteil geradschaftiger und feinästiger Bäumen liegt bei den geeigneten Herkünften deutlich und auf den ersten Blick erkennbar höher.

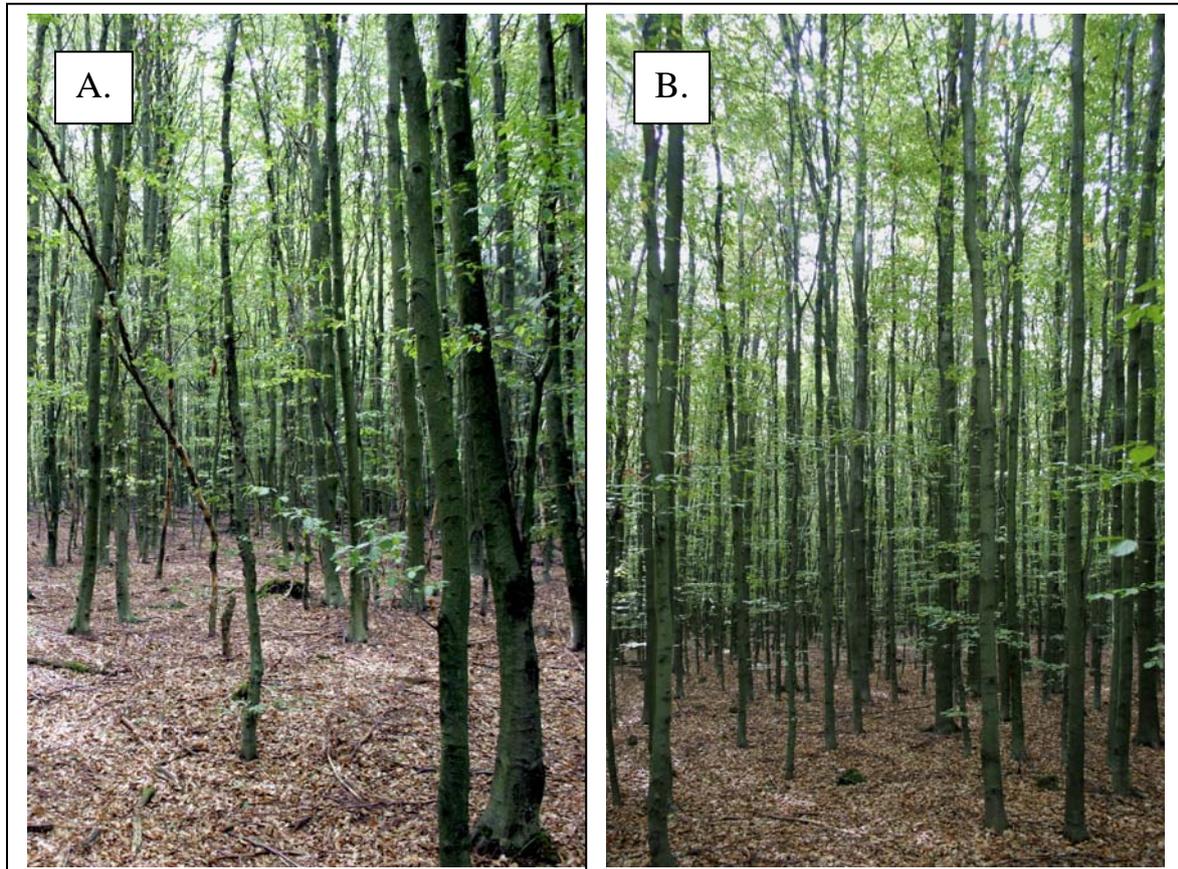


Abb. 4: Vergleich der Schaftformen zweier Buchen-Herkünfte (Alter 39) im Versuch von KRAHL-URBAN im Niedersächsischen Forstamt Münden, Abt. 136

- A. Herkunft Metzingen
- B. Herkunft Zwiesel-Ost

Fig. 4: Demonstration of the stem form of two beech provenances (age 39) which became part of a provenance trial of KRAHL-URBAN, located at Forstamt Münden, comp. 136

- A. Test plot showing the provenance Metzingen
- B. Test plot showing the provenance Zwiesel-Ost

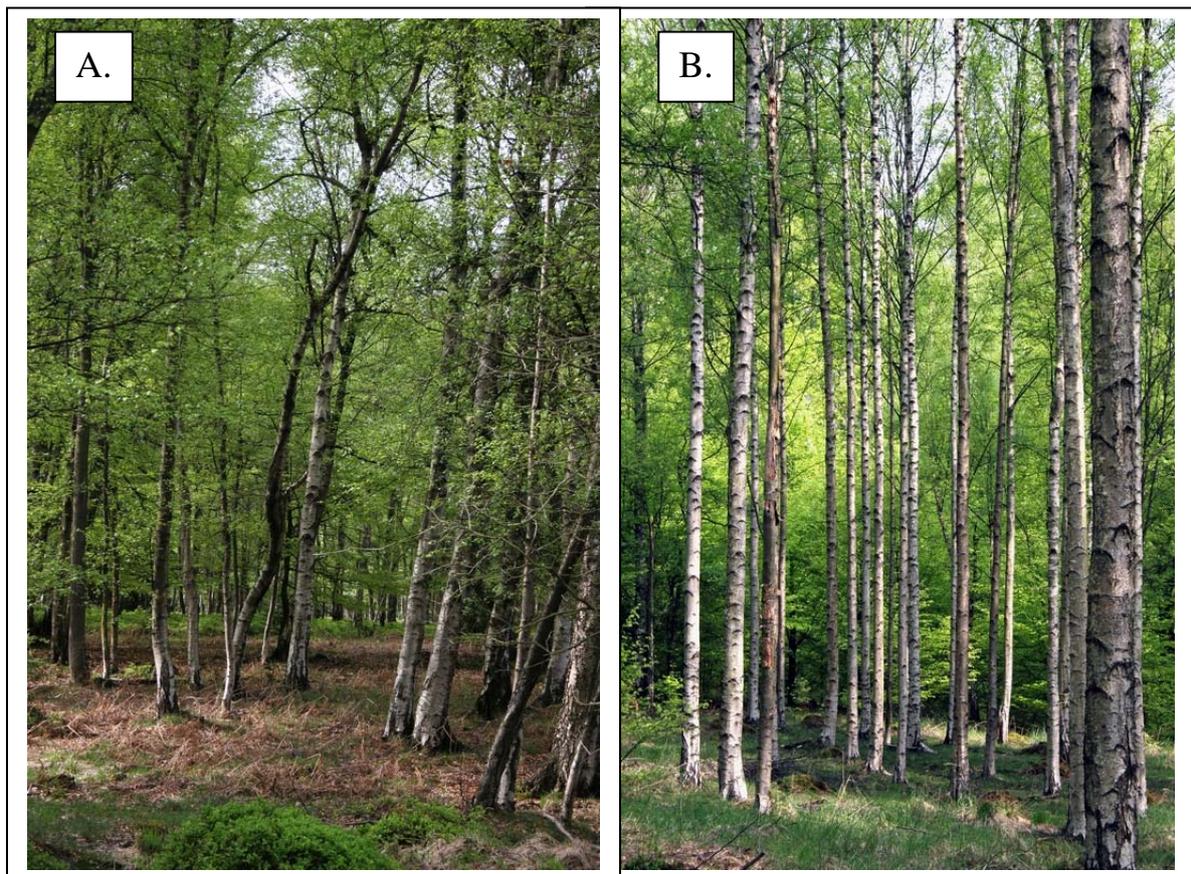


Abb. 5: Moorbirke (*Betula pubescens*)
A. Natürliches Vorkommen im Forstamt Reinhardshagen
B. Herkunft Danndorf als Teil einer Nachkommenschaftsprüfung, angelegt 1969, Abt. 568 B, Forstamt Reinhardshagen / Gahrenberg

Fig. 5: Hairy birch (*Betula pubescens*)
A. Natural occurrence in the forest district Reinhardshagen
B. Provenance Danndorf in a progeny test planted 1969 in the forest district Reinhardshagen / Gahrenberg, comp. 568 B

Ökonomische Bedeutung der Herkunftswahl

Ökonomische Auswirkungen der Herkunftswahl sind erst viele Jahre nach der Pflanzung zu erkennen. KLEINSCHMIT hat 2002 bei einigen Baumarten aus den Ergebnissen älterer Herkunftsversuche die zu erwartenden Erträge mit Hilfe des waldbaulichen Simulationsprogrammes BWINPro (NAGEL et al. 2006) berechnet. Bei Buche war der in den 1950er Jahren angelegte Provenienzversuch von KRAHL-URBAN

Grundlage der Berechnungen. Hier erhöht sich der Ertrag bei Anpflanzung der 25 % besten Buchenherkünfte gegenüber dem Versuchsmittel um 59 %. Bei Anpflanzung der 25 % schlechtesten Buchenherkünfte werden hingegen nur 61 % des Versuchsmittels erreicht. Auch bei Eiche, Fichte und Douglasie werden ähnlich hohe Ertragsunterschiede errechnet (Abb. 6).

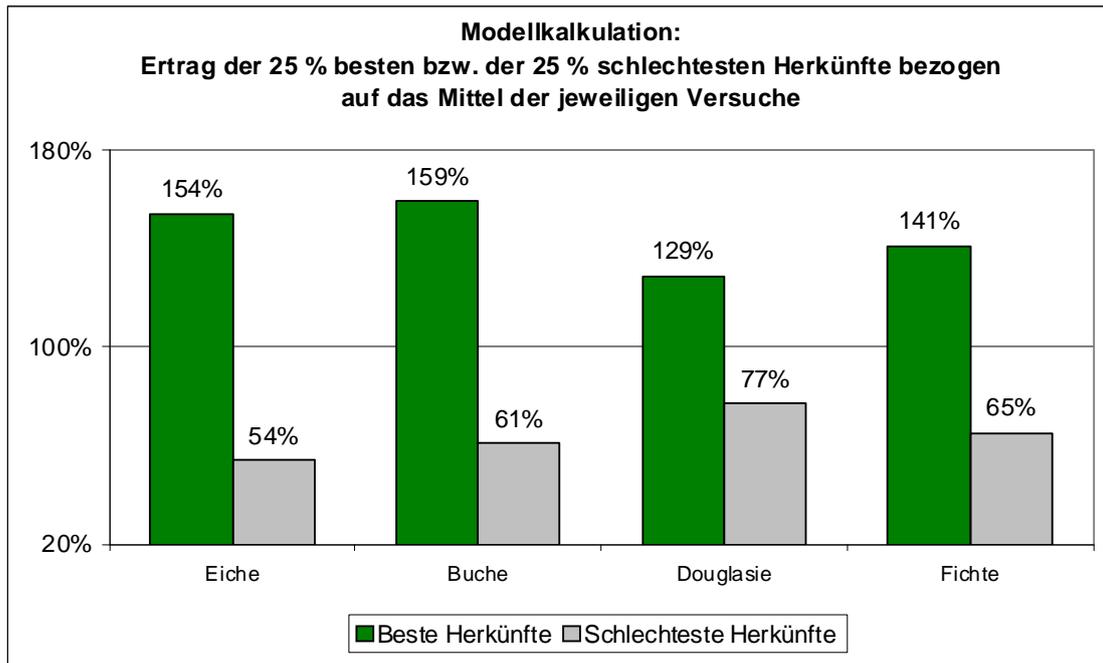


Abb. 6: Ertrag der 25 % besten bzw. der 25 % schlechtesten Herkünfte gegenüber dem Versuchsmittel von Herkunftsversuchen

Fig. 6: Yield of the 25 % best or 25 % worst provenances in comparison to the mean values of provenance test series

LIESEBACH (2002) kommt in seinen Berechnungen zu ähnlichen Größenordnungen.

Allerdings kann die Maximierung der Erträge nicht das alleinige Ziel der Herkunftswahl sein. Eine hohe Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen ist bei der Langlebigkeit der Waldbäume genauso wichtig. Der Ertragsstabilität kommt daher gerade im Hinblick auf die prognostizierten Klima- und Umweltänderungen in Zukunft eine immer größere Bedeutung zu und muss deshalb bei der Herkunftswahl angemessen berücksichtigt werden (WEISGERBER 1990).

Verwendung höherwertigen Vermehrungsgutes

Durch die Verwendung von höherwertigem Vermehrungsgut, das aus Samenplantagen

oder aus geprüften Beständen stammt, kann sowohl die Ertragsstabilität als auch die Ertragsleistung erhöht werden. Bei den Nachkommenschaftsprüfungen wie auch bei den Herkunftsversuchen werden neben Kriterien, die über die quantitativen und qualitativen Wuchsleistungen Auskunft geben, auch Merkmale berücksichtigt, die wie Krankheitsanfälligkeiten und Vitalität das Anbau-risiko bewerten lassen und langfristig beobachtet werden müssen (Abb. 7).

Leider sind nach einer Aufstellung der BUND-LÄNDER-ARBEITSGRUPPE „FORSTLICHE GENRESSOURCEN UND FORSTSAATGUTRECHT“ (2006) mit Stand 2004 in Deutschland nur 405 ha Samenplantagen zur Erzeugung von qualifiziertem Vermehrungsgut und nur 823 ha Bestände und Samenplantagen zur Erzeugung von geprüftem Vermehrungsgut zugelassen



Abb. 7: Langfristiger Vergleich einer ungeeigneten (links) mit einer geeigneten Lärchen-Herkunft (rechts) Versuchsanlage 1936 im Hessischen Forstamt Reinhardshagen, Abt. 579

Fig. 7: Comparison of a bad (left hand side) with a suitable provenance of larch (r.h.s.) in a long term provenance test founded 1936 in the Hessian forest district Reinhardshagen, comp. 579

Ausblick

In den meisten Herkunftsempfehlungen, die von den Forstverwaltungen der Bundesländer herausgegeben werden, ist konsequenterweise die Priorität auf die Verwendung von höherwertigem forstlichem Vermehrungsgut gelegt, das in Samenplantagen und in Beständen der Kategorien „qualifiziert“ oder „geprüft“ geerntet worden ist. Nun ist damit zu rechnen, dass aufgrund der prognostizierten Klimaänderungen ein erheblicher Anteil der auf etwa 11 Millionen ha stockenden Bestände als nicht oder nicht mehr standortgerecht bzw. risikobehaftet eingestuft wird. Ein Baumartenwechsel und

damit die Wahl einer geeigneten Herkunft sind dort nicht nur aus ökonomischen, sondern auch aus ökologischen Gründen zwingend erforderlich. Dafür muss die Zahl der für die Erzeugung von qualifiziertem und geprüftem Vermehrungsgut zugelassenen Ernteeinheiten deutlich erhöht werden.

Bei einigen Baumarten wie Kiefer, Lärche, Fichte, Erle und Douglasie ist das vorhandene Wissen um die Eignung von Herkünften ausreichend. Allerdings sind die zur Beerntung zugelassenen Bestände bei einigen Arten im Durchschnitt relativ alt, so dass zur

Aufrechterhaltung der Saatgutversorgung verstärkt jüngere Erntebestände zugelassen werden sollten. Bei Douglasie sollten zudem verstärkt Bestandesnachkommenschaften in Versuche gebracht werden, um die Bestände zur Beerntung von Vermehrungsgut der Kategorie „Geprüft“ zulassen zu können.

Bei anderen Baumarten wie Buche und Eiche müssen weitere Herkunftsversuche angelegt werden, um die Kenntnisse in diesem Bereich zu erhöhen. Auch hier fehlen wie bei fast allen Baumarten geprüfte Bestände.

Nachkommenschaftsprüfungen und Herkunftsversuche müssen weiter auf die Baumarten ausgedehnt werden, die in Zukunft eine nennenswerte Fläche bestocken könnten wie z. B. die Roteiche oder die Küstentanne und sie müssen in naturräumlicher Nähe zum Verwendungsort stattfinden. Auch geprüftes Vermehrungsgut aus anderen europäischen Ländern muss sich unter heimischen Klimabedingungen bewähren, bevor es empfohlen werden kann.

Literatur

- BUND-LÄNDER-ARBEITSGRUPPE "FORSTLICHE GENRESSOURCEN UND FORSTSAATGUTRECHT" (2006): Tätigkeitsbericht 2001 bis 2004. Bonn, 180 S.
(<http://www.genres.de/fgr/blag/ber-0104/>)
- GEBUREK, T. (2004): Die Weitergabe genetischer Information – eine wichtige Komponente bei der Waldverjüngung. BFW-Praxisinformation Nr. 4: 18-20
- HAMBERGER, J. (2003): Nachhaltigkeit – eine Idee aus dem Mittelalter? LWFaktuell Nr. 37: 38-41
- KLEINSCHMIT, J. (1974): Geschichtliche Entwicklung, Stand und zukünftige Aufgaben forstlicher Herkunftsforschung. Allgemeine Forst- und Jagdzeitung 145: 197-205
- KLEINSCHMIT, W. (2002): Herkunftsfrage aus Sicht der Betriebswirtschaft. In Nordwestdeutscher Forstverein (Hrsg.): Jahrestagung 2002 in Hann. Münden: 28-33
- LANGLET, O. (1971): Two Hundred Years Genecology. Taxon 20: 259-329
- LIESEBACH, M. (2002): Forstgenetik rechnet sich. Österreichische Forstzeitung 113 (6): 33-35
- NAGEL, J.; DUDA, H.; HANSEN, J. (2006): Forest Simulator BWINPro 7. Forst und Holz 61: 427-429
- RAU, H.-M. (2005): Der internationale Douglasien – Provenienzversuch in Hessen – Ergebnisse bis zum Alter 27. Forst und Holz 60: 291-294
- WEISGERBER, H. (1990): Beiträge zur genetischen Variation der Waldbäume und Gefahren der Genverarmung durch Pflanzenzüchtung. Forstliche Forschungsberichte 107: 191 S.

Anschrift des Autors:

Dr. ALWIN JANßEN
Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung Waldgenressourcen
Prof.-Oelkers-Str. 6, 34346 Hann. Münden, Deutschland

Die natürliche Variation und die Messung der stabilen Isotope als Kontrollmethode

Hilmar Förstel

Zusammenfassung

Die meisten chemischen Elemente, darunter die Bioelemente, die den Hauptteil der Biomasse (Kohlen-, Sauer-, Stick- und Wasserstoff sowie Schwefel) bilden, bestehen aus mehr als einem stabilen Isotop. Die isotope Zusammensetzung variiert in Abhängigkeit von globalen Kreisläufen, wie z. B. dem Wasserzyklus, oder kleinräumig infolge von Umsetzungen in lokalen Ökosystemen. Im Ergebnis unterliegen stabile Isotope einer Fraktionierung, und jedes Individuum zeigt entsprechend seiner Umgebung seine eigene isotope Prägung, wenn es Biomasse bildet. Diese Prägung wird als „isotoper Fingerabdruck“ bezeichnet und kann nur durch intensive Umsetzungen des Materials wieder verändert werden. Ist ein Samen fertig ausgebildet, so behält er die isotope Zusammensetzung seiner Herkunft bei. Nutzt man diese Tatsache, so sind zwei Fragestellungen zu unterscheiden: Einmal wird nachgefragt, ob eine Charge, die in Verkehr gebracht werden soll, tatsächlich dem angegebenen Ausgangsmaterial entstammt (Identität). Im zweiten und weitergehenden Fall gilt es zurückzuverfolgen, ob es sich um heimisches Saatgut aus zugelassenen Beständen oder aber um eingeführte Ware anderer geografischer Herkunft handelt. Im ersten Falle genügt der Vergleich mit einem Referenzmaterial der zu prüfenden Ernte. Im anderen Falle sind aufwendigere Datenbanken vorzuhalten. Für deren Aufbau ist authentisches Material erforderlich. Der Beitrag gibt einen Überblick über die Stabilisotopen-Methode und erläutert die Anwendung an ausgewählten Beispielen.

Schlagwörter: stabile Isotope, IRMS, natürliche Variation, geografische Herkunft

The natural variation and the measurement of stable isotopes as a control method

Abstract

Most of the chemical elements consist of more than one stable isotope, as the elements which form the major portion of the biomass (carbon, oxygen, hydrogen, nitrogen and sulphur). The composition of the stable isotopes of these elements varies depending on global movements as e.g. the hydrological cycle or governed by the turnover within the local ecosystems and by the organisms. As a result the stable isotopes of the elements are fractionated individually and therefore each environment has its own isotopic composition. The local isotopic composition is the basis of the synthesis of the biomass at this site. Once synthesised the composition of the stable isotopes remains stable and is therefore called “isotopic fingerprint”. To control the origin two different questions have to be distinguished: Usually it has to be ensured that the seed has exactly been harvested from the stand which has been selected and confirmed by documents. The Southern German quality assurance system ZüF takes a reference sample at the harvest and compares these results to the material finally distributed commercially. Stable isotopes may be very useful to support this step of control. More sophisticated is the second question to trace back the origin of a material. This necessitates a larger data base which has been fed with authentically drawn samples, but can use global isotopic patterns. This contribution explains the basic principles of the stable isotope method and illustrates the application with some examples.

Key words: stable isotopes, IRMS, natural variation, geographic origin

1. Einleitung

Es gibt nur wenige Methoden, die es erlauben, allein am vorliegenden Material die Identität oder die Herkunft einer Ware überprüfen zu können. Chemische Analysen können Inhaltsstoffe aufspüren, aber nicht deren Herkunft ermitteln. In bestimmten Fällen können bestimmte Inhaltsstoffe auch weitere Auskünfte über Herkunft oder Verfälschungen geben. Solche Überlegungen gelten für Forstvermehrungsgut in der Regel nicht, da es an der Pflanze selbst unmittelbar gebildet wird und danach keiner weiteren Veränderung, auch im Sinne der stabilen Isotope, unterliegt. Samen spiegelt in seiner Zusammensetzung aus den stabilen Isotopen der biologisch wichtigsten Elemente den Ort wieder, an dem er gebildet worden ist. Er erhält dort seinen „isotopen Fingerabdruck“.

Man spricht von einem Fingerabdruck aus folgenden Gründen: Einmal bleibt eine dem Material aufgeprägte stabilisotope Zusammensetzung im Material erhalten, wenn keine weiteren Umsetzungen erfolgen. Zum anderen variiert die isotope Zusammensetzung global, regional und lokal, ist also für einen bestimmten Ort charakteristisch.

An eine Kontrollmethode, die die lokale Variation der stabilen Isotope einsetzt, sind folgende Anforderungen zu stellen:

- Unabhängig von Dokumenten muss die Deklaration am Material selbst zu überprüfen sein.
- Die Ergebnisse können in weltweit bekannte Muster oder lokale Erfahrungen eingeordnet werden.
- Die Ergebnisse sind theoretisch und empirisch grundsätzlich zu erklären.
- Es existiert ein weltweit anerkanntes Messverfahren mit internationalen Standards, Ring- und Proficiency-Tests.

Diese Bedingungen werden von der Stabilisotopen-Methode erfüllt.

Wichtig ist natürlich, dass die Variationen ausreichend groß sind und dass damit eine gute Differenzierung möglich ist. Allerdings wird die Methode durch die statistische Streuung im Material selbst begrenzt, da die physikalischen und physiologischen Bedingungen in einem Baum und einem Bestand variieren. Dies kann die Anwendbarkeit der Methode begrenzen.

Die Kenntnis der Ursachen der unterschiedlichen stabilisotopen Zusammensetzung von Saatgut zeigt, dass die Methode ihre Grenzen dort findet, wo Saatgut an andere Orte verbracht und dort zu Pflanzen herangezogen wird. Am neuen Ort wird die Biomasse aus dem Material aufgebaut, das sich dort in der Umgebung vorfindet. Damit ergänzen sich die Stabilisotopen- und die genetische Methode, weil unabhängig von der jeweiligen Umgebung in jedem Teil des Organismus sein Erbcodex gespeichert ist, und die Stabilisotopen-Muster ein Spiegelbild der jeweiligen Umgebung des Wachstums der Pflanze ist.

Bei der Anwendung der Stabilisotopen-Methode wird von Authentizität gesprochen, da verschiedene Fragen beantwortet werden sollen, die deutlich zu unterscheiden sind:

- Einmal wird lediglich angefragt, ob das in Verkehr gebrachte Material tatsächlich einen bekannten bzw. den deklarierten Ursprung hat, also die Prüfung auf Identität. Dazu wird die stabilisotope Zusammensetzung einer authentischen Probe des deklarierten Ursprungs mit dem Material verglichen, das in Verkehr gebracht werden soll. Begrenzend sind hier lediglich die Inhomogenitäten des Untersuchungsgutes.
- Aufwendiger gestaltet sich die Überprüfung der Herkunft, wenn lediglich eine Deklaration angegeben ist, aber keine Vergleichsprobe zur Verfügung steht. Dann kann das Ergebnis für Wasserstoff und Sauerstoff aufgrund der Variation

im weltweiten Wasserkreislauf grob eingeordnet werden. Aber meist ist es notwendig, auf Datenbanken zurückzugreifen. Durch die stetig wachsende Datenbasis optimiert sich die Stabilisotopen-Analytik damit ständig.

- Der Aufwand wird dann gesteigert, wenn auch Verfälschungen, wie Mischungen, untersucht werden sollen. Je nach Streuung der Messwerte und der Inhomogenität des Untersuchungsmaterials erhöht sich bei stückweise vorliegenden Proben, wie dem Saatgut, die notwendige Probenanzahl.

2. Methodische Grundlagen

2.1 Variation der stabilen Isotope in der Natur

Obwohl die Zusammensetzung der chemischen Elemente aus ihren stabilen Isotopen schon seit Anfang des vorigen Jahrhunderts bekannt und deren Variation in der Natur seit der Mitte des letzten Jahrhundert ebenfalls untersucht worden ist, hat die Stabilisotopen-Methodik nur das Interesse von Spezialisten gefunden, da hoher technischer Aufwand und Unauffälligkeit im Alltag entgegenstanden. Erst als die Methode in der Lebensmittelanalytik zur Aufdeckung von

Verfälschungen und Fehldeklarationen erfolgreich eingesetzt und für eine Reihe von Prüfungen (Honig, Wein, Essig usw.) anerkannt worden ist, findet sie eine breitere Anwendung. Auch hat die Vereinfachung der speziellen Messtechnik dazu geführt, dass das Verfahren zunehmend für ökologische und medizinische Fragestellungen eingesetzt wird.

Bis auf den Sauerstoff bestehen die Elemente, die den Hauptteil der Biomasse ausmachen, also Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel, aus zwei stabilen Isotopen. Dabei hat das schwerere Isotop jeweils einen geringeren Anteil am gesamten Element (Tab. 1). Beim Sauerstoff ist das stabile Isotop mit der mittleren Masse (17) das seltenere, sodass nur die Variation im Verhältnis ^{18}O zu ^{16}O in der derzeitigen Routine betrachtet wird. Die großen Unterschiede in der Häufigkeit zwischen den stabilen Isotopen der „Bioelemente“ verhindern auch, dass eine komplizierte statistische Verteilung in den Molekülen beachtet werden muss. So sind beim Wasserstoff lediglich die Massen 2 ($^1\text{H}^1\text{H}$) und 3 ($^1\text{H}^2\text{H}$) zu messen bzw. messbar. (^2H als schwerer Wasserstoff wird auch als Deuterium mit dem Symbol D bezeichnet). Die Masse 4 ($^2\text{H}^2\text{H}$ oder DD) hat entsprechend der Tabelle 1 einen Anteil von $2 \cdot 10^{-6}$ Atomprozent.

Tabelle 1: Massen und deren relative Häufigkeit der „Bioelemente“

Table 1: Mass numbers and relative abundance of the stable isotopes of the „bioelements“

<i>Element</i>	<i>Massen</i>	<i>Relative Häufigkeit in % leichtes/schweres Isotop</i>
C (Kohlenstoff)	12 / 13	98,892 / 1,108
O (Sauerstoff)	16 / 18	99,759 / 0,204
H (Wasserstoff)	1 / 2	99,985 / 0,015
N (Stickstoff)	14 / 15	99,636 / 0,364
S (Schwefel)	32 / 34	95,045 / 4,214

Allgemein werden die Variationen als Verhältnisse zwischen dem seltenen und dem häufigen stabilen Isotop angegeben, also als D/H-, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ - und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnis. Tabelle 2 zeigt die

sog. δ -Werte einiger Materialien mit verschiedenem Anteil an ^{13}C . Da die Variationen gering sind, wird seit Einführung der Methode die δ -Nomenklatur angewendet.

Tabelle 2: Beispiele für die natürliche Variation anhand einiger Materialien und dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis zur Erläuterung der δ -Nomenklatur

Table 2: Examples of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of some selected materials illustrating the δ -notation

Beispiel	Relative Häufigkeit in Atom-% ^{12}C	^{13}C	δ -Wert in Promille
Kalkstein	98,8899	1,1100	- 1,1
CO ₂ in der Atmosphäre	98,8972	1,1027	- 7,7
Rohrzucker (C ₄ -Pflanze)	98,9019	1,0981	- 12,0
Rübenzucker (C ₃ -Pflanze)	98,9173	1,0826	- 26,0

Der δ -Wert gibt an, um wie viel Promille ein Material in seiner stabilisotopen Zusammensetzung von einem international definierten Nullpunkt der Skala abweicht. Dieser Nullpunkt wurde bzw. wird durch ein real existierendes Material definiert, den Primär-

standard (Primary Reference Material, PRM). Die zentral verantwortliche Stelle ist die Internationale Atomenergiebehörde (IAEA) in Wien in Zusammenarbeit mit dem National Bureau of Standards and Technology (NIST) der USA in Gaithersburg.

Der δ -Wert in ‰ errechnet sich nach der Formel

$$\delta = \frac{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Probe})} - {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Standard})}}{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Standard})}} \cdot 1000$$

mathematisch vereinfacht

$$\delta = \left(\frac{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Probe})}}{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Standard})}} - 1 \right) \cdot 1000$$

Ein positiver δ -Wert bedeutet eine Anreicherung gegenüber dem Primärstandard, ein negativer eine Abreicherung. Zu beachten ist, vor allem wenn man dann die Messgenauigkeit beurteilen will, dass die Aussage des δ -wertes von der Häufigkeit des selteneren Isotops abhängig ist und sich damit von Element zu Element unterscheidet. So bedeutet die Abweichung um +1 ‰ für das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis eine Verschiebung von 0,001 Atom-%, für Wasserstoff dagegen um 0,00001 Atom-%. Folglich kann das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis mit einer

Reproduzierbarkeit unterhalb von ± 0.1 ‰, Wasserstoff dagegen nur mit ± 1 ‰ gemessen werden.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht der von Agrolab verwendeten Standards. Wie schon erwähnt, sind von diesen Primärstandards neue Chargen hergestellt worden, wie nun schon die Dritte vom Standard Mean Ocean Water SMOW, dem jetzigen Vienna-SMOW 2. Andere Materialien wurden gegen die Primärstandards kalibriert, wie für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ der PEF, eine Polyethylenfolie, die

das ehemalige Zentralinstitut für Isotopenforschung der DDR in Leipzig (heute UFZ/Helmholtz-Zentrum) der IAEA geliefert hat. Die Standards werden von der IAEA in begrenztem Umfang ausgeliefert, so der

SMOW an jedes anfragende Labor nur alle drei Jahre, so dass jedes Labor seine eigenen Laborstandards kalibrieren und in homogener und unveränderbarer Form in ausreichender Menge verfügbar haben muss.

Tabelle 3: Internationale Standards (Auswahl einiger von Agroisolab GmbH verwendeter Standards)
 Table 3.: International standard materials which are used by the Agroisolab GmbH (selection)

Name	Isotope	δ in [‰]	Bemerkung
PDB	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0	PeeDee Belemnite (Fossiler Tintenfisch)
SMOW	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ $^2\text{H}/^1\text{H}$	0 0	Standard Mean Ocean Water
GISP	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ $^2\text{H}/^1\text{H}$	- 24,8 vs VSMOW - 189,5 vs VSMOW	Greenland ICE Sheet Precipitation (water)
PEF (IAEA-CH-7)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	- 31,8 vs PDB	Polyethylenfolie
Saccharose (IAEA-CH-6)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	- 10,4 vs PDB	
Ammonium Sulfate (IAEA-N-1)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	20,3 vs Air-N ₂	
Ammonium Sulfate (IAEA-N-2)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	4,7 vs Air-N ₂	

Die Primärstandards wurden ursprünglich in den 1950er Jahren in den USA definiert, wo heute noch das National Institute of Standards and Techniques (NIST) in Gaithersburg eine Reihe von Standards verwaltet. Diese Primärstandards sind nicht willkürlich gewählt, da sie in der Regel große homogene Reservoirs repräsentieren, so ein Meerwasser den SMOW, Luftstickstoff den Stickstoff und ein mariner Kalk den Kohlenstoff als PDB (IAEA 1995). Lediglich beim Schwefel wurde auf extraterrestrisches Material, einen Meteoriten, zurückgegriffen, da Schwefel besonders stark je nach biogener oder vulkanischer Herkunft variiert. Durchgesetzt hat sich aber die Internationale Atomenergiebehörde in Wien, deren Hauptaufgabe zwar die friedliche Nutzung der Kernenergie ist, die aber auch die Ablagerung und den Verbleib von Kernmaterial beaufsichtigt. Dazu müssen Stoffkreisläufe beobachtet

werden, um die mögliche Verteilung von freigesetztem Kernmaterial in der Umwelt verfolgen zu können.

2.2 Fraktionierung im globalen Wasserkreislauf

In den 1950er Jahren stiegen sowohl der ^{14}C als auch der Tritium-Gehalt in der Atmosphäre aufgrund der oberirdischen Kernwaffenversuche stark an. Tritium ist das kurzlebige (Halbwertszeit 12,6 Jahre) radioaktive Isotop des Wasserstoffs mit der Masse 3, also auch ^3H geschrieben. Einmal freigesetzt verteilt es sich im Wasserkreislauf, ohne dass es daraus zurückgeholt werden kann. Daher unterhält die IAEA (1969-1994) seit dieser Zeit ein weltweites Netzwerk, das monatlich mittelfristig die örtlichen Niederschläge sammelt. Die Ergebnisse sind vom Internetportal der

IAEA im Data Centre unter der Bezeichnung GNIP frei zugänglich.

98 % des freien Wassers auf der Erdoberfläche liegt im geologisch gut durchmischten Ozean vor, der 2/3 der Erdoberfläche bedeckt. Der überwiegende Rest ist als Eis an den Polen abgelagert, und nur ein geringer Anteil zirkuliert als Wasserdampf, Wolken, Niederschlag und Süßwasser auf der Erdoberfläche bzw. den Kontinenten. Das bedeutet, dass das Meer, von dem eine Wasserprobe als Nullpunkt der Skala der Isotope des Wassers definiert worden ist, ständig Wasserdampf an die darüber liegende Luft abgibt. Dieser Wasserdampf ist an den schwereren Isotopen abgereichert, die bevorzugt in der flüssigen Phase zurückbleiben. Daher ergeben sich für den gesamten Wasserkreislauf überwiegend negative δ -Werte.

FRIEDMAN hat 1953 als einer der Ersten die Variation der stabilisotopen Zusammensetzung des Wassers entdeckt. Die Ursache dafür ist die Fraktionierung der Isotope, die immer dann auftritt, wenn die unterschiedlichen Massen der Isotope eines Elementes eine Rolle spielen. Sie treten auch nur dann auf, wenn der Umsatz des Materials, hier des Wassers, nicht vollständig ist. Verdunstet aus einem Vorrat alles Wasser, so muss der daraus sich bildende Wasserdampf in der Summe genau wieder die isotope Zusammensetzung wie das Ausgangsmaterial haben, denn für die stabilen Isotope gilt auch das Gesetz von der Erhaltung der Masse. In der Natur sind allerdings die Umsätze im weltweiten Kreislauf des Wassers nicht vollständig. Es werden also stets Fraktionierungen beobachtet.

Dabei reichern sich während der Verdunstung im zurückbleibenden Wasserreservoir die schwereren Isotope an, im Wasserdampf dagegen ist der umgekehrte Vorgang zu beobachten. Bei der Verdunstung von der Oberfläche des Meeres wird dessen isotope Zusammensetzung allerdings nicht

beeinflusst, da dieses Reservoir genügend groß und gut durchmischt ist.

Man kann sich auch eine Vorstellung von der Größenordnung der Fraktionierung machen, wenn man diesen Effekt in Gasen betrachtet. In einem Gas haben alle Teilchen (Moleküle) die gleiche mittlere Bewegungsenergie, da sie ständig ihren Impuls durch Stoß mit anderen Teilchen weitergeben. Obwohl es langsamere und schnellere Teilchen aufgrund der statistischen Verteilung gibt, haben alle Moleküle einer Sorte doch im Mittel die gleiche Bewegungsenergie (kinetische Energie, E). Diese ergibt sich für die Masse m und deren Geschwindigkeit v ;

$$E = m/2 \cdot v^2$$

für zwei verschiedene Massen gemäß dem Gleichverteilungssatz der Energie:

$$E = m_1/2 \cdot v_1^2 = m_2/2 \cdot v_2^2.$$

Daraus folgt:

$$m_1/m_2 = \sqrt{v_2/v_1}$$

Die Geschwindigkeit wird als Maß für das Erreichen eines Ortes angenommen, an dem das Teilchen umgesetzt wird, also entweder reagiert oder aber in eine andere Phase übergeht. Die Formel zeigt auch, dass der Unterschied in den Massen sich in den Geschwindigkeiten nicht direkt, sondern vermindert im Verhältnis der Wurzel aus den Massen auswirkt. Das bedeutet, da die Unterschiede in den Massen mit zunehmender Ordnungszahl abnehmen, dass für Elemente mit höherer Ordnungszahl die Fraktionierungen immer geringer werden.

Nach dem vorgestellten Modell errechnet sich zwischen $H_2^{16}O$ und $H_2^{18}O$ ein Unterschied in der Geschwindigkeit von 5 %. Tatsächlich ist der Effekt geringer, da mehrere Wassermoleküle sich zusammenschließen und sich die Masse der Teilchen damit vergrößert.

Die treibende Kraft für die Bewegung des Wassers und der Luft ist der Unterschied der Temperatur auf der Erdoberfläche. Allerdings beeinflussen noch andere Effekte die Bewegung der Luftmassen, wie die Neigung der Erdachse, die Kugelgestalt mit einer Zonierung der Intensität der Sonneneinstrahlung und die Verteilung der Kontinente / Meere. Außerdem lenken auf der Nordhalbkugel die Gebirge die Bewegung der Luftmassen ab. In Nordamerika beeinflusst die Nord-Süd-Ausrichtung der Gebirge die Bewegung der Luftmassen. Folglich ist das Profil der Abreicherung im Niederschlag auch nach dieser Tendenz ausgerichtet. In Europa stellen sich die Alpen mit ihrer vorwiegende West-Ost-Barriere den Luftmassen derart in den Weg, dass sich dort eine Abreicherung eher an der West-Ost-Richtung orientiert. Dies wurde schon früh aus den Daten der Niederschläge der Stationen der IAEA deutlich (FÖRSTEL et al. 1975), von FÖRSTEL & HÜTZEN (1983)

für die Bundesrepublik Deutschland [alte Bundesländer] bestätigt und 2002 von BOWEN mit einem größeren Satz von Isotopen- und Klimadaten auf weltweitem Maßstab verfeinert. Dabei hat sich die Grundstruktur aber nicht verändert. Aus urheberrechtlichen Gründen kann die Karte von BOWEN (2002) hier nicht abgebildet werden; sie ist aber im Internet einsehbar (University of Utah, USA).

Die in Abbildung 1 gezeigte Verteilung basiert auf den Messwerten der Stationen der IAEA. Dabei entsteht der Eindruck, dass die örtliche mittlere Jahrestemperatur der bestimmende Faktor ist. Diese wiederum ist besonders von der geografischen Lage, der Höhe über dem Meeresspiegel und dem Abstand von der Küste abhängig. Hinzu kommt, dass man eine sehr enge Korrelation zwischen den beiden Isotopenpaaren D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ erwarten kann, da sie beide dasselbe Molekül bilden. Diesen Zusam-

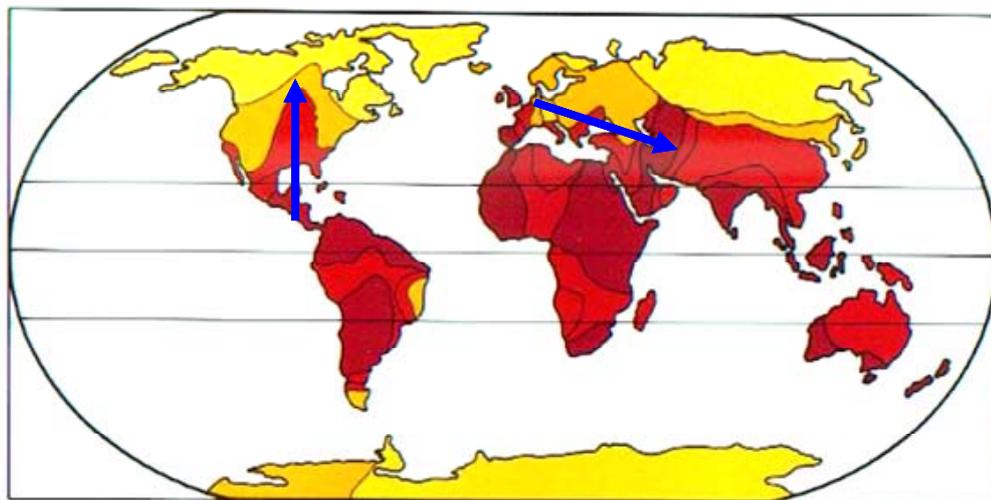


Abb.1: Weltweites Muster der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Werte im Niederschlag nach den Daten des IAEA-Messnetzes. Von Rot nach Gelb hin stufenweise übergehend wird die zunehmende Abreicherung vom Äquator zu den Polen und über die Kontinente hin deutlich. Die Pfeile verdeutlichen die Hauptrichtung des Eintrages des Niederschlages auf dem amerikanischen und dem europäischen Kontinent.

Fig. 1: Spatial distribution of the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio of precipitation from the IAEA network. Changing from red to yellow symbolises the decrease of the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio from the equator towards the polar regions and across the continents. The arrows show the main direction of the movement of precipitation generating air masses across the American and the European continent.

menhang hat CRAIG schon 1961 publiziert (Abb. 2), und danach ist dieses Phänomen als „meteoric water line“ (Niederschlags-

linie) benannt und immer wieder, recht früh auch noch intensiv von DANSGAARD (1964) bestätigt worden.

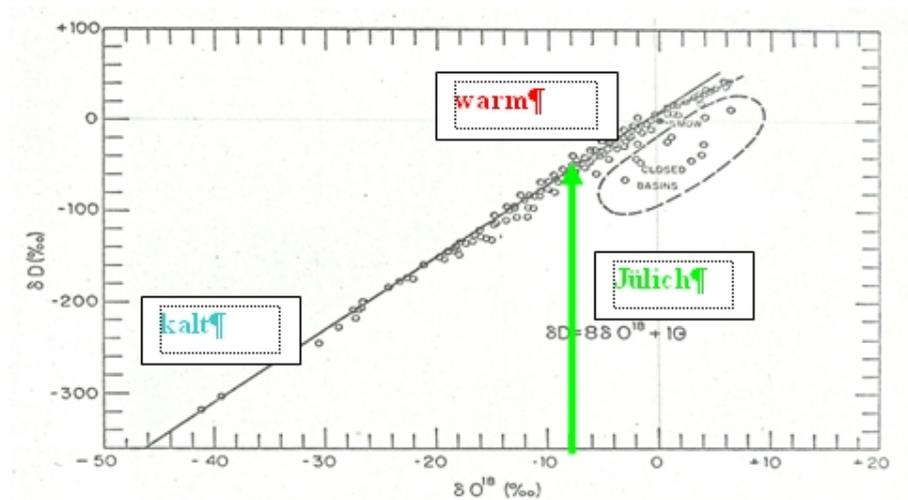


Abb.2: Wiedergabe der ersten Darstellung der Niederschlagslinie als Korrelation der D/H- und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Werte im Niederschlag (CRAIG 1961). Sie kann gleichzeitig auch als ein Maß für die mittlere Jahrestemperatur an einem bestimmten Ort (hier nur angedeutet durch die Angaben kalt/warm) angesehen werden.

Fig. 2: Reproduction of the first publication of the meteoric water layer, a correlation between the D/H and the $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of precipitation (CRAIG 1961). The graph also demonstrates the dependence of the isotope ratios on the local mean annual temperature roughly labelled by the terms cold/warm.

Somit ergibt sich für jeden Ort auf der Erdoberfläche ein charakteristisches stabilisotopes Muster des Wassers. Es wird besonders deutlich, wenn sich die Luftmassen über eine größere Landmasse bewegen, dabei teilweise ausregnen, dieser Niederschlag teilweise wieder verdunstet und damit in dem Reservoir an Wasserdampf wieder neues Material zuführt. Die Kondensation von Niederschlag ist ein typischer Anreicherungsprozess, die Verdunstung führt zu einer Abreicherung des abgegebenen Wasserdampfs. Somit kommt es, da das Abregnen die Verdunstung überwiegt, zu einer ständigen Abreicherung des Wasserdampfes und damit des Niederschlags während sich die Luftmasse über den Kontinent bewegt. Man spricht daher vom „Kontinentaleffekt“. Dieser ist in Europa nördlich der Alpen bis zum Ural hin besonders deutlich ausgeprägt. Da sich der Niederschlag in seiner stabilisotopen Zusammensetzung unverändert im

Boden und danach im Grundwasser wieder findet, weist Wasser in der Regel an einem bestimmten Ort auch ein bestimmtes D/H- und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis auf.

Es fällt auf, dass alle „Bioelemente“ entweder auf ein großes Reservoir zurückgreifen können (Wasser, Luft) oder bei ihren Umsätzen als Zwischenprodukte gasförmige und damit flüchtige Reaktionsprodukte (Schwefel) auftreten können. Damit führen unvollständige Umsätze zu deutlichen Fraktionierungen ihrer stabilen Isotope in den verschiedenen Reservoirs. Neben den stabilen Isotopen des Wassers zeigen die anderen Elemente ebenfalls lokale Unterschiede in ihrer stabilisotopen Zusammensetzung.

Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis wird in sehr deutlichem Maße durch den Typ der Photosynthese bestimmt, je nach dem ersten Syntheseprodukt dieses Vorganges als C_3 - oder

C₄-Pflanze bezeichnet (HATCH & SLACK 1966; O'LEARY 1988), oder mit der Möglichkeit eines anpassbaren Stoffwechselweges bei den CAM-Pflanzen (Crassulaceen Acid Metabolism; OSMOND 1978). Die hier interessierenden, in Europa wachsenden Forstpflanzen gehören alle dem C₃-Typ an. Modifikationen des ¹³C/¹²C-Verhältnisses können sich aus zwei Gründen ergeben: Den geringeren Einfluss übt das Klima auf den Wasserhaushalt und dabei über die Weite der Spaltöffnungen auf die Diffusion des Kohlendioxids in das photosynthetisch aktive Gewebe aus. Weitaus größer ist der Einfluss der Position des photosynthetisch aktiven Organs im Kronenraum des Bestandes einzuschätzen, da sich bodenbürtiges und freies atmosphärisches Kohlendioxid in ihren ¹³C/¹²C-Gehalt deutlich unterscheiden. Aus dem Boden austretendes Kohlendioxid stammt aus der Zersetzung der pflanzlichen Biomasse. Bei deren Bildung kommt es zu einer deutlichen Fraktionierung gegenüber dem aus der Luft. Da das ¹³C bei der Biosynthese gegenüber dem Primärstandard abgereichert wird, sind die ¹³C/¹²C-Werte der Biomasse negativ.

Beim Stickstoff wird aufgrund seiner verschiedenen oxidierten und reduzierten Formen ebenfalls eine deutliche Fraktionierung beobachtet (KOHL & SHAERER 1980). Bei jedem Übergang von einer Form in die andere treten gasförmige Komponenten auf (Stickstoff, Stickoxide, Ammoniak), die zu teilweisen Verlusten und damit zu Fraktionierungen führen. Allerdings ist das Reservoir des Stickstoffs im Boden in der Regel relativ groß und bewahrt daher die Geschichte seiner Düngung und seiner Umsätze langfristig auf. Deswegen kann es in scheinbar gleichförmigen Beständen aufgrund der Vorgeschichte einzelner Abschnitte deutliche Unterschiede geben. Typisch für ungestörte, nur gering immissionsbelastete Forsten sind negative δ-Werte gegenüber dem Primärstandard Luft, der weder zeitliche noch lokale Differenzen aufweist. Auch beim Schwefel tritt eine flüchtige Form im Zuge der Redox-Vorgänge auf.

Deshalb unterscheiden sich Chargen vulkanischer und biogener Herkunft auch derart deutlich, dass als einzigem Element in der Tabelle der Atommassen ein Hinweis auf diese Variation gegeben wird.

2.3 Fraktionierung des Wassers der Pflanze

Aus eigenen langjährigen Beobachtungen unter den Bedingungen der gemäßigten Zone und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch der Tropen ergibt sich, dass der Mittelwert der isotonen Zusammensetzung des örtlichen Niederschlages im Laufe des Jahres sich im Boden ohne Fraktionierung wiederfindet. Im Grundwasser wird demzufolge wiederum dieser Wert gemessen (FÖRSTEL & HÜTZEN 1983). Das ist deshalb nicht ohne weiteres selbstverständlich, da sowohl die isotope Zusammensetzung des Niederschlages als auch die Verdunstungsrate einen deutlichen Jahresgang aufweisen. Außerdem reichern sich bei der Austrocknung der oberen Bodenschichten im Sommer die schwereren Isotope an. Doch spielt diese Wassermenge für den Gesamthaushalt des Bodens keine Rolle. In der Regel wurzeln die Pflanzen so tief, dass die Wurzeln von dem Wasser umgeben sind, das die lokale stabilisotope Zusammensetzung des Niederschlags widerspiegelt.

Beim Übergang von Wasser in die Wurzel sowie beim Transport im Xylem ist keine Fraktionierung zu erwarten, da es sich um einen Massentransport handelt. Lediglich in besonderen hydrologischen Situationen, so wenn tiefer liegende Wasserleiter angezapft werden, die von anderen Orten stammen, wie zum Beispiel bei Bäumen am Ufer von Flüssen mit nur zeitweiser Wasserführung, sind abweichende Einflüsse beobachtet worden (DAWSON & EHLERINGER 1991).

Erst dort, wo der Wasserstrom an die Oberfläche der Blätter trifft, kann es zu einem Phasenübergang und damit zu einer Fraktionierung kommen (DONGMANN et al.

1972, 1974; FÖRSTEL 1978). Dies wird auch deutlich an den Ergebnissen, die EPSTEIN et al. (1976a) veröffentlichten: Wasserpflanzen zeigen diese Anreicherung nicht. Man kann bei den Landpflanzen den örtlichen Niederschlag auch an dem Wasser aus dem Stamm und den Ästen ableiten, sofern die Äste aktiv sind. Blattlose Äste in der Ruheperiode des Winters reichern tatsächlich $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ an, wobei dieser Effekt sofort wieder dem Grundwasser angeglichen wird, wenn die Transpiration mit Beginn der Vegetationsperiode einsetzt.

Eine Übersicht der Vorgänge und der dabei zu beobachtenden Fraktionierung gibt Abbildung 3. Sie verdeutlicht, dass die pflanzliche Transpiration der entscheidende Schritt der Anreicherung im System Atmosphäre-Boden-Pflanze ist. Dabei hängen sowohl die Intensität der Transpiration als auch die Höhe der Anreicherung im Wesentlichen von den physikalischen Parametern Temperatur und Luftfeuchte ab. Einen gewissen Einfluss hat dabei auch die physiologische Situation der Pflanze, besonders bei Wassermangel (BURK & STUIVER 1981; FARQUHAR & LLYOD 1993).

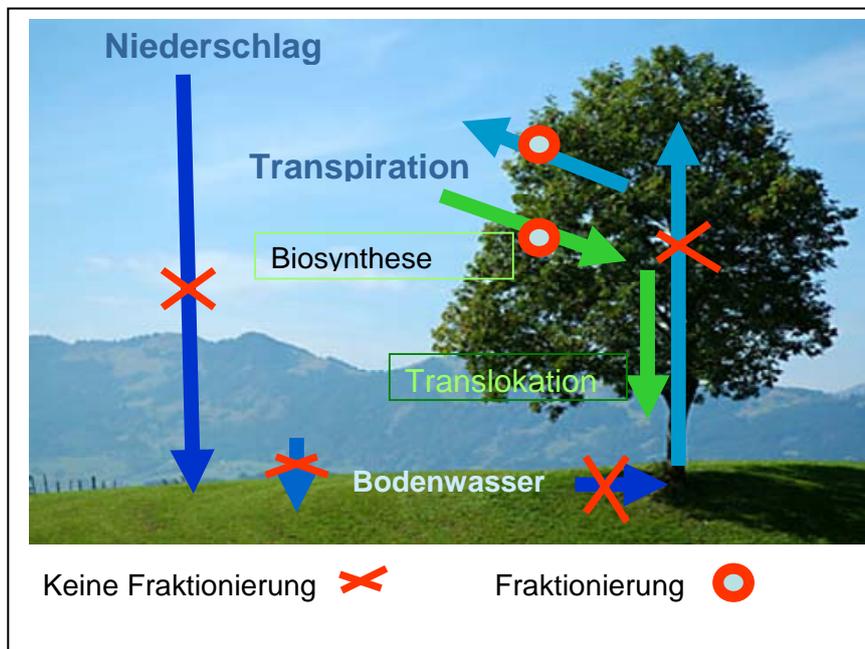


Abb. 3: Übersicht der Schritte des Wasserflusses im lokalen Ökosystem, bei denen Fraktionierungen beobachtet werden

Fig. 3: Schematic view of the fractionation steps occurring during the water fluxes within the local ecosystem

Das Blattwasser ist dasjenige Substrat, in dem die Biosynthese stattfindet. Vereinfacht kann man davon ausgehen, dass die Kohlenhydrate die stabilisotope Zusammensetzung dieses Wassers widerspiegeln (EPSTEIN et al. 1976). Dabei wird aber auch auf den Luftsaauerstoff zurückgegriffen (STERNBERG et al. 1986; LUO & STERNBERG 1992), dessen Zusammensetzung gegenüber der stabilisoto-

topen Zusammensetzung des Wassers deutlich erhöht ist (DOLE-Effekt).

Man muss auch immer damit rechnen, dass bei fast allen biochemischen Stoffwechselschritten an den Enzymen Fraktionierungen der Isotope auftreten können. So ist beim $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis zu beachten, dass die Fette ein um 3 ‰ angereichertes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis aufweisen (FOCKEN & BECKER

1998). Unter Berücksichtigung von quantitativen Schwankungen der Fette im Samen ist es deshalb ratsam, das Fett zu extrahieren, um somit stabile Messwerte zu erhalten. Die Stabilisotopen-Methode hat den Vorteil und ergänzt damit andere Verfahren, so dass die Ergebnisse nicht von Variationen in der chemischen Zusammensetzung abhängen. Daher ist dieser Extraktionsschritt dringend zu empfehlen und wird bei Agroisolab angewendet. Es hat sich zudem gezeigt, dass die abgetrennten Fette ebenfalls eine zuverlässige Information liefern. Der überwiegende Teil des Wasserstoffs ist unmittelbar an das Kohlenstoffgerüst gebunden, kann also nicht, wie der am Sauerstoff in der COH-Gruppe gebundene Wasserstoff mit dem umgebenden Wasser austauschen. Dazu kommt, dass bei bestimmten Schritten im Stoffwechsel Luft-Sauerstoff eingebaut wird (SCHMIDT et al. 2001). Die stabilisotope Zusammensetzung des Sauerstoffs der Luft weicht stark von den in der Biomasse ansonsten vorkommenden Werten ab. Da der Sauerstoff der Luft gut durchmischt ist, geht ein Teil der geografischen Information bei dessen Einbau verloren.

Auch für den Stickstoff ist zu beachten, dass man nicht einfach annehmen kann, dass der mittels Kjeldahl bestimmte Gesamt-Stickstoff des Bodens sich in der Pflanze wiederfindet (EMMETT et al. 1998; KOOPMANS et al. 1997). Die räumlich und chemisch verschiedenen Fraktionen im Boden unterscheiden sich derart, dass derzeit zwischen dem Isotopengehalt des Gesamt-Stickstoffs im Boden und dem wirklichen pflanzenverfügbaren Stickstoff kein direkter Bezug hergestellt werden kann, abgesehen von unmittelbar aufgetragenen Düngergaben. Unter pflanzenverfügbar sollte diejenige Fraktion verstanden werden, die von der Pflanze tatsächlich aufgenommen wird, und nicht die pflanzenverfügbare Fraktion, die mittels Salzextraktion ermittelt wurde und die nur die Menge der Ionen wiedergibt, die von den Bodenpartikeln abgelöst werden kann.

Für den Schwefel werden weniger deutliche Fraktionierungen in der Pflanze erwartet, da im Wesentlichen nur zwei Aminosäuren Schwefel enthalten und damit keine intensiven Umsätze zu erwarten sind (CHUKHROV et al. 1980).

3. Methodik

3.1 Messmethodik allgemein

Die natürliche Variation der stabilen Isotope ist derart gering (aber stabil), dass in den 1940er Jahren eine eigene Messmethode entwickelt werden musste, deren Grundsatz bis heute die Standardisierung und die Wiedergabe der Messwerte prägt. Die geringen Variationen konnte man zur Zeit der Entwicklung der Methode nicht absolut messen, sondern nur im direkten und ständigen Vergleich mit einer anderen Probe (Funktionsweise des NIER-Typs des Massenspektrometers). Da die Variationen gering sind und bei größeren Molekülen statistische Verteilungen berücksichtigt werden müssten, setzt man nur einfache Gase ein, bei denen aufgrund der geringen Häufigkeit eines Isotopes solche Effekte vernachlässigt werden können. Das sind Wasserstoff, Kohlendioxid, Kohlenmonoxid, Stickstoff und Schwefeldioxid. Damit werden zu den internationalen Standards eigene Laborstandards kalibriert, die jeweils vor, innerhalb und nach jedem Messlauf zur Kontrolle und Korrektur mitgemessen werden.

3.2 Pyrolyse von Sauerstoff und Wasserstoff

Bei Saatgut wird nicht die Wasserphase selbst benutzt, da durch Abgabe des Wassers und durch die Lagerung Fraktionierungen zu erwarten sind, sondern es wird der organisch gebundene Wasserstoff und Sauerstoff gemessen. Dazu ist es erforderlich, das Material bei hoher Temperatur umzusetzen. Besonders bei der Pyrolyse von Biomasse zu Kohlenmonoxid ist auf einen Ausschluss

von atmosphärischem Sauerstoff zu achten. Bisher wurde dazu ein doppelwandiges Rohr eingesetzt, das außen aus Keramik, innen aus Glas-Kohlenstoff besteht. Doch bei den erforderlichen Temperaturen oberhalb von 1300 °C steigt der Untergrund derart stark an, dass die Messung nicht mehr möglich ist. Das Doppelrohr wurde durch ein einfaches Rohr aus speziellem Siliciumcarbid ersetzt, wie es bei Hochtemperatur-Anwendungen verwendet wird. Außer der erforderlichen Dichtigkeit und damit geringem Untergrund, auch da es selbst keinen Sauerstoff enthält, kann damit auch im Kern des Hochtemperaturofens eine Temperatur von 1450 °C und mehr erreicht werden. Die geringe Wärmeleitfähigkeit ermöglicht es, die beiden Enden mit einem einfachen Laborkühler zu temperieren und damit genügend abzudichten.

3.3 Kohlenstoff und Stickstoff

Zur Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnisse werden die Messgase in einem Elementanalysator erzeugt. Im ersten Reaktionsrohr wird das Material unter Zusatz von Sauerstoff zu Kohlendioxid und Stickoxiden bei 1020 °C oxidiert. Im folgenden Rohr werden die Stickoxide bei 600 °C an elementarem Kupfer reduziert. Beide Gase müssen getrennt werden, um die Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalte mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) quantitativ bestimmen zu können. Für die IRMS (isotope ratio mass spectroscopy) ist eine quantitative Bestimmung in der Regel ohne weiteres Interesse. Dennoch müssen beide Gase mittels Gaschromatographie getrennt werden, da bei der teilweisen Zerlegung des Kohlendioxids im Massenspektrometer das entstehende Kohlenmonoxid des Stickstoffs belegt.

Die Messung erfolgt im Einzelnen wie folgt: Nachdem die Proben in den Probenhalter des Elementanalysators gefüllt wurden, gelangen sie über einen automatischen Probengeber in ein 1000 °C heißes Verbrennungsrohr. Als Trägergas und zum Entfernen der Atmosphäre wird dem System Helium (He) zugeführt. Außerdem wird noch reiner Sauerstoff

(O_2) zudosiert. Dadurch wird die Probe in der ersten Verbrennungszone (Ox) zu CO_2 und N_xO_y oxidiert.

Das Verbrennungs- oder auch Oxidationsrohr ist mit Wolframoxid und versilbertem Kobaltoxid befüllt. Das Wolframoxid dient dazu, den Kohlenstoff vollständig zu Kohlendioxid zu oxidieren. Das Kobaltoxid entfernt in der Probe vorhandene reaktive Halogene und Schwefel. Außerdem finden dort Restoxidationen statt.

Anschließend gelangt die Probe ins 650 °C heiße Reduktionsrohr (Red), welches mit Kupfergranulat befüllt ist. Dort werden die Stickoxide zu N_2 reduziert, wodurch das Kupfergranulat zu Kupferoxid umgewandelt wird. Eine darauf folgende, mit Magnesiumperchlorat gefüllte Wasserfalle bindet das bei der Verbrennung entstandene Wasser. Das Probengas wird dann in einer gepackten Säule (Porapak QS, 50/80, 3 m) im Gaschromatograph (GC) bei 50 °C aufgetrennt. Dabei eluiert der Stickstoff vor dem Kohlendioxid. Dies ist notwendig, da ansonsten das im Massenspektrometer entstehende Kohlenmonoxid die gleiche Masse aufweist wie der Stickstoff und dieses zu verfälschten Ergebnissen führt. Ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) zeigt die Peaks nach der Auftrennung.

Über ein Open-Split-System (Split) gelangt die Probe ins Massenspektrometer. Da in pflanzlichen Proben das Verhältnis von Stickstoff zu Kohlendioxid nur 1:25 beträgt, wird die CO_2 -Konzentration mittels eines Diluters (FVP) verdünnt. Der Hauptstrom ist dabei über eine Kapillare (150 μm , 10 cm) mit einem Nebenstrom verbunden. Da der Hauptstrom mit 100 ml/min eine höhere Flussrate hat als der Nebenstrom mit 50 ml/min, werden durch Drosselung des Hauptstroms nur 1/10 des Trägergases in den Nebenstrom überführt. Die Ionenströme werden gleichzeitig in für ihre Masse spezifischen Faraday-Auffängern registriert, mittels Analog-Digital-Umwandler (AD) zu einem Integrator geleitet, der die Peak-

flächen integriert und daraus die δ -Werte errechnet. Die Messanordnung der Elementanalyse (EA) und Isotopenverhältnis-

Massenspektrometrie (IRMS) ist in Abbildung 5 dargestellt.

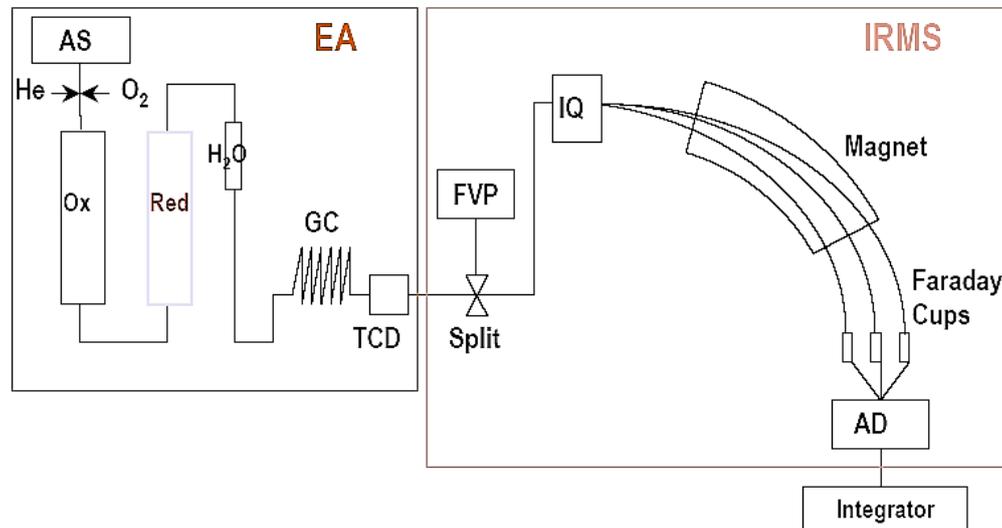


Abb. 5: Schematische Darstellung der Messanordnung für das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis; Kopplung von Elementanalysator (EA) und Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS). (AS: Autosampler; Ox: Verbrennungszone; Red: Reduktionsrohr; GC: Gaschromatograph; TCD: Wärmeleitfähigkeitsdetektor; FVP: Diluter; Split: Open-Split-System; IQ: Ionenquelle; AD: Analog-Digital-Umwandler)

Fig. 5: Arrangement for the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ratio; coupling of elemental analyser (EA) with isotope ratio mass spectrometer (IRMS).

3.4 Schwefel

Auch hier gelangen die Proben über einen automatischen Probengeber in die ca. $1020\text{ }^\circ\text{C}$ heiße Verbrennungszone. Bei der Messung des Schwefels stellt das Quarzrohr gleichzeitig das Oxidations- und das Reduktionsrohr dar.

In der Verbrennungszone wird der Schwefel in seine Oxide, SO_2 und SO_3 , überführt. Diese Oxidationen werden durch das darauf folgende Wolframoxid vervollständigt. Durch das anschließende Kupfergranulat wird das reaktive SO_3 zu SO_2 reduziert. Da das Schwefeldioxid nach Austritt aus dem Verbrennungsrohr schnell mit dem bei der Verbrennung entstandenen Wasser zu schwefliger Säure reagieren würde, folgt nach dem Verbrennungsrohr sofort eine

Wasserfalle. Dort wird das vorhandene Wasser durch Magnesiumperchlorat gebunden. Anschließend gelangt der Gasstrom in die $75\text{ }^\circ\text{C}$ heiße gepackte Teflonsäule (Porapak, 50/80, 0,8 m) eines Gaschromatographen. Dort wird das SO_2 vom ebenfalls entstandenen Stickstoff und Kohlendioxid getrennt, da diese beiden Stoffe früher eluieren. Über ein Open-Split-System erreicht die Probe den Diluter. Dieser dient dazu, die für die Messung nicht relevanten Stoffe CO_2 und N_2 vom SO_2 abzutrennen. Von dort aus wird die Probe ins Massenspektrometer geleitet, wo die beiden Massen m/z 64 für $^{32}\text{SO}_2$ und m/z 66 für $^{34}\text{SO}_2$ bestimmt werden. Nach spätestens 400 Proben muss das Verbrennungsrohr erneuert werden. Die Messanordnung ist in Abbildung 6 skizziert.

Da die gleichzeitige Messung von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel sich als störungsanfällig erwiesen hat, wird derzeit der Schwefel an einem eigenen Gerät gemessen, dessen eines Gasvolumen als früherer Bestandteil eines Doppeleinlass-

systems (Bellow) hier als Vorrat für das Referenzgas benutzt worden ist. Andererseits wird auch das $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnis in einem Open-Split-System gemessen.

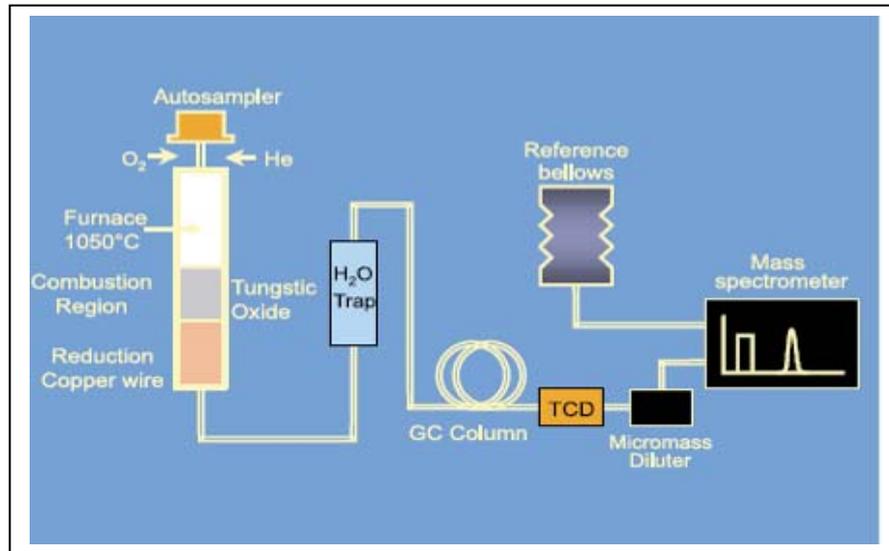


Abb. 6: Messanordnung zur separaten Messung des $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnisses mit einem Reaktionsrohr, gefüllt mit Kobaltoxid zur Oxidation und Kupferdraht zur anschließenden teilweisen Reduktion. (TCD: Wärmeleitfähigkeitsdetektor)

Fig. 6: Arrangement for the $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ratio applying only one reactor tube filled with tungstic oxide for oxidation and copper wire for subsequent reduction

3.5 Laborvergleich

In einem Laborvergleich wurden sowohl die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und die $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werte als auch der jeweilige Gehalt an Kohlenstoff und Stickstoff in Prozent zwischen Agroisotop (Jülich), dem Stabilisotopenlabor des Umweltforschungszentrums Leipzig (Dr. GEHRE) und dem Kompetenzzentrum Stabile Isotope (KOSI) der Universität Göttingen bestimmt. Dazu wurde eine Probe L-Leucin versendet. Die Reproduzierbarkeit der Stabilisotopen-Werte für jedes einzelne Labor liegen alle im international akzeptierten Bereich gemäß den Vorgaben des Proficiency-Test-Systems. Durch drei unterschiedliche Einwaage-Mengen wurde bestätigt, dass keine Inlinearitäten vorliegen. Allerdings bestehen zwischen den Isotopen

verhältnissen noch signifikante Unterschiede, die abgeglichen werden müssen. Derzeit wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Werte neu kalibriert. Das muss bei den weiteren Messungen berücksichtigt werden. Die Ergebnisse der Bestimmung der Gehalte allerdings sind von der eingesetzten Menge an Substanz abhängig (Einwaagen: 0,3 mg, 0,7 mg und 2,3 mg). Wird dies nicht berücksichtigt, ist ein Fehler bei der Bestimmung des Gehaltes absolut von 2 Gewichts-% beim Kohlenstoff und 0,8 Gewichts-% beim Stickstoff zu erwarten. Wird die Einwaage in vergleichbarer Menge gehalten, so kann er in den Routinemessungen mit 1 Gewichts-% für den Kohlenstoff und 0,4 Gewichts-% für den Stickstoff abgeschätzt werden.

Für den Laborvergleich wurde auch einzelbaumweise geerntetes Saatgut von Rotbuchen (Samen ohne Samenschalen) vom Koordinator des Verbundprojektes anonym an die drei Laboratorien versandt. Es sollten sowohl die Stabilisotopenwerte als auch die Gehalte von C und N ermittelt werden. Abbildung 7 gibt die $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werte wieder, die eine Gruppierung von jeweils 5 Einzelbäumen aus 5 Beständen erkennen lässt. Die zwischen den Laboratorien beobachteten Abweichungen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werte liegen in der Regel im ein- bis zwei-

fachen Bereich der aus dem Proficiency-Test-System gewonnenen Streuung der Messung und sind damit als übereinstimmend anzusehen. Die Gehalte streuten dagegen stärker (Kohlenstoff bis zu 1 Gewichts-%, Stickstoff $\leq 0,5\%$) und sind für Vergleiche zwischen verschiedenen Laboratorien nicht brauchbar. Die Gehalte sind nicht exakt einzuordnen, da hier im Gegensatz zur Stabilisotopen-Messung Inhomogenitäten des Materials stärker in das Ergebnis eingehen können.

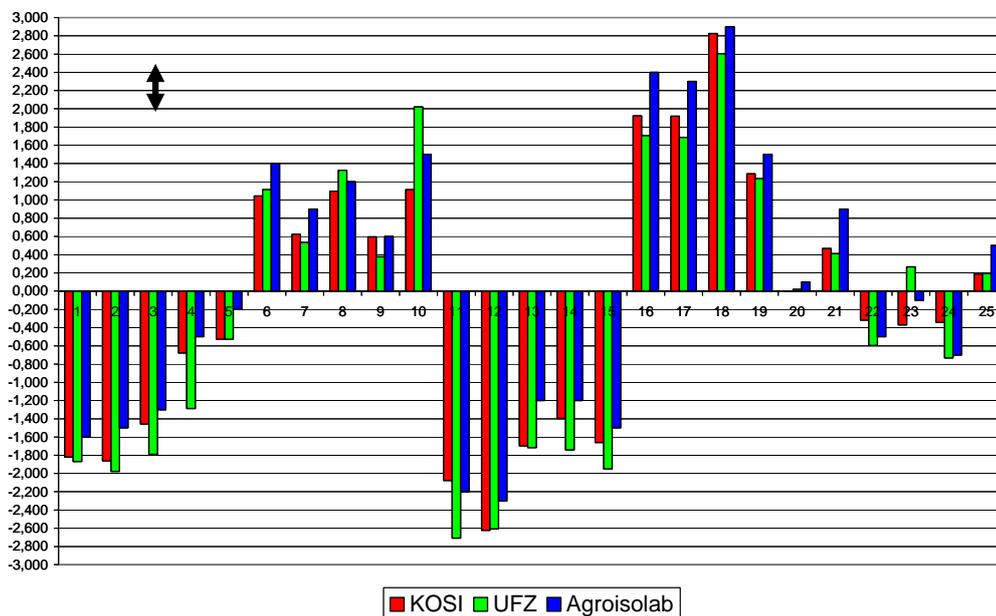


Abb. 7: Laborvergleich zwischen KOSI Göttingen, UFZ Leipzig und Agroisolab Jülich am Beispiel von 25 Proben der Rotbuche aus 5 Beständen: $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ Ergebnisse. Der Doppelpfeil gibt die messtechnische Variation an.

Fig. 7: Comparison of results between the same beech samples (25 samples out of 5 stands) measured at KOSI Göttingen, UFZ Leipzig and Agroisolab Jülich: $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ data. The arrow demonstrates the technically expected scattering.

4. Beispiele

Anwendungen werden in den anderen Beiträgen des Tagungsbandes besprochen. Hier sollen nur zwei Beispiele gegeben werden. Auf den Vergleich zwischen zwei Partien wird von KONNERT et al. (S. 85) eingegangen.

Ein wichtiger Beitrag zur Absicherung der Identität von Forstsaatgut könnte geleistet werden, wenn zwischen dem Saatgut, das nach der Ernte aus einem Bestand abtransportiert wird und den Organen der am Ort verbliebenen Erntebäume eine enge Korrelation gäbe, wenn also selbst in einem beernteten Bestand noch die Isotopensignatur

anhand der Knospen und Äste nachprüfbar wäre. Dies wird beispielhaft anhand von Proben von Bergahorn aus Bad Königshofen in Abbildung 8 im Vergleich der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Werte von Knospen und Samen demonstriert.

Im zweiten Beispiel (Abb. 9) werden die Ergebnisse von Proben der Douglasien von einer Samenplantage des Forstamtes Dannendorf vorgestellt. Untersucht wurden die aus verklonten Sämlingen verschiedener Her-

künfte erwachsenen Bäume. Deren Genetik repräsentiert das Ausgangsmaterial, die stabilisotope Zusammensetzung ist der „isotope Fingerabdruck“ des Ortes, an dem die Bäume angezogen wurden. Zwischen den Herkünften konnten mit Isoenzym-Markern Unterschiede festgestellt werden. Der „isotope Fingerabdruck“ ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Werte) erbrachte erwartungsgemäß keine Unterschiede, da alle Pflanzen von einer ursprünglich landwirtschaftlich genutzten Fläche, stammen.

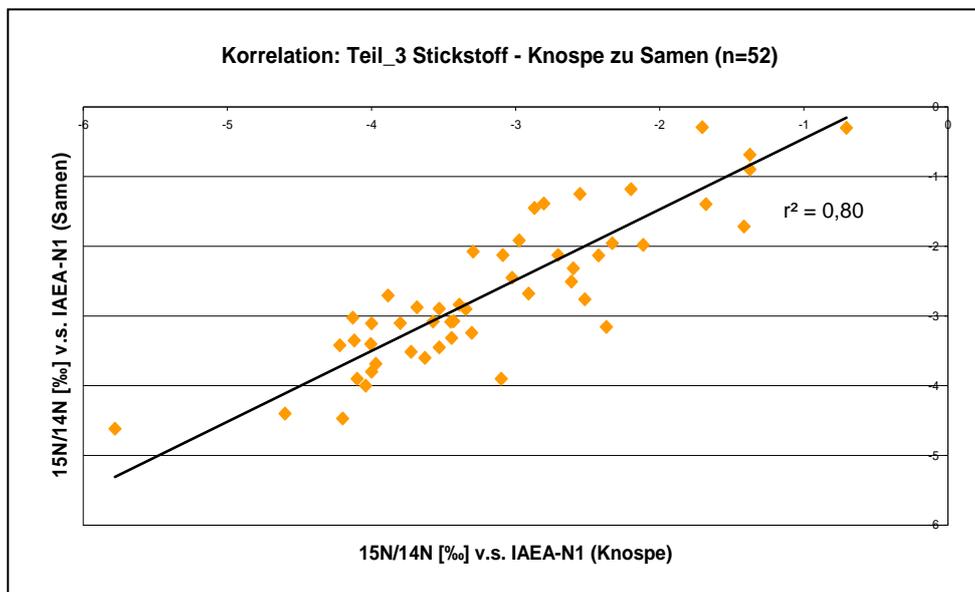


Abb. 8: Korrelation der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnisse zwischen den Knospen und dem Samen von Bergahorn-Einzelbäumen aus Bad Königshofen / Deutschland

Fig. 8: Correlation of the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios between bud and seed of acorn collected from single trees of maple at Bad Königshofen / Germany

5. Diskussion

Die stabilisotope Zusammensetzung von Nahrungsmitteln dient schon seit Längerem als anerkannte Methode zum Nachweis der Identität und auch der Herkunft von Proben. Sie wird von der Überwachung routinemäßig eingesetzt und ist durch Methoden der Europäischen Union (EU 1998) sowie der American Association of Official Analytical Chemists auch anerkannt. Dabei ist sie auch in Gerichtsverfahren erfolgreich eingesetzt worden (Übersicht bei FÖRSTEL 2007). Als

Beispiel für die Überprüfung der geografischen Herkunft sei die Arbeit von BONER & FÖRSTEL (2004) zitiert. Zu Zeiten der BSE-Krise ging es um die Absicherung der Herkunft von Rindfleisch. Dabei können sicherlich eine Reihe von Ergebnissen sinngemäß auf Forstsaatgut übertragen werden, z. B. von Getreide als Saatgut. Um gerichtsfeste Methoden und Datenbanken zu erhalten wurde auch FIRMS network (Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry) gegrün-

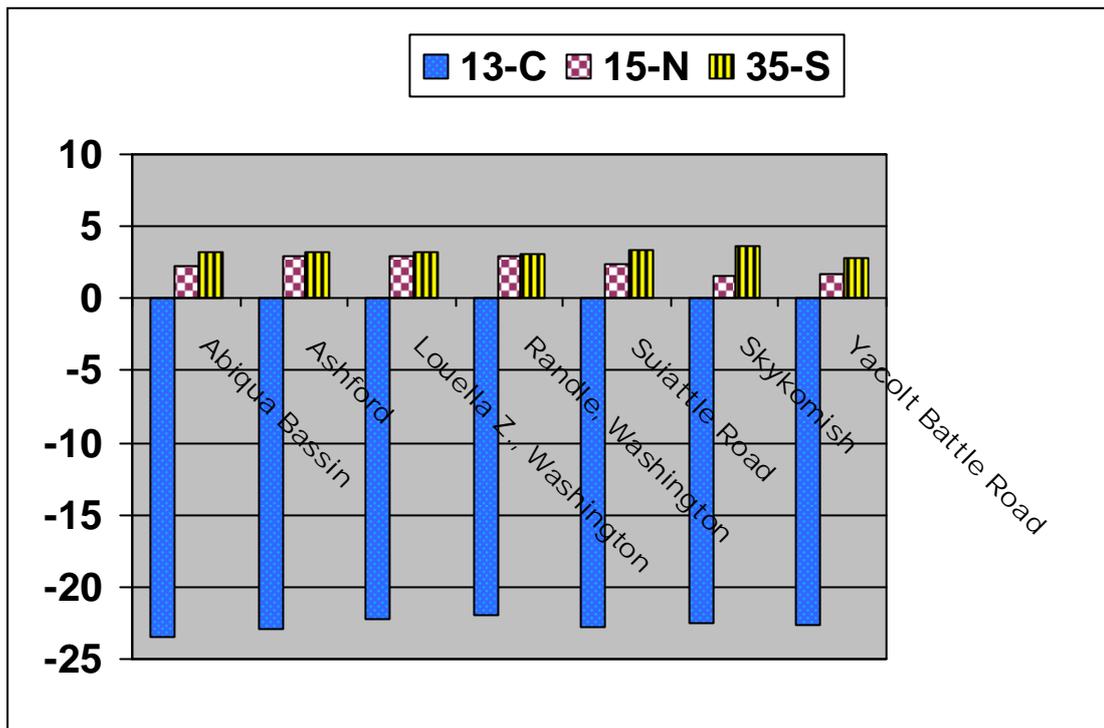


Abb. 9: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ - und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Werte von einer Samenplantage des Forstamtes Danndorf mit verklonten Sämlingen von Douglasien, amerikanischer Herkunft. Unabhängig von der genetischen Ausstattung wird die stabilisotope Zusammensetzung durch die gemeinsame Umgebung bestimmt.

Fig. 9: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ - and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -results from a seed plantation at forest district Danndorf established with cloned seedlings of American origin. Independently of the genetic differences the composition of stable isotopes reflects the common environment.

det, das vom Forensic Explosives Laboratory Dstl Fort Halstead UK international betreut wird. Derzeit werden verschiedene Methoden, auch andere als die Stabilisotopen-Anwendung, wie chemometrische und statistische Verfahren, ein einem von der EU geförderten länderübergreifenden Projekt TRACE untersucht. Ebenso findet die Methode in der Ökologie zunehmend Anwendung, so für die Verfolgung von Nahrungsketten oder Tierwanderungen.

Proben aus dem Bereich Forst sind vor allem im Rahmen der Diskussion um die Waldschäden untersucht worden (GEBAUER & SCHULZE 1991; GEBAUER & DIETRICH 1993). Daneben wurde die Methode der Stabilisotopen-Messung schon vor dieser Zeit in der Paläoklimatologie eingesetzt. Eine der ersten Arbeiten hat SCHIEGL (1974)

in Nature veröffentlicht. 1976 hat die Gruppe um EPSTEIN mit drei Veröffentlichungen die Anwendung weiter etabliert (EPSTEIN & YAPP 1976; EPSTEIN et al. 1976a, 1976b), ebenso sprachen LIBBY et al. (1976) Bäume als „Isotopenthermometer“ an. LEAVITT & LONG (1984, 1988) haben vor allem die Strategie der Probenahme verfeinert.

Auf die umfangreiche Literatur zu Baumringen kann hier nicht weiter eingegangen werden. Es sei nur auf die Zusammenstellung im Vergleich von dendrochronologischen und stabilisotopen Daten von HANECA et al. (2006) und die Arbeit von RODEN & EHLERINGER (2000) hingewiesen. Scheinbar im Widerspruch zu einigen Ausführungen steht der von RODEN & EHLERINGER (2000) berichtete Befund,

dass in einem Canyon mit Temperaturgefälle lediglich das Isotopenverhältnis des Wassers, das allein von der Gipfelregion stammt, die Isotopenwerte in der Zellulose der Bäume bestimmt. Das aber bestätigt die Hypothese, dass nicht die Temperatur selbst, sondern die stabilisotope Zusammensetzung des Wassers in der Umgebung der Pflanze

die Werte in ihrer Biomasse der entscheidende Parameter ist. Die Temperatur ist nur die treibende Kraft für die Bewegung des Wasserdampfes in der Luft, von Niederschlag und Verdunstung. Somit wird auch hiermit bestätigt, dass die stabilisotopen Werte ein im Wesentlichen physikalisch bestimmter Parameter sind.

6. Schlussfolgerungen

Die natürliche Variation der stabilen Isotope der „Bioelemente“ (Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel) erlaubt es, die Übereinstimmung von verschiedenen Partien zu überprüfen. Da jede Partie, auch von Saatgut eine bestimmte Zusammensetzung der stabilen Isotope der sie bildenden Elemente aufweist, spricht man auch von einem „isotopen Fingerabdruck“. Er wird bei der Bildung von Biomasse dieser aus dem Material der Umgebung aufgeprägt und kann nicht mehr verändert werden.

Da die Biomasse die stabilisotope Zusammensetzung der Umgebung widerspiegelt, in der sie gebildet wird, verliert sich diese Eigenschaft vom Saatgut bei der Aussaat und Anzucht an einem anderen Ort. Genetische Methoden, die dann weiterhin anwendbar sind, die aber nicht die physikalischen Bedingungen der Umgebung widerspiegeln und die Stabilisotopen-Methode, die genau das leistet, sollten sich daher gut ergänzen.

Nach den intensiven Erfahrungen in der Anwendung der Stabilisotopen-Methode in der Kontrolle von Lebensmitteln sollte es mit Hilfe der stabilen Isotope möglich sein, auch die geografische Herkunft überprüfen zu können.

Besonderes Interesse an der Methode besteht auch daran, dass am beernteten Bestand noch das Isotopenmuster bestimmt und mit dem angelieferten Saatgut verglichen werden kann. Dazu muss aber die Variation

im Bestand noch intensiver auf ihre Größe und auf ihre Ursachen hin untersucht werden, da die statistische Variation innerhalb eines Bestandes die Anwendbarkeit der Methode begrenzt. Dazu sind die Ergebnisse der pflanzenphysiologischen Arbeiten verstärkt in die Betrachtung der Anwendbarkeit zu integrieren und daraufhin zu untersuchen. Dabei müssen alle „Bioelemente“ mit einbezogen werden, was bei den meisten Arten für das Saatgut aufgrund ihrer biochemischen Zusammensetzung möglich ist. Bei anderen Organen der Pflanze, besonders beim Holzteil, erfordern die geringen Gehalte an Stickstoff und Schwefel den Einsatz neu entwickelter Verfahren.

Dabei ist bisher, abgesehen von der sehr summarischen Extraktion von Fettsubstanzen, noch keine weitere Differenzierung zwischen den verschiedenen chemischen Bestandteilen erfolgt. In der Paläoklimatologie hat man die Cellulose isoliert und sogar die austauschbaren Wasserstoffatome am Zuckermolekül durch Nitrierung abgetrennt. Diese auch nach heutiger Analytik recht robusten Verfahren sind im Wesentlichen der Papierindustrie entlehnt worden. Dabei gelang es aber erst in den letzten Jahren den organisch-gebundenen Anteil an Wasserstoff und Sauerstoff mittels Hochtemperaturpyrolyse ausreichend frei vom störenden Untergrund zuverlässig zu messen. Agroisolab überprüft derzeit, inwieweit diese Technik dazu einsetzbar ist, die Herkunft von Holz aus illegaler Holzgewinnung einzusetzen.

Dies ist bei Saatgut einfacher, da hier in der Regel ausreichend Material verfügbar ist. Es kann daher auch getestet werden, ob entweder der Einsatz des gesamten Materials einer Probe (die sog. bulk-Analyse) oder die

Isolierung und Messung ausgewählter Inhaltsstoffe der besser gangbare Weg sind. Dazu können Erfahrungen aus der Analytik in den Bereichen Lebensmittel, Forensik, Physiologie und Ökologie beitragen.

Literatur

- BONER, M.; FÖRSTEL, H. (2004): Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 301-310.
- BOWEN, G.J. (2002): Spatial distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in meteoric precipitation. *Geology* 30: 315-318.
- BURK, R.L.; STUIVER, M. (1981): Oxygen isotope ratios in trees reflect mean annual temperature and humidity. *Science* 211: 1417-1419.
- CHUKHROV, F.V.; ERMILOVA, M.P.; CHURIKOV, V.S.; NOSIK, L.P. (1980): The isotopic composition of plant sulphur. *Organical Geochemistry* 2: 69-75.
- CRAIG, H. (1961): Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133: 1702-1703.
- DANSGAARD, W. (1964): Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16: 436-467.
- DAWSON, T.E.; EHLERINGER, J.R. (1991): Streamside trees that do not use stream water. *Nature* 350: 335-336.
- DONGMANN, G.; FÖRSTEL, H.; WAGENER, K. (1972): ^{18}O -rich oxygen from land photosynthesis. *Nature (New Biology)* 240: 127-128.
- DONGMANN, G.; NÜRNBERG, H.W.; FÖRSTEL, H.; WAGENER, K. (1974): On the enrichment of H_2^{18}O in the leaves of transpiring plants. *Radiation and Environmental Biophysics* 11: 41-52.
- EMMETT, B.A.; KJØNAAS, J.O.; GUNDERSEN, P.; KOOPMANN, C.J.; TIETEMA, A.; SLEEP, D. (1998): Natural abundance of ^{15}N in forests across a nitrogen deposition gradient. *Forest Ecology Management* 101: 9-18.
- EPSTEIN, S.; YAPP, C.J. (1976): Climatic implications of the D/H ratio of hydrogen in C-H groups in tree ring cellulose- *Earth Planetary Science Letters* 30: 252-261.
- EPSTEIN, S.; YAPP, C.J.; HALL, J.H. (1976a): The determination of the D/H ratio of non-exchangable hydrogen in cellulose extracted from aquatic and land plants. *Earth Planetary Science Letters* 30: 241-251.
- EPSTEIN, S.; THOMPSON, P.; YAPP, C.J. (1976b): Oxygen and hydrogen isotopic ratios in plant cellulose. *Science* 198: 1209-1215.
- EU European Commission (1998): Food Authenticity – Issues and Methodology. Concerted Action AIR3 – CT94 – 2452, ISBN 2-9512051-0-4.
- FARQUHAR, G.D.; LLOYD, J. (1993): Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. In J.R. EHLERINGER, A.E. HALL, G.H. FARQUHAR (eds.): *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Academic Press, San Diego: 47-70.
- FOCKEN, U.; BECKER, K. (1998): Metabolic fractionation of stable carbon isotopes: implications of different proximate compositions for studies of the aquatic food web using ^{13}C data. *Oecologia* 115: 337-343.
- FÖRSTEL, H.; PUTRAL, A.; SCHLESER, G.; LIETH, H. (1975): The world pattern of oxygen-18 in rainwater and its importance in understanding the biogeochemical oxygen cycle. In IAEA (ed.): *FAO/IAEA Joint Symposium on Isotope Ratios as Pollutant Source and Behaviour Indicators*, IAEA, Wien: 3-20.

- FÖRSTEL, H.; HÜTZEN, H. (1983): Oxygen isotope ratios in German groundwater. *Nature* 303: 614-616.
- FÖRSTEL, H. (1978): The enrichment of ^{18}O in leaf water under natural conditions. *Radiation and Environmental Biophysics* 15: 323-344.
- FÖRSTEL, H. (2007): The natural fingerprint of stable isotopes – use of IRMS to test food authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388: 541-544.
- FRIEDMAN, I. (1953): Deuterium content of natural waters and other substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 4: 89-103.
- GEBAUER, G.; SCHULZE, E.D. (1991): Carbon and nitrogen isotope ratios in different compartments of a healthy and a declining *Picea abies* forest in the Fichtelgebirge, NE Bavaria. *Oecologia* 87: 198-207.
- GEBAUER, G.; DIETRICH, P. (1993): Nitrogen isotope ratios in different compartments of a mixed stand of spruce, larch and beech trees and of understorey vegetation including fungi. *Isotopes*. In: *Environmental and Health Studies* 29: 35-44.
- HANECA, K.; VERHEYDEN, A.; BEECKMAN, H.; GÄRTNER, H.; HELLE, G.; SCHLESER, G.H. (2006): TRACE – Tree Rings in Archaeology, Climatology and Ecology. *Schriftenreihe des Forschungszentrums Jülich, Reihe Environment, Vol 74*.
- HATCH, M.D.; SLACK, C.R. (1966): Crassulacean acid metabolism. Photosynthesis by sugar cane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal* 101: 103-111.
- IAEA International Atomic Energy Agency (ed.) (1969-1994): Environmental isotope data – World survey of isotope concentration in precipitation. IAEA, Vienna, No. 1-10.
- IAEA International Atomic Energy Agency IAEA (1995): Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements. IAEA-TECDOC-825, Vienna.
- KOHL, D.H.; SHAERER, G. (1980): Isotopic fractionation associated with symbiotic N_2 fixation and uptake of NO_3^- by plants. *Plant Physiology* 66: 51-56.
- KOOPMANS, C.J.; van DAM, D.; TIETEMA, A. (1997): Natural ^{15}N abundance in two nitrogen saturated forest systems. *Oecologia* 111: 470-480.
- LEAVITT, S.W.; LONG, A. (1984): Sampling strategy for stable carbon isotope analysis of tree rings in pine. *Nature* 311: 145-147.
- LEAVITT, S.W.; LONG, A. (1988): Intertree variability of the $\delta^{13}\text{C}$ in tree rings. In P.W. RUNDEL, J.R. EHLERINGER, K.A. NAGY (eds.): *Stable isotopes in ecological research*. Springer, Berlin NY Heidelberg: 95-104.
- LIBBY, L.M.; PANDOLFI, L.J.; PAYTON, P.H.; ILL, J.M.; BECKER, B.; GIERTZ-SIENBENLIST, V. (1976): Isotopic tree thermometers. *Nature* 261: 284-288.
- LUO, Y.H.; STERNBERG, L. (1992): Hydrogen and oxygen isotope fractionation during heterotrophic cellulose synthesis. *Journal Experimental Botany* 43: 47-50.
- O'LEARY, M.H. (1988): Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience* 38: 328-336.
- OSMOND, C.B. (1978): Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology* 29: 379-414.
- RODEN, J.S.; EHLERINGER, J.R. (2000): There is no temperature dependence of net biochemical fractionation of hydrogen and oxygen isotopes in tree-ring cellulose. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 36: 303-317.
- SCHIEGL, W.E. (1974): Climatic significance of deuterium abundance in growth rings of *Picea*. *Nature* 251: 582-584.
- SCHMIDT, H.-L.; WERNER, R.A.; ROSSMANN, A. (2001): ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry* 58: 9-32.
- STERNBERG, L.S.L.; DeNIRO, M.J.; SAVIDGE, R.A. (1986): Oxygen isotope exchange between metabolites and water during biochemical reactions leading to cellulose synthesis. *Plant Physiology* 82: 423-427.

Anschrift des Autors:

Prof. Dr. HILMAR FÖRSTEL
Agroisolab GmbH
Karl-Heinz-Beckurts-Str. 13, 52428 Jülich, Deutschland

Umwelt- und pflanzenbedingte Variation von Stabilisotopen

Wilfried Steiner und Bernhard Hosius

Zusammenfassung

Stabilisotopen lassen sich zur Überprüfung von Produktangaben, z. B. dem Erzeugungsort, einsetzen. Ob sie sich auch für die Herkunftskontrolle bei forstlichem Vermehrungsgut einsetzen lassen, wurde im Rahmen eines BMBF-Projektes untersucht. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Variation der Stabilisotopen-Zusammensetzung (ausgedrückt als δ -Werte) innerhalb von Erntebeständen (Samenplantagen). Es zeigte sich eine sehr große Variation zwischen Einzelbaumabsaaten und zwischen Reifejahren. Die Korrelationen der δ -Werte verschiedener Gewebeteile einzelner Bäume waren nur sehr schwach. Bei Vergleichen zwischen Genotypen (Klonen) und zwischen Ramets eines Klons war kein Einfluss des Genotyps auf die δ -Werte erkennbar. Ergebnisse von Douglasien- und Eichen-Bestandesabsaaten lassen kein Muster erkennen, mit dem eine regionalspezifische Zuordnung innerhalb Deutschlands möglich wäre. Für die Herkunftskontrolle bedeutet die hohe Variabilität innerhalb von Beständen, dass sich je nach Erntejahr- und Ernteverlauf unterschiedliche Werte ergeben können. Eine Zuordnung von δ -Werten zu Standorten ist nicht mit der für Deutschland erforderlichen Auflösung möglich. Die Verwendung von Stabilisotopen für Zwecke der Herkunftssicherung bedarf daher eines Referenzprobensystems, wie es für den Einsatz genetischer Methoden bereits üblich ist.

Schlagwörter: Stabilisotopen, Variabilität, Herkunftskontrolle, Genetik, Samenplantagen

Environmental and genetic effects on the variation of stable isotopes

Abstract

Stable isotopes are used for verification of product specifications, e. g. production place. A BMBF funded project evaluated their applicability to provenance control of forest reproductive material. Emphasis of the present work is on analyses of the variation of the composition of stable isotopes (expressed by δ -values) within seed harvest stands (seed orchards). A big variation was shown between single tree seed lots and between ripening years. The correlations of δ -values of different tissues of single trees have been very weak. The comparison of different genotypes (clones) and of ramets of the same genotype did not reveal any genetic impact on δ -values. Results of seed lots of Douglas fir and oak stands did not show a geographic pattern within Germany. According to the high variability within seed stands, different δ -values are to be expected for different harvesting years and differing harvesting processes. A geographic mapping of δ -values within Germany is not possible with the fine scale needed. The use of stable isotopes for ensuring provenance security therefore has to rely on a system of reference samples as it is already in use for the application of genetic methods.

Key words: stable isotopes, variability, provenance control, genetics, seed orchards

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Herkunft und Herkunftssicherheit

Die Bedeutung der Herkunft von forstlichem Vermehrungsgut für Stabilität und Ertrag wird immer wieder betont, so auch im einleitenden Aufsatz dieses Tagungsbandes (JANBEN 2008). Die Modellkalkulationen von KLEINSCHMIT (2002) in älteren Herkunftsversuchen belegen eindrucksvoll das enorme ökonomische Potenzial, das in der Wahl der richtigen Herkunft liegt: 50 % höhere bzw. 40 % geringere Deckungsbeiträge gegenüber dem Versuchsmittel sind bei Buche und Eiche möglich.

Gleichwohl zeigt die Erfahrung, dass der Herkunftswahl in der Forstpraxis häufig keine entsprechend hohe Bedeutung beigegeben wird. Dies mag auch daran liegen, dass die Herkunftsangaben durch den Abnehmer nicht überprüft werden können. Für eine erfolgreiche Umsetzung der Ergebnisse der Herkunftsforschung, die ihren Niederschlag in Herkunftsempfehlungen findet, sind daher Mechanismen zur Gewährleistung der Herkunftssicherheit erforderlich.

Neben dem engeren forstlichen Interesse hat zunehmend auch der Naturschutz Interesse an Fragen der Herkunft und der Herkunftskontrolle, um z. B. bei Ausgleichs- und Ersatzmaßnahmen gezielt Gehölze regionaler Herkunft verwenden zu können (z. B. BMVEL 2003; SEITZ & KOWARIK 2003; SEITZ et al. 2007).

Eine verbesserte Herkunftssicherheit mindert die Gefahr der Verwendung ungeeigneten Saat- und Pflanzgutes und kommt damit dem Wald und der freien Landschaft insgesamt zu Gute. Auf dem Markt für Vermehrungsgut von Bäumen und Sträuchern werden die Möglichkeiten für fehlerhafte Angaben und daraus resultierender Wettbewerbsverzerrung reduziert.

1.2 Methoden und Verfahren der Herkunftssicherheit

Es gibt eine Reihe von Methoden, die heute routinemäßig bei der Überprüfung einzelner Partien von Saat- oder Pflanzgut eingesetzt werden können:

- Das Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) gibt durch seine umfangreichen Dokumentationspflichten von der Saatguternte bis zur Pflanzenauslieferung die Legitimation für Überprüfungen. Angaben der Erntemengen in Verbindung mit Angaben zur äußeren Beschaffenheit (Tausendkorngewicht, Reinheit) und zur Keimfähigkeit erlauben Mengenabschätzungen und damit Plausibilitätsprüfungen.
- Über Artbestimmungen (insbesondere bei Eiche) werden nach wie vor immer wieder unzutreffende Angaben aufgedeckt.
- Genetische Untersuchungen haben in ihrer Bedeutung für Kontrollzwecke in den letzten 20 Jahren stetig an Bedeutung gewonnen, wobei neben den klassischen Isoenzymanalysen zunehmend DNA-Techniken zum Einsatz kommen.

Insbesondere für die genetischen Methoden gilt, dass sie in der Regel in ein Verfahren integriert sein müssen, um eine Herkunftsangabe überprüfen zu können. Die Kenntnis genetischer Merkmale allein reicht für eine Herkunftszuordnung meist nicht aus, sondern üblicherweise wird die Übereinstimmung einer Probe mit einer Referenzprobe überprüft. Auf dem Prinzip des Vergleichs mit Referenzproben wurden Zertifizierungssysteme wie z. B. das in Süddeutschland seit 2002 eingeführte ZÜF-System aufgebaut (KONNERT et al. 2008; WEZEL 2008).

1.3 Stabilisotopen als geeignete Methode für die Herkunftssicherheit?

Die Untersuchung von Stabilisotopen wird schon seit längerem in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie zur Überprüfung von Herkunftsangaben eingesetzt (FÖRSTEL 2008), auch für Holz wird sie mittlerweile angewandt (FÖRSTEL et al. 2008).

Die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode für die Herkunftsüberprüfung forstlichen Vermehrungsgutes wurden im Rahmen eines Projektes untersucht, dessen Ergebnisse in diesem Tagungsband zusammengefasst sind. Das Prinzip dieser Methode wird im Beitrag von FÖRSTEL (2008) dargestellt, auch die im Folgenden verwendeten δ -Werte als quantitatives Maß für die Stabilisotopen-Zusammensetzung einer Untersuchungsprobe werden dort erläutert.

2. Fragestellung und Untersuchungsansatz

Wünschenswert wäre die Möglichkeit, Untersuchungsproben möglichst genau einer geografischen Lage, im Idealfall einer konkreten Beerntungseinheit zuordnen zu können. Dies setzt aber das Vorliegen hochspezifischer Verteilungsmuster von Stabilisotopen voraus. Um eine Vorstellung über die tatsächlich beobachtbare geografische Variabilität zu erhalten, wurden Bestandesabsaaten untersucht.

Wie stabil und reproduzierbar die δ -Werte für einen Erntebestand sind, hängt stark von der Variabilität innerhalb dieses Erntebestandes ab. Um diese extrem kleinräumige Variation zu erfassen, werden Vergleiche zwischen Saatgutpartien verschiedener Bestandteile, verschiedener Einzelbäume und verschiedener Reifejahre untersucht.

Die Untersuchung verschiedener Gewebeteile derselben Pflanze sowie von Saatgut verschiedener Genotypen (Klone) und verschiedener Ramets (derselben Genotypen) soll Informationen liefern, ob neben der Umwelt auch pflanzeigene Einflüsse auf die Stabilisotopen-Zusammensetzung erkennbar sind.

3. Material und Methoden

3.1 Bestandesabsaaten

Bestandesabsaaten standen vor allem von den Baumarten Eiche und Douglasie zur Verfügung. Sie stammten aus kommerziellen Beerntungen und wurden mit Zustimmung der Eigentümer anonymisiert und nur mit geografischen Angaben für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung gestellt.

3.2 Samenplantagen

Die Untersuchung der kleinräumigen Variation wurde auf Samenplantagen durchgeführt. Samenplantagen können als Modellpopulationen für Saatguterntebestände angesehen werden. Sie bieten darüber hinaus folgende Vorteile:

- Es gibt weniger Konkurrenz, da die Abstände der Einzelbäume relativ groß sind und auf gute Fruktifikationsbedingungen geachtet wird;
- die Standortbedingungen innerhalb einer Plantage sind in der Regel homogener als in normalen Beständen;
- die einzelbaumweise Beerntung ist einfacher durchzuführen;
- und vor allem bieten Samenplantagen für einzelne Genotypen mehrfache identische Wiederholungen (Ramets).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Samenplantagen, auf die im Folgenden Bezug genommen wird. Die Eschen- und Douglasien-Samenplantagen sind noch nicht amtlich zugelassen, die Traubeneichen-Samenplantage ist als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Geprüftem Vermehrungsgut (Registernummer 03 1 81807 001 4) zugelassen.

3.3 Genetische Inventuren

Alle in die Untersuchung einbezogenen Samenplantagen wurden zuvor einer genetischen Inventur mittels Isoenzymanalysen unterzogen. Die Untersuchungsmethoden entsprachen im Wesentlichen den Empfeh-

lungen von KONNERT et al. (2004a, b, c). Die Untersuchungen dienten der Überprüfung der Klonidentitäten. Wenn Abweichungen erkannt wurden, welche durch Verwechslungen in der Anzucht- oder Anlagephase sowie durch durchgewachsene Unterlagen möglich sind, wurden die abweichenden Individuen für die Entnahme vorgeesehen und bei der Untersuchung zu möglichen genetischen Effekten nicht berücksichtigt.

Insgesamt zeigten die genetischen Untersuchungen nur zu einem relativ geringen An-

teil von wenigen Prozent Widersprüche zu den postulierten Klonzugehörigkeiten auf.

3.4 Untersuchung von Stabilisotopen

Alle Analysenwerte von Stabilisotopen wurden im Rahmen des Projektes von der Firma Agroisolab nach einer Fettextraktion der Proben mit Dichlormethan gewonnen, sie entsprechen somit der fettfreien Partition. Auf die Trennung von Samen und Samenschale wurde verzichtet. Die Verarbeitung und Interpretation der von Agroisolab gelieferten Daten erfolgte durch die Autoren.

Tabelle 1: Beschreibung der in die Untersuchungen einbezogenen Samenplantagen
Table 1: Description of the investigated seed orchards

Baumart	Douglasie	Traubeneiche	Esche
Bezeichnung	„Danndorf“	„Berkel“	„Grohnde“
Anlagejahr	1992	1955	1984
Größe (ha)	4,6	1,0	1,1
Anzahl Klone	281	40	45
Anz. Individuen	687	110	329
Lage	Nieders. Forstamt Dann-dorf, Revier Zum Giebel, Abt. 203	Nieders. Forstamt Lie-benburg, Revier Haus Escherde, Abt. 2076	Nieders. Forstamt Olden-dorf; Revier Wilmeröder-berg, Abt. 132
Ausgangsmaterial	Stecklinge; aus Züchtungsprogramm mit überwiegend nordamerikanischen Originalherkünften ausgewählte juvenile Plusbaum-Stecklinge	Pfropflinge von Plus-bäumen aus Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Hessen, Rheinland-Pfalz	Pfropflinge von Plus-bäumen aus Nordrhein-Westfalen
Untersuchungen von Stabilisotopen	76 Einzelbaumabssaten von 55 Klonen (Reifejahr 2004)	86 Einzelbaumabssaten von 35 Klonen (Reifejahr 2005); 80 Einzelbaumabssaten von 33 Klonen (Reifejahr 2006)	37 Einzelbaumabssaten von 6 Klonen (Reifejahr 2006); Blatt- und Zweigproben von je 9 Bäumen (3 Klone) (Erntejahr 2006)

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Umweltbedingte Variation

4.1.1 Verschiedene Erntebestände

Eiche

Saatgutproben von Stiel- und Traubeneichen aus der Beerntung 2006 wurden als Bestan-

desmischproben untersucht. Das Ergebnis für zwei Elemente (Stickstoff und Kohlenstoff) ist in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

In Abbildung 1 lässt sich zwar eine deutliche Differenzierung zwischen den Arten erkennen, allerdings sind die δ -Werte nicht überlappungsfrei und daher für eine Überprüfung

der Artzugehörigkeit nicht zu verwenden. Es dürften überwiegend die unterschiedlichen Standorte der beiden Arten sein, die sich hier

in getrennten Schwerpunkten auch bei den Stabilisotopen widerspiegeln.

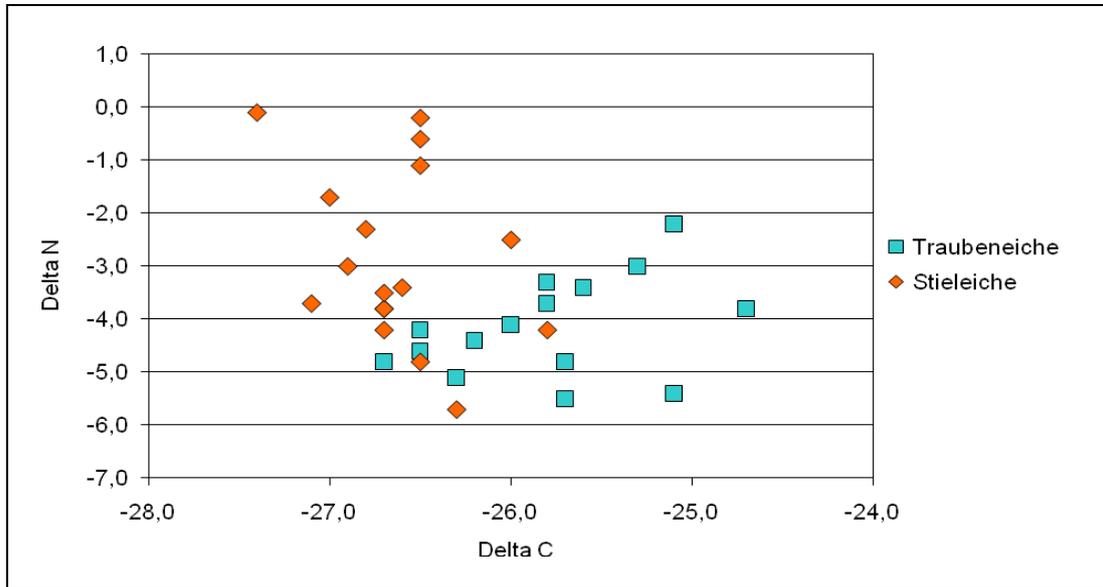


Abb. 1: δ -Werte für Kohlenstoff (C) und Stickstoff (N) von Bestandes-Mischproben aus Beerntungen deutscher Eichenbestände (2006). Die Bestandsernten zeigen eine Variation entsprechend der Artzugehörigkeit: Stieleiche (18 Bestände) – Traubeneiche (16 Bestände).

Fig. 1: δ -values of carbon (C) and nitrogen (N) of seed mixtures of harvested German oak stands (2006). The harvested seedlots of stands exhibited a variation according to species: pedunculate oak (18 stands) - sessile oak (16 stands).

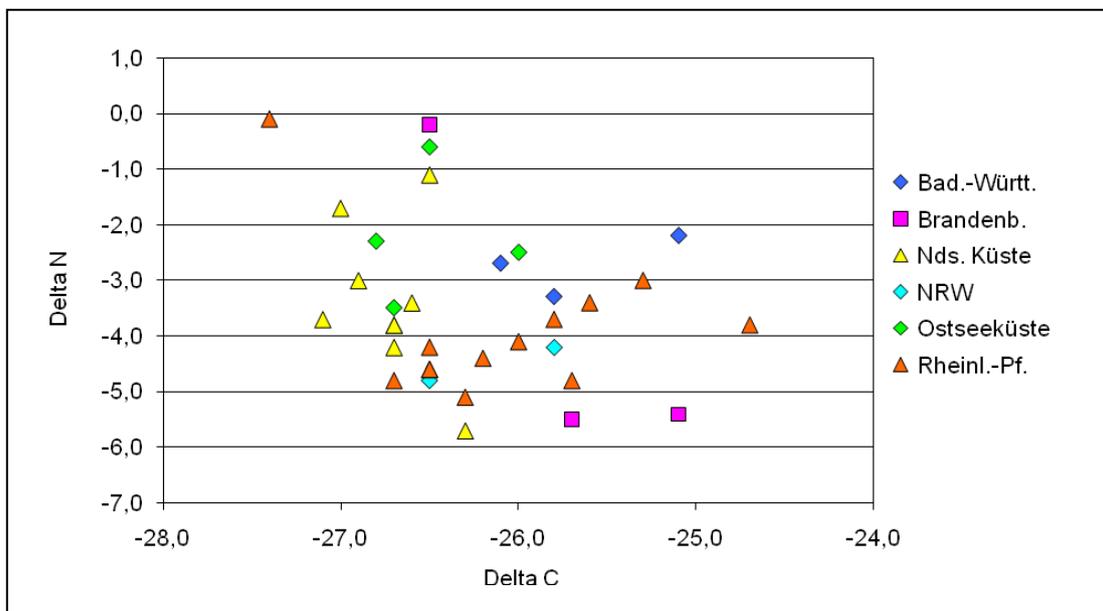


Abb. 2: Regionale Variation der Samen von Stiel- und Traubeneichenbeständen (Material s. Abb. 1)

Fig. 2: Regional variation of seedlots from stands of pedunculate and sessile oak (material see Fig. 1)

In Abbildung 2 werden dieselben Daten nach geografischen Großräumen gruppiert dargestellt. Ein deutlich erkennbares geografisches Verteilungsmuster gibt es nicht. Die Zuordnung von Saatgutproben zu geografischen Regionen oder gar Herkunftsgebieten ist demnach mit Stabilisotopen nicht möglich.

Douglasie

Bestandesmischproben aus 21 Beständen wurden hinsichtlich ihrer Stabilisotopen-Zusammensetzung charakterisiert. Zusätz-

lich wurde für eine Samenplantage ein Mittelwert rechnerisch hergeleitet. Das Ergebnis für zwei Elemente (Stickstoff und Kohlenstoff) ist in Abbildung 3 dargestellt.

Wie bei Eiche zeigt sich auch hier: Die δ -Werte für Stabilisotopen im Saatgut unterscheiden sich zwischen verschiedenen Erntebeständen. Es ist aber kein deutliches regionales Muster erkennbar. Mit δ -Werten allein lässt sich ein Erntebestand oder Herkunftsgebiet somit nicht bestimmen.

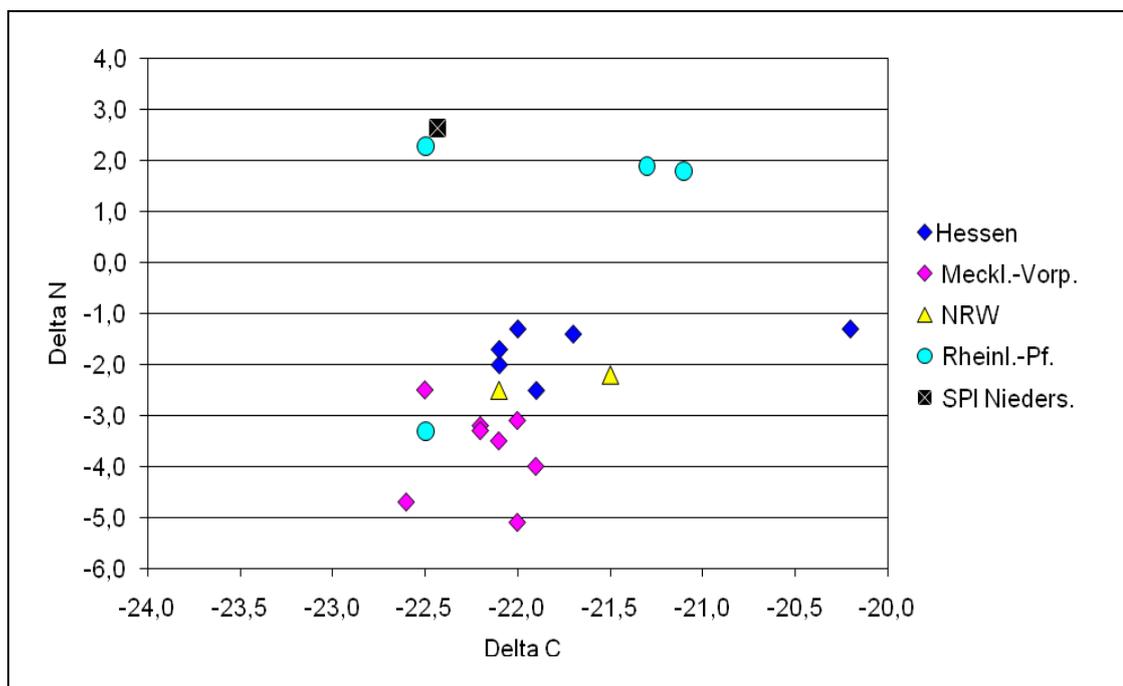


Abb. 3: Regionale Variation der δ -Werte von Saatgut aus 21 deutschen Beständen sowie von einer niedersächsischen Samenplantage der Douglasie.

Fig. 3: Regional variation of δ -values of seedlots of 21 German stands and a seed orchard of Douglas fir in Lower Saxony.

4.1.2 Variation innerhalb von Beständen

Auf Samenplantagen wurde Saatgut von Einzelbäumen geerntet und einzelbaumweise hinsichtlich seiner Isotopenzusammensetzung untersucht.

Douglasie

Abbildung 4 zeigt die Variation innerhalb einer Douglasien-Samenplantage. Zum bes-

seren Vergleich der Größenordnungen sind die bereits in Abbildung 3 dargestellten Werte für Bestandesmischproben hier wiederholt. Es zeigt sich, dass die Einzelbaumabsaaten innerhalb einer relativ kleinen Fläche eine Streuung aufweisen, die zumindest für Kohlenstoff die Variationsbreite der 21 Bestandesmischproben aus mehreren Bundesländern übersteigt.

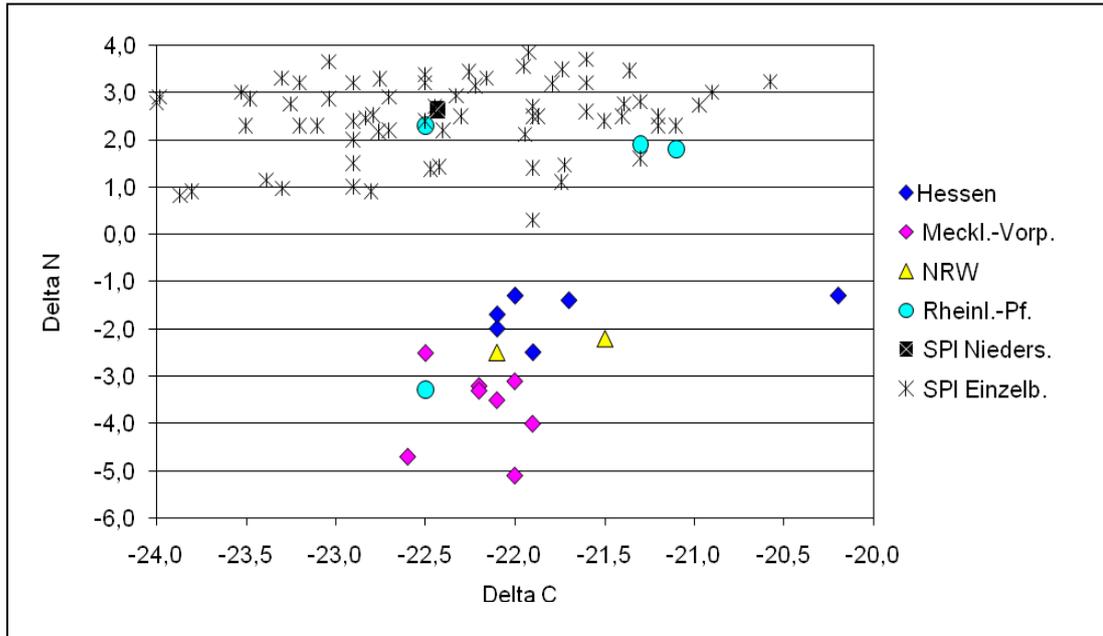


Abb. 4: Variation der δ -Werte von Einzelbaumabsaaten (Symbol \times) einer Douglasien-Samenplantage im Vergleich zu Bestandesabsaaten von 21 deutschen Beständen.

Fig. 4: Variation of δ -values of seedlots from single trees (symbol \times) of a seed orchard of Douglas fir in comparison to seedlots from 21 German seed stands.

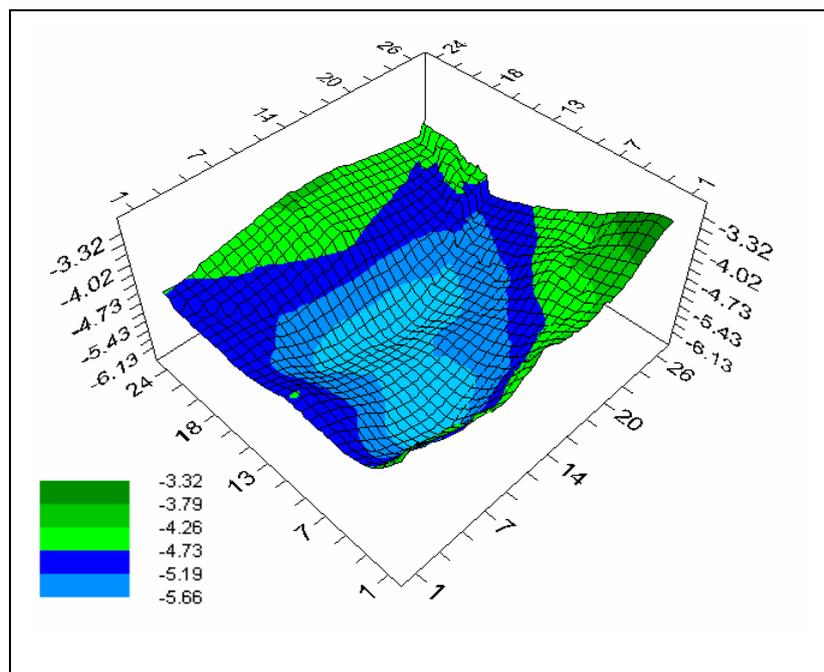
Eiche

In Abbildung 5 wird die räumliche Verteilung der Isotope des organischen Stickstoffs (N_{org}) innerhalb einer Traubeneichen-Samenplantage für das Reifejahr 2005 gezeigt. Ein deutlicher Trend über die Fläche

ist erkennbar, der auch durch eine Grobkartierung stickstoffzeigender Pflanzen bestätigt wurde. Offensichtlich wirkt sich die unmittelbar benachbarte Ackerfläche mit Eintrag von mineralischem Dünger aus.

Abb. 5: Traubeneiche-Samenplantage: Verteilung der δ -Werte von N_{org} für 2005 einzelbaumweise geerntete Eicheln. X- und y-Koordinaten stellen den Pflanzverband (6 m x 6 m) dar; in der dritten Dimension sind die farblich markierten δ -Werte dargestellt (Legende).

Fig. 5: Seed orchard of sessile oak: distribution of δ -values of N_{org} for oak seeds from single trees harvested in 2005. X- and y-coordinates show the planting position while in the third dimension the δ -values are shown in colours (legend).



Der Durchschnittswert für die gesamte Ernte der Samenpflanzung (Plantagenmischprobe) hängt damit stark davon ab, in welchen Teilen der Pflanzung wie viel Saatgut produziert bzw. geerntet wird.

Abbildung 6 zeigt die Zusammensetzung der Sauerstoffisotopen (H/D_{org}) für dieselbe Samenpflanzung und dieselben Proben wie in

Abbildung 5. Die Variation zwischen den Einzelbaumabsaaten ist sehr groß, im Gegensatz zum organischen Stickstoff ist hier kein Trend über die Fläche erkennbar.

Die Werte für organischen Sauerstoff ($^{18}O_{org}$) variieren ähnlich stark und ebenfalls ohne erkennbares räumliches Muster.

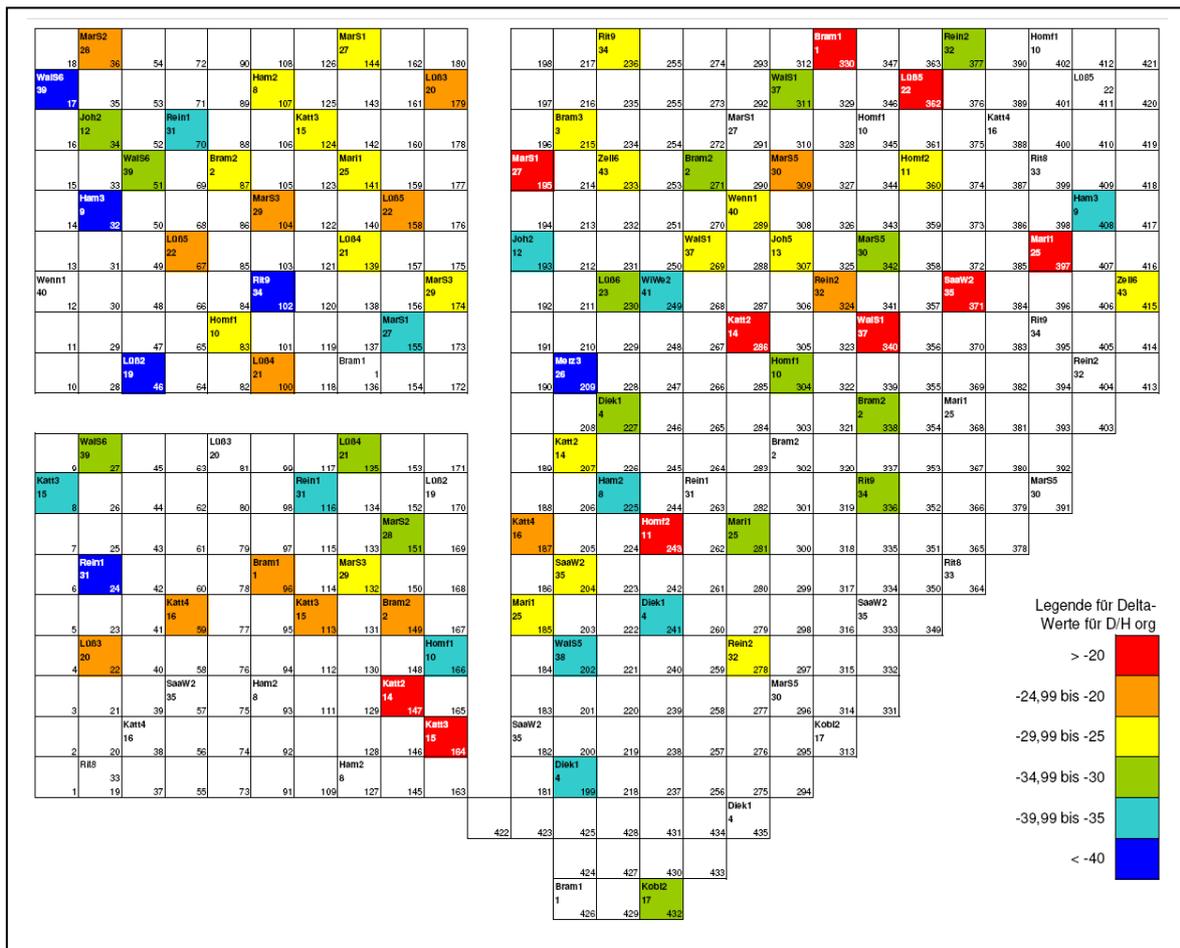


Abb. 6: Traubeneiche-Samenpflanzung: Verteilung der δ -Werte von Wasserstoff (H/D_{org}) für einzelbaumweise untersuchte Eicheln der Ernte 2005.

Farben repräsentieren Klassen von δ -Werten gem. Legende; bei weißen Quadraten war keine Ernte möglich. Quadrate enthalten Platznummern (r. u.) und bezeichnen den Wuchsplatz (6 m x 6 m) für Einzelbäume. Nur auf Plätzen mit Klonbezeichnungen stehen Bäume.

Fig. 6: Seed orchard of sessile oak: Distribution of δ -values of hydrogen (H/D_{org}) of oak seed from single trees harvested in 2005.

Colours represent classes of δ -values (see legend); at white marked squares no harvest was possible. Squares show numbers of planting positions of single trees at a distance of 6 m x 6 m. Only at positions marked with clone names trees are growing.

4.1.3 Reifejahre

Die Untersuchungen an Eicheln der Traubeneichen-Samenplantage (s. 4.1.2) aus dem Reifejahr 2005 wurden auch an Eicheln des Reifejahrs 2006 durchgeführt. Das Ergebnis ist unter Verwendung der gleichen Farb-signatur in Abbildung 7 dargestellt.

Die Unterschiede zwischen den Reifejahren sind enorm. Die arithmetischen Durchschnittswerte für alle Proben unterscheiden sich bei organischem Wasserstoff um 10,3 (2005: $\delta = -28,0$ bei $n = 81$; 2006: $\delta = -17,7$ bei $n = 80$). Betrachtet man nur die Bäume, für deren Absaaten aus beiden Jahren Werte für Wasserstoff vorliegen, so ergeben sich

ähnliche Werte (Unterschied: 9,8; 2005: $\delta = 27,9$; 2006: $\delta = 18,1$; jeweils $n = 58$).

Bei anderen Elementen waren die Jahresunterschiede der δ -Werte nicht so ausgeprägt. Bei Sauerstoff betragen sie aber immerhin auch -2,8 (bei allgemeiner Durchschnittsbildung von je 80 Messwerten) bzw. -2,6 (bei Beschränkung auf Pflanzplätze, für die aus beiden Jahren Messwerte vorliegen). Angesichts der engeren Schwankungsbreite der Sauerstoff- δ -Werte ist diese Größenordnung dennoch beachtlich.

Die auffallenden Unterschiede zwischen den beiden Reifejahren könnten durch veränderte Umweltbedingungen verursacht worden

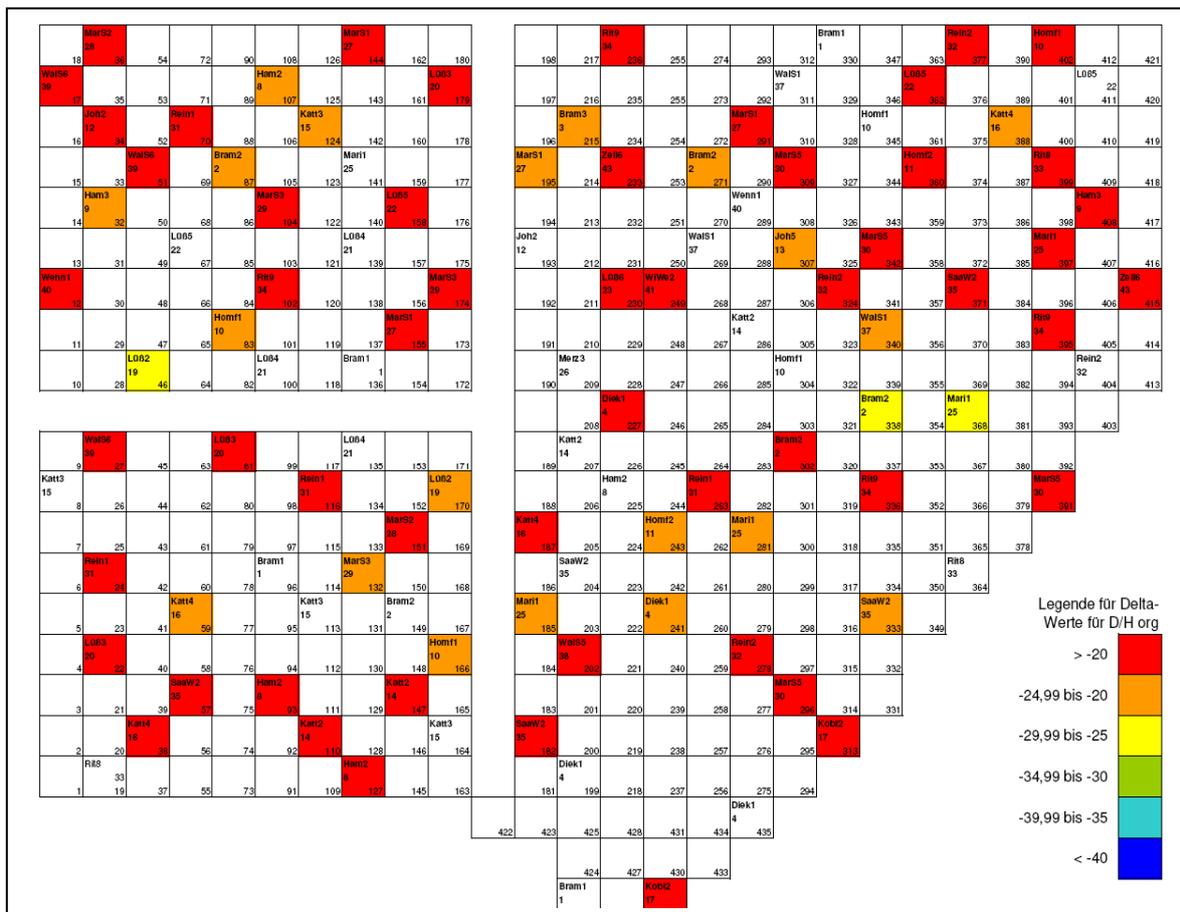


Abb. 7: Traubeneiche-Samenplantage: Verteilung der δ -Werte von Wasserstoff (H/D_{org}); wie Abb. 6, nur für das Erntejahr 2006.

Fig. 7: Seed orchard of sessile oak: Distribution of δ -values of hydrogen (H/D_{org}); as Fig. 6 for the year 2006.

sein, die für alle Bäume gleichermaßen wirken, so dass sich eine systematische Verschiebung ergeben müsste. Die für die Einzelbäume vorgenommenen Korrelationsberechnungen lassen aber keine derartigen Zusammenhänge erkennen. Am ehesten zeigt sich dies noch bei Stickstoff mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,55 und einem Bestimmtheitsmaß von 0,3. Für Stickstoff war auch ein räumliches Muster nachzuweisen, das sich in den beiden Jahren in seinen Grundzügen wiederholte. Abbil-

dung 8 zeigt die Grafiken der Korrelationen zwischen den beiden Erntejahren für Wasserstoff ($n = 58$), Stickstoff ($n = 61$), Sauerstoff ($n = 57$) und Kohlenstoff ($n = 62$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Variation von Jahr zu Jahr zwar einen generellen Trend zeigt, die Veränderungen aber von Baum zu Baum sehr unterschiedlich sind. Prognosen von einem Jahr auf ein anderes sind daher nicht möglich.

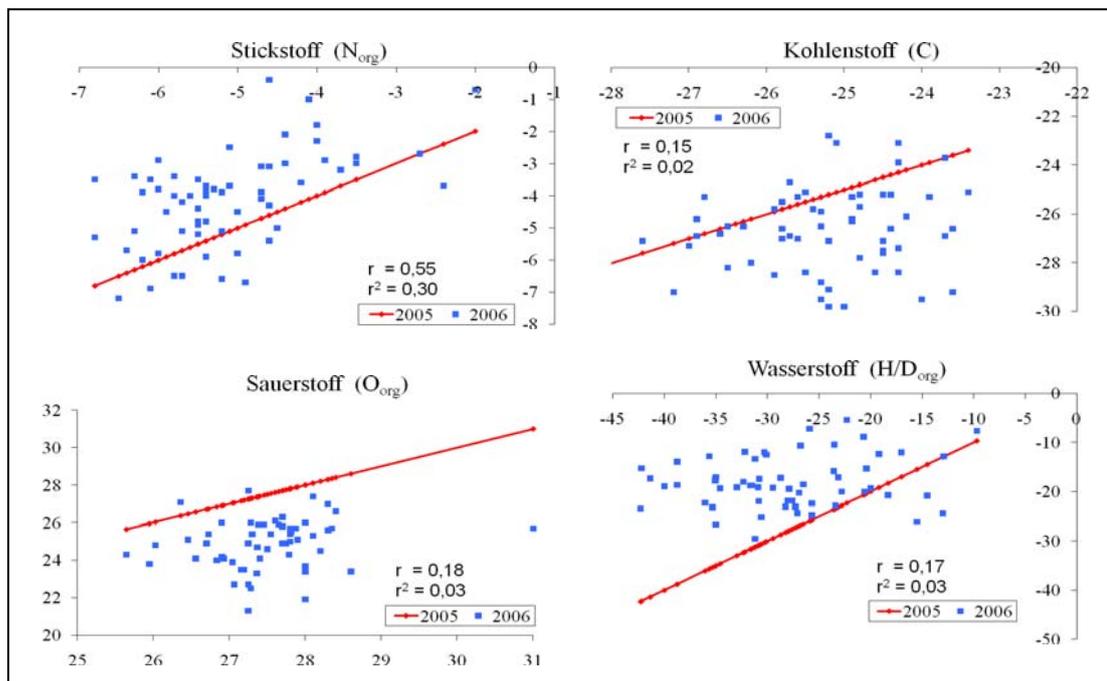


Abb. 8: Traubeneichen-Samenplantage: Korrelationen der δ -Werte von Einzelbaumabsaaten zwischen den Erntejahren (2005 und 2006). Korrelationskoeffizient: r , Bestimmtheitsmaß: r^2

Fig. 8: Seed orchard of sessile oak: correlations of the δ -values of seed lots from single trees between the two years of harvest (2005 and 2006). Correlation coefficient: r , coefficient of determination: r^2

4.2 Pflanzeigene Variation

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Stabilisotopen-Zusammensetzung ausschließlich durch abiotische Umweltbedingungen bestimmt wird, letztlich auf physikalische Effekte der Fraktionierung durch unterschiedliche Atomgewichte zurückgeht. Solche Fraktionierungseffekte treten aber in besonderem Maße auch bei physiologischen

Prozessen auf. So ist auch zu erklären, dass sich δ -Werte in unterschiedlichen Pflanzenteilen derselben Pflanze unterscheiden. Auf einer Eschen-Samenplantage wurde dieser Effekt untersucht (s. 4.2.1).

Da physiologische Abläufe nicht nur durch Umweltbedingungen sondern auch durch die Genetik bestimmt werden, ist zumindest vorstellbar, dass zwischen unterschiedlichen

Genotypen auch typische Unterschiede bei den δ -Werten erkennbar sind. Auch dieser mögliche Effekt wurde auf der Eschen-Samenplantage untersucht. Samenplantagen mit ihrer mehrfachen Wiederholung einzelner Genotypen eignen sich besonders für diese Fragestellung.

4.2.1 *Verschiedene Gewebeteile*

Erwartungsgemäß zeigten sich Unterschiede zwischen verschiedenen, aber in der gleichen Vegetationsperiode gebildeten Pflanzenteilen (Samen, Blätter, einjährige Zweige) von Esche. Die δ -Werte zeigten keine engen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Gewebeteilen.

Bei Wasserstoff galt zwar für jedes untersuchte Individuum, dass δ (Samen) > δ (Zweig) > δ (Blatt). Auch bei Sauerstoff gab es eine einheitliche, aber gegensätzliche Abweichungsrichtung: δ (Blatt) > δ (Zweig) > δ (Samen). Insgesamt sind die Abweichung aber zu uneinheitlich, um aus dem δ -Wert eines Gewebes hinreichend genau auf den δ -Wert eines anderen Gewebes schließen zu können. Wenn Stabilisotopen zur Überprüfung einer (Einzelbaum-) Saatgutpartie eingesetzt werden sollen, so ist eine Referenzpartie des Saatgutes erforderlich. Ein Abgleich mit anderen δ -Werten des Samenalters reicht nicht aus.

4.2.2 *Verschiedene Klone und Ramets*

Wenn es genetische Einflüsse auf die Stabilisotopen-Zusammensetzung gibt, müssten sich die δ -Werte des Saatgutes verschiedener Mutter-Genotypen (Klone) voneinander unterscheiden. In gewissem Umfang tun sie dies auch tatsächlich. Als Beispiel seien 6 Genotypen der Eschen-Samenplantage genannt, auf der die δ -Werte für Sauerstoff z. T. sehr große Unterschiede zwischen den Klonen zeigten, von $\delta(^{18}\text{O}) = 18,3$ für den Klon Vi 80 bis $\delta(^{18}\text{O}) = 19,9$ für Vi 149.

Dennoch lassen sich diese Werte nicht als eindeutigen Beleg für genetische Effekte auf

die Stabilisotopen-Zusammensetzung werten, sondern können auch als Zufallsergebnisse bei der Mittelwertbildung für Klone angesehen werden. Der Grund dafür liegt in der generell sehr großen Streuung zwischen den verschiedenen Einzelbaumabsaaten, die sich auch in der großen Streuung der Einzelbaumabsaaten verschiedener Ramets (Wiederholungen desselben Klons an unterschiedlichen Pflanzplätzen) zeigen. Gleiche Genotypen produzieren Saatgut mit sehr unterschiedlichen δ -Werten (Abb. 9), so dass ein genetischer Effekt aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden kann.

Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse für Sauerstoff einiger Klone zeigten im Vergleich zu anderen Elementen und auch zu Ergebnissen von anderen Samenplantagen die größten Mittelwertunterschiede. Berücksichtigt man diese anderen Werte, so erscheint ein genetischer Effekt eher unwahrscheinlich.

Andererseits muss aber bedacht werden, dass Ramets meist keine exakten Wiederholungen eines Klons sind, da sie auf Samenplantagen üblicherweise durch Pfropfungen entstanden sind. Damit ist zwar eine genotypische Identität der Kronen gewährleistet, die Unterlagen und damit die Wurzeln sind aber Sämlinge und damit genetisch unterschiedlich. Genetische Effekte auf die Stabilisotopen-Zusammensetzung könnten also dadurch verwischt werden, dass bereits im Wurzelbereich und in der Verwachsungszone unterschiedliche Fraktionierungsvorgänge stattfinden, die durch gleichartig verlaufende Fraktionierungsvorgänge in den (genetisch identischen) Kronen nicht mehr ausgeglichen werden. Hierzu wären Untersuchungen an genetisch vollständig identischen Pflanzen, z. B. Stecklingen erforderlich.

Diese Voraussetzung ist auf der Douglasien-Samenplantage „Danndorf“ erfüllt, da bei den dort verwendeten Stecklingen die gesamten Pflanzen einschließlich Wurzel genetisch identisch sind. Eine Ähnlichkeit der δ -Werte bei Ramets desselben Klons ist auch

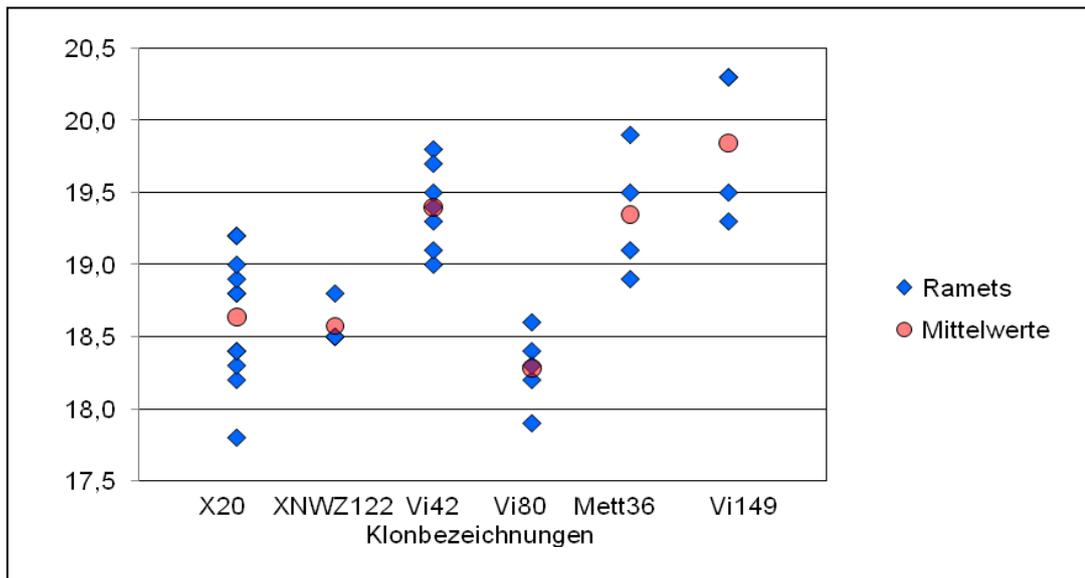


Abb. 9: δ -Werte für organischen Sauerstoff ($^{18}\text{O}_{\text{org}}$) von Einzelbaumabsaaten einer Eschen-Samenplantage des Reifejahrs 2006. Dargestellt sind Werte für einzelne Ramets von unterschiedlichen Pflanzplätzen sowie Mittelwerte für sechs Klone.

Fig. 9: δ -values of organic oxygen ($^{18}\text{O}_{\text{org}}$) of seed lots of single trees in a seed orchard of European ash harvested in 2006. The values of single ramets grown at different positions as well as the mean of six clones are shown.

hier nicht erkennbar. Allerdings muss bei dieser Aussage bedacht werden, dass die Anzahl (untersuchter) Wiederholungen hier relativ gering ist. Bei einer Erhöhung der Anzahl untersuchter Ramets könnte eventuell doch ein gewisser genetischer Einfluss erkannt werden. Für die Variation der Werte dürfte jedoch vor allem die Umweltvariation verantwortlich sein, ein kleiner genetischer Effekt kann nicht ausgeschlossen werden, die Messmethode mit ihrer extrem guten Reproduzierbarkeit (s. FÖRSTEL et al. 2008) kommt als Erklärung dagegen nicht in Frage.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Da die Stabilisotopen-Zusammensetzung von Saatgut innerhalb einer Ernteeinheit sehr stark variiert, hängt sie auch stark von der Erntestrategie (welche Bäume in welchen Anteilen) und Nacherntebehandlung

(Herstellung der Samenplantagenmischung) ab. Daher sind sorgfältige Stichproben zur Charakterisierung eines Bestandes bzw. einer Bestandesabsaat nötig. Da zudem in unterschiedlichen Reifejahren eine unterschiedliche Beteiligung und Intensität der abblühenden und dann fruktifizierenden Partnern zu erwarten ist, müssen auch Stabilisotopen im Saatgut von Jahr zu Jahr sehr stark variieren. Damit reicht eine einmalige Charakterisierung von Saatgut nicht aus.

Die Abhängigkeit der δ -Werte von der Art der Stichprobenahme erinnert somit stark an die Bedeutung der Stichprobenahme für genetische Untersuchungen. Bei Buche wurden derartige Abhängigkeiten von JANBEN (2000) beschrieben, und auch DOUNAVI (2000) weist die Bedeutung der kleinräumigen genetischen Variation innerhalb von Beständen nach.

Die Verwendung von Stabilisotopen für die Herkunftssicherung setzt damit die Integration in ein System mit Referenzproben für

jede einzelne Ernte voraus. Unter dieser Voraussetzung können Stabilisotopen im Bereich des Saatguts neben anderen Methoden (wie z. B. genetischen Markern) eingesetzt werden und in Verfahren der Herkunftssicherung integriert werden. Mit dieser Methode ergeben sich jedoch nur dann Verbesserungen wenn die Analysen insgesamt kostengünstiger gestaltet werden können.

ohne ein Referenzprobensystem erreichbar ist, reicht für Kontrollzwecke innerhalb Deutschlands nicht aus. Es wäre jedoch vorstellbar, dass auf europäischem Maßstab doch so deutliche geografische Muster erkennbar sind, dass großräumige Verbringungen von Saatgut nachgewiesen werden können. Dazu wäre allerdings erforderlich, dass entsprechende Datenbanken aufgebaut werden.

Die geografische Auflösung, die für forstliches Vermehrungsgut mit Stabilisotopen

Danksagung

Besonderer Dank gilt Serge Havel für die technische Assistenz. Für die Förderung und Projektbetreuung danken wir dem Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie dem Projektträger Jülich

Literatur

- BMVEL [BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT] (Hrsg.) (2003): Verwendung einheimischer Gehölze regionaler Herkunft für die freie Landschaft. Ein Beitrag zur Erhaltung und Förderung der biologischen Vielfalt. Bonn, 7 S.
- DOUNAVI, A. (2000): Familienstrukturen in Buchenbeständen (*Fagus sylvatica*). Forstwissenschaftliche Dissertation, Universität Göttingen. Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen. 142 S.
- FÖRSTEL, H. (2008): Natürliche Variation und Messung stabiler Isotopen. In: GEBHARDT, K. (Hrsg.): Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Ergebnisse des BMBF-Verbundprojektes FKZ 330587 und des Symposiums „Herkunftskontrolle“ vom 07. und 08.02.2008 in Kassel. ISBN 978-3-00-024808-5. S. 17-36.
- FÖRSTEL, H.; BONER, M.; SOMMER, T.; ERVEN, C.; ZAHNEN, J.; GRIEBHAMMER, N.; SONNENBERG, A. (2008): Nutzung der natürlichen Variation stabiler Isotope in Holz als Fingerabdruck zur Überprüfung der Herkunftskontrolle. Forst u. Holz 63: 31-34.
- GEBHARDT, K. (Hrsg.) (2008): Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Ergebnisse des BMBF-Verbundprojektes FKZ 330587 und des Symposiums „Herkunftskontrolle“ vom 07. und 08.02.2008 in Kassel. ISBN 978-3-00-024808-5. 146 S.
- JANBEN, 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.
- JANBEN, A. (2008): Bedeutung der Herkunftswahl bei forstlichem Vermehrungsgut. In: GEBHARDT, K. (Hrsg.): Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Ergebnisse des BMBF-Verbundprojektes FKZ 330587 und

- des Symposiums „Herkunftskontrolle“ vom 07. und 08.02.2008 in Kassel. ISBN 978-3-00-024808-5. S. 7-15.
- KLEINSCHMIT, W. (2002): Herkunftsfrage aus Sicht der Betriebswirtschaft. In: Nordwestdeutscher Forstverein (Hrsg.): Jahrestagung 2002 in Hann. Münden: 28-33.
- KONNERT, M.; CREMER, E.; HUSSENDÖRFER, E.; DOUNAVI, A.; WIMMER, T. (2004a): Isoenzymuntersuchungen bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*) - Anleitungen zur Trennmethode und Auswertung der Zymogramme. Online-Version der Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht“, www.genres.de/fgrdeu/iso-handbuecher/douglasie-arbeitsanleitung.pdf
- KONNERT, M., FROMM, M.; WIMMER, T. (2004b): Anleitung für Isoenzymuntersuchungen bei Stieleiche (*Quercus robur*) und Traubeneiche (*Quercus petraea*) - Anleitungen zur Trennmethode und Auswertung der Zymogramme. Online-Version der Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht“, www.genres.de/fgrdeu/iso-handbuecher/stieleiche-arbeitsanleitung.pdf
- KONNERT, M.; SCHMIDT, J.; FROMM, M.; HUSSENDÖRFER, E.; DOUNAVI, A.; HAAS, R.; LEHRMANN, C.; WIMMER, T. (2004c): Isoenzymuntersuchungen bei Esche (*Fraxinus excelsior* L.) - Anleitungen zur Trennmethode und Auswertung der Zymogramme. Online-Version der Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht“, www.genres.de/fgrdeu/iso-handbuecher/esche-arbeitsanleitung.pdf
- KONNERT, M.; CREMER, E.; FÖRSTEL, H. (2008): Umsetzung und Verbesserung des ZüF-Verfahrens mit Hilfe genetischer Analysen und der Stabilisotopenmethode am Beispiel von Bergahorn, Fichte und Weißtanne. In: Gebhardt, K. (Hrsg.) Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Ergebnisse des BMBF-Verbundprojektes FKZ 330587 und des Symposiums „Herkunftskontrolle“ vom 07. und 08.02.2008 in Kassel. ISBN 978-3-00-024808-5. S. 85-100.
- WEZEL, G. (2008): Sechs Jahre ZÜF-Verfahren. Forstpflanzen mit überprüfbarer Herkunft. AFZ-DerWald 12: 660-663.
- SEITZ, B.; KOWARIK, I. (2003): Perspektiven für die Verwendung gebietseigener Gehölze. NEOBIOTA 2: 3-26.
- SEITZ, B.; JÜRGENS, A.; KOWARIK, I. (2007): Erhaltung genetischer Vielfalt: Kriterien für die Zertifizierung regionalen Saat- und Pflanzguts. BfN-Skripten 208, 48 S.

Anschrift der Autoren:

Dr. WILFRIED STEINER; DR. BERNHARD HOSIUS
Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung Waldgenressourcen
Prof.-Oelkers-Str. 6, 34346 Hann. Münden, Deutschland

Dr. BERNHARD HOSIUS
Fa. ISOGEN im Institut für Forstgenetik
Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland

Unterscheidung von Saatgutpartien der Buche und Roterle anhand der Stabilisotopen-Signaturen ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) und Elementgehalte von Kohlenstoff und Stickstoff

Karl Gebhardt

Zusammenfassung

Ernte und Vertrieb von Saatgut der Rotbuche und Roterle unterliegen in Deutschland dem Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG). Unsicherheiten beim Handel mit forstlichem Vermehrungsgut fordern oftmals eine Überprüfung der Authentizität von Saatgutpartien. Mit der hier beschriebenen Stabilisotopen-Methode konnten kleine Teilmengen von gelagerten Buchen-Saatgutpartien bei geringer Fehlerrate (1,33 %) anhand der Stabilisotopen-Signaturen und Elementgehalte von Kohlenstoff und Stickstoff den Ausgangsbeständen zugeordnet werden. Wenn Knospen von Einzelbäumen oder das darunterliegende Saatgut analysiert wurden, erhöhte sich die Fehlerrate einer Zuordnung zum Bestand auf über 20 %. Von 28 Roterlen-Saatgutpartien aus 19 Orten und 16 Reifejahren konnten mit der beschriebenen Stabilisotopen-Methode 14 Partien in 3 bis 5 Wiederholungen fehlerlos der richtigen Herkunft zugeordnet werden. Die Überprüfung der Zugehörigkeit von beliebigen Proben einer Baumart zu einem definierten Kollektiv ist mit Hilfe einer Diskriminanzfunktion möglich. Die Anwendung der beschriebenen Methode für Zertifizierung und Kontrolle wird diskutiert.

Schlagwörter: Rotbuche, Roterle, stabile Isotope, ^{13}C , ^{15}N , Zertifizierung, Kontrollmethoden

Differentiation of seedlots of beech and black alder by stable isotope signatures ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) and the element content of carbon and nitrogen

Abstract

Harvesting and marketing of seedlots of beech and black alder undergo the regulations of the law on forest reproductive material in Germany. Uncertainties in the trade of forest reproductive material underline the necessity of examinations of the authenticity of seedlots. A method is described which allows a precise association (failure rate: 1.33 %) of even small seedlots to the harvested beech stands of origin using isotope signatures and the element content of carbon and nitrogen. If buds of individual trees or the underlying seeds were analysed, the error rate of an allocation to the harvested stands exceeded 20 %. Using the described methods for the differentiation of 28 black alder seedlots from 19 locations in 16 years maturity it was possible to associate the origins of 14 seedlots in 3 to 5 repetitions without failure. A test of the membership of any sample to a defined group of seedlots of a certain tree species becomes possible by the use of a discriminant function. The application of the described method for certification and control is being discussed.

Key words: beech, black alder, stable isotopes, ^{13}C , ^{15}N , certification, control methods

1. Einleitung

Der Vertrieb von forstlichem Saatgut unterliegt den Bestimmungen des Forstvermehrungsgutgesetzes (FoVG) das in seiner Fassung vom 1.1.2003 auch für die Baumarten Buche (*Fagus sylvatica* L.) und Schwarz- bzw. Roterle (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) gültig ist. Die von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) veröffentlichte deutsche Versorgungsbilanz weist für die leicht

früchtige Roterle (TKG: ca. 1,4 g) ein zehnjähriges Mittel von 352 kg und für die schwerfrüchtige Rotbuche (TKG: ca. 250 g) ein Mittel von 95.416 kg auf.

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von forstlichem Vermehrungsgut dienen die in Tabelle 1 genannten Bestände und Samenplantagen.

Tabelle 1: Gewinnung von forstlichem Vermehrungsgut der Baumarten Roterle und Rotbuche (Übersicht der BLE, Stand: 01.10.1997)

Table 1: Production of forest reproductive material of black alder and beech (overview from BLE, status 01.10.1997)

	Ausgewähltes Vermehrungsgut				Geprüftes Vermehrungsgut			
	Bestände		Samenplantagen		Bestände		Samenplantagen	
Baumart	Anzahl	Fläche	Anzahl	Fläche	Anzahl	Fläche	Anzahl	Fläche
Roterle	537	1.372 ha	11	17,7 ha	5	6,8 ha	4	11,3 ha
Rotbuche	14.181	81.315 ha	1	1,7 ha	30	244 ha	-	-

Unsicherheiten im Handel mit forstlichem Vermehrungsgut erfordern immer wieder die Anwendung von Nachweisverfahren zur Überprüfung der Authentizität von Saatgutpartien. In Prüffällen kommen genetische Methoden zur Anwendung, deren Aussage jedoch durch die jährliche Neuordnung der Gene bei der Abblüte bestimmt wird (KONNERT & BEHM 1999).

Wie von SANDER et al. (2001) am Beispiel der Buche demonstrierten, ist es mit der kostengünstigen Isoenzymanalyse nicht möglich zwischen 13 untersuchten hessischen Buchenbeständen aus 12 Wuchsgebieten signifikante Unterschiede der populationsgenetischen Parameter nachzuweisen. Im Sinne einer effektiven Zertifizierung sind jedoch Nachweismethoden erforderlich, die eine Unterscheidung von Bestandesabsaaten kleiner Bestände auch innerhalb eines Herkunftsgebietes ermöglichen.

Die Analytik stabiler Isotope ist ein für den Herkunftsnachweis von Lebensmitteln und landwirtschaftlichen Produkten bereits bewährtes Verfahren (BONER & FÖRSTEL 2001; FÖRSTEL 2002), das die genetischen Methoden bei forstlichem Saatgut ergänzen und absichern kann (FÖRSTEL 2003; GESSLER et al. 2005).

Um die Tauglichkeit der Stabilisotopen-Analytik für die Unterscheidung von Saatgutpartien zu prüfen, galt es, die folgenden Fragen zu klären:

- Wie muss die Probenahme erfolgen?
- Wie prägen Stabilisotope das Saatgut?
- Gibt es Unterschiede zwischen Herkünften?
- Wie eng ist der Standortsbezug?
- Eignet sich die Methodik zur Rückverfolgung von Proben?

2. Material und Methoden

Buche

Als Untersuchungsmaterial dienten sowohl Bestandesabsaaten des Mastjahres 1989 als auch Einzelbaumabsaaten des Reifejahres 2006 aus denselben Beständen, die parallel auch genetisch untersucht wurden (siehe folgender Beitrag von WYPUKOL et al. 2008). Pro Bestand erntete man 1989 etwa 20 kg von mindestens 20 Bäumen mit jeweils gleichen Anteilen an der Gesamtmenge und lagerte diese Menge nach dem Heruntertrocknen auf 8 - 9 % Wassergehalt in Teilmengen von ca. 1 kg in luftdicht verschlossenen Aludosen bei -10 °C in der Genbank (Abb. 1).



Abb. 1: Lagerung der Teilmengen von hessischen Buchen-Bestandesernten des Reifejahres 1989

Fig. 1: Conservation of seed batches of hessian beech stands harvested in 1989

Für die Bestimmung von Stabilisotopen wurden jeweils 20 Bucheckern aus 15 Dosen einer Bestandsernte entnommen. Die von den Schalen befreiten Embryonen-Hälften wurden bei 60 °C über Nacht getrocknet und mit einer Retsch-Schwingmühle (MM 200) mittels Stahlkugeln staubfein vermahlen.

Roterle

Das Tausendkorngewicht der von staatlichen Institutionen beschafften Saatgutmischungen aus Beständen und Samenplantagen betrug 1,2 - 1,6 g. Aus jeder Saatgutmischung wurden fünf Stichproben á 0,5 g (ca. 350 Samenkörner) gezogen und staubfein vermahlen. Die Lage der Bestände und Samenplantagen ist der Abbildung 2 zu entnehmen.



Abb. 2: Lage der beernteten Samenplantagen (SPL) und Bestände von Roterle in Deutschland

Fig. 2: Location of harvested seed orchards (SPL) and stands of black alder in Germany

Zur massenspektrometrischen Analyse am Kompetenzzentrum für stabile Isotope der Univ. Göttingen wurden von jeder Probe 2 mg Aliquots in Zinnkapseln (Fehler: ± 0,1 mg) abgewogen. Die Proben wurden anschließend in einem Elementanalysator bei 1.000 °C unter Sauerstoffüberschuss verbrannt. Die mit der nachfolgenden Reduktion entstehenden Gase CO₂ und N₂ wurden

über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor analysiert, ionisiert und einem Massenspektrometer zugeführt.

Dies führt im Massenspektrometer zu Signalen auf den Massen 44 (^{12}C , ^{16}O , ^{16}O), 45 (^{13}C , ^{16}O , ^{16}O) und 46 (^{12}C , ^{16}O , ^{18}O). Aus den Ratios 45/44 für die Probe und dem Arbeitsstandard (CO_2 -Gas) werden Delta-Werte berechnet, die auf einen internationalen Standard bezogen sind.

Die Deltawerte ($\text{DE}=\delta$) in Promille geben somit das Verhältnis des schweren ($X=^{13}\text{C}$; $X=^{15}\text{N}$) zum leichten ($Y=^{12}\text{C}$; $Y=^{14}\text{N}$) Isotop in der Probe in Relation zum Verhältnis in einem internationalen Standard ($R_{\text{reference}}$) wieder:

$$\text{DE}_{X/Y} = \delta_{S/R} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{reference}}) - 1] \cdot 10^3$$

Für Kohlenstoff ($X=^{13}\text{C}$) beträgt der Wert des Referenzmaterials (Vienna-Pee Dee belemnite; PDB) 0,0112372. Für Stickstoff gilt das Isotopenverhältnis von Luft ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,0036765$) als Standard. Zusätzlich wurde der ^{13}C -Gehalt der Probe in Atomprozent errechnet. Der Gesamtkohlenstoffgehalt in Prozent wurde sowohl anhand der Peakhöhen des Massenspektrometers als auch aus dem Signal des Wärmeleitfähigkeitsdetektors bestimmt. Mithilfe des Feststoffstandards Acetanilid wurden die Messungen kalibriert.

Statistik

Alle Messwerte wurden varianzanalytisch mittels der GLM-Prozedur des Statistikprogramms SAS geprüft. Unterschiede der Mittelwerte wurden nach einem REGWQ-Test klassifiziert. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich im REGWQ-Test auf dem 5 %-Niveau nicht-signifikant.

Im Box-Plot sind das arithmetische Mittel als Punkt, das obere und untere Quartil, der Median sowie die Spannweite dargestellt.

Die weitere Auswertung erfolgte mittels der SAS-Prozeduren Corr, Stepdisc und Discrim.

3. Ergebnisse

Engste Korrelationen ($> 0,999$) bestehen zwischen den Deltawerten $\text{DE}_{13/12}$ und $\text{DE}_{45/44}$ des Kohlenstoffs sowie den Messwerten für die Stickstoffisotope $\text{DE}_{29/28}$ und DE_{Luft} . Bezogen auf den internationalen Standard PDB ergeben sich für $\text{DE}_{13/12}$ und DE_{Luft} negative Werte der Saatgutproben.

Buche

An den gelagerten Teilmengen aus fünf hessischen Beständen zeigten sich signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Kohlenstoff- (Abb. 3A) und Stickstoffisotope (Abb. 3B).

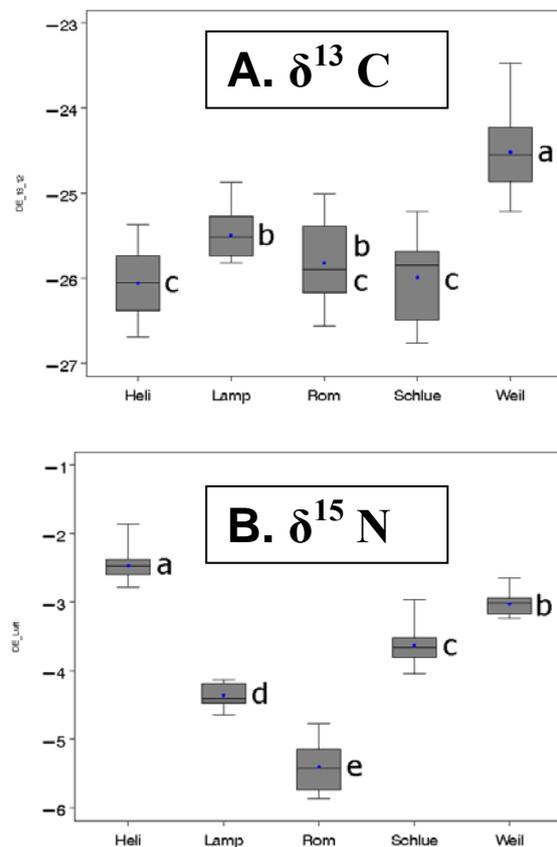


Abb. 3: Unterschiede der Delta-Werte von A. Kohlenstoff ($\text{DE}_{13/12}$ PDB) und B. Stickstoff (DE_{Luft}) der 5 Bestandesmittel der gelagerten Saatgutmengen

Fig. 3: Differences of means of the delta values A. carbon ($\text{DE}_{13/12}$ PDB) and B. nitrogen (DE_{air}) of stored batches of seed mixtures from 5 stands

Tabelle 2: Zuordnung (Anzahl / Prozent) der gelagerten 75 Teilmengen aus 5 Buchenbeständen anhand der DE_29/28-Werte nach Kreuzvalidierung mit quadratischer Distanzfunktion

Table 2: Association (number / percent) of 75 stored seed batches from 5 beech stands using a quadratic discriminant function for cross validation of the delta values of N¹⁵ (DE_29/28)

Kreuzvalidierungsergebnisse mit 3 Nächste Nachbarn
 Quadratische Distanzfunktion

$$D(X,Y) = (X-Y)' \text{COV}^{-1} (X-Y)$$

Posteriori-Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu jeder Herkunft

$m_k(X)$ = Anteil Beob. in Gruppe k in 3
 nächste Nachbarn von X

$$\text{Pr}(j|X) = \frac{m_j(X) \text{PRIOR}_j}{\sum_k (m_k(X) \text{PRIOR}_k)}$$

Anzahl der Beobachtungen und Prozentwert klassifiziert nach Herkunft

Von Herkunft	Heli	Lamp	Rom	Schlue	Weil	Summe
Heli	13 86.67	0 0.00	0 0.00	0 0.00	2 13.33	15 100.00
Lamp	0 0.00	15 100.00	0 0.00	0 0.00	0 0.00	15 100.00
Rom	0 0.00	1 6.67	14 93.33	0 0.00	0 0.00	15 100.00
Schlue	0 0.00	1 6.67	0 0.00	13 86.67	1 6.67	15 100.00
Weil	2 13.33	0 0.00	0 0.00	0 0.00	13 86.67	15 100.00
Summe	15 20.00	17 22.67	14 18.67	13 17.33	16 21.33	75 100.00

Fehlerzählungsschätzwerte für Herkunft

	Heli	Lamp	Rom	Schlue	Weil	Mittel
Rate	0.1333	0.0000	0.0667	0.1333	0.1333	0.0933
Priori	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	

Wie in Tabelle 2 gezeigt, ist eine Zuordnung (Anzahl und Prozentsatz) der gelagerten 75 Teilmengen zu den 5 Buchenbeständen anhand der DE_Luft-Werte nach Kreuzvalidierung mit linearer Diskriminantenfunktion bei einer Fehlerrate von 9,33 % (7 aus 75) möglich.

Eine Verringerung der Fehlerrate auf 1,33 % (1 aus 75) ist mit derselben Diskriminantenfunktion möglich, wenn die Variablen

DE_29/28, DE_13/12, DE_46/44 und der mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmte Kohlenstoffgehalt (CprzWLD) aus einem Probendurchgang berücksichtigt werden.

Für diese sehr schwach korrelierten Variablen hatte sich bei einer Step-Disc-Analyse (schrittweisen Diskriminanzanalyse) ein hohes partielles R-Quadrat errechnet (Tab. 3).

Tabelle 3: Zusammenfassung der schrittweisen Auswahl von Variablen in einer Step-Disc-Analyse der Analysenwerte der Saatgutmischungen des Jahres 1989

Table 3: Summary of a stepwise selection of variables from a Step-disc-Analysis of stored seed mixtures from 1989

Schritt	Variablen eingegeben	Partielles R-Quadrat	F-Statistik	Pr > F
1	DE_29_28	0.9556	376.73	<.0001
2	DE_13_12	0.6799	36.63	<.0001
3	DE_46_44	0.4786	15.61	<.0001
4	DE_Luft	0.1921	3.98	0.0059
5	Nprz_WLD	0.1538	3.00	0.0246
6	Cprz_WLD	0.3743	9.72	<.0001
7	DE_45_44	0.2596	5.61	0.0006
8	Cprz_MS	0.1077	1.90	0.1212

Im Reifejahr 2006 wurden in den gleichen fünf Buchenbeständen, in denen 1989 für Generhaltungszwecke Beerntungen durchgeführt worden waren, Beerntungen an jeweils 14 bis 15 mit Netzen unterlegten, weit entfernt (> 25 m) stehenden Einzelbäumen durchgeführt. Zusätzlich wurden von diesen Einzelbäumen Knospen entnommen, getrocknet und ohne Knospenschuppen für die Stabilisotopen-Analysen staubfein vermahlen.

Wie Abbildung 4 zeigt, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kohlenstoff- und Stickstoffisotope der Bestände sowohl bei Saatgut als auch bei Knospenproben. Zwischen den Saatgutproben der gelagerten Bestandesmischungen und den Einzelbaumproben ergab sich eine ähnliche Rangfolge der Isotopen-Mittelwerte.

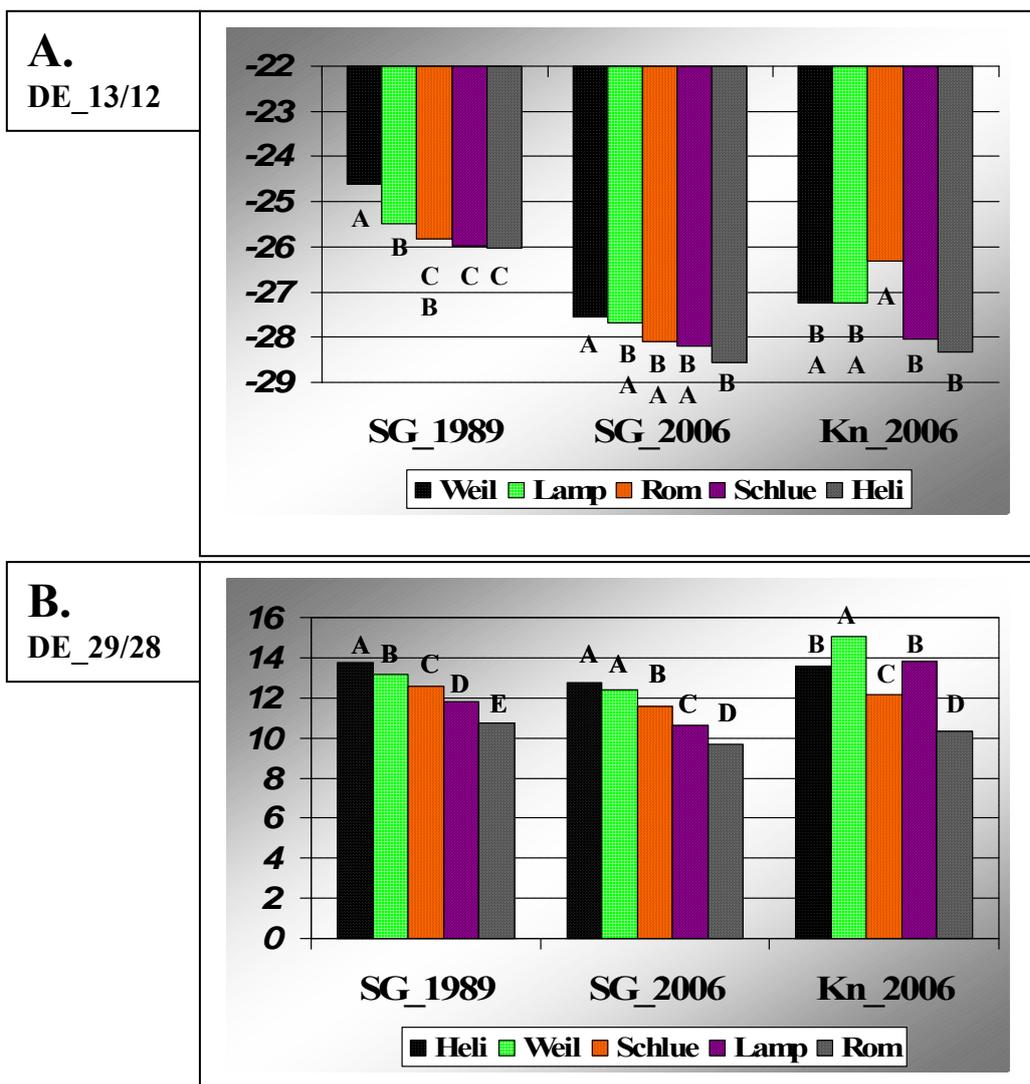


Abb. 4: Mittel der (A) Kohlenstoff- und (B) Stickstoff-Isotopen der Saatgutproben aus 1989 (SG_1989) sowie der Saatgut- (SG_2006) und Knospenproben (Kn_2006) aus dem Reifejahr 2006 von je fünf Buchenbeständen

Fig. 4: Means of the (A) carbon- and (B) nitrogen-isotope values of seedlots harvested in 5 identical beech stands in 1989 and 2006 (SG_1989; SG_2006) as well as bud samples from single trees (Kn_2006)

Wie schon oben bei den gelagerten Saatgutproben des Jahres 1989 gezeigt, ist es mit Hilfe einer Step-Disc-Analyse möglich, die Parameter zu erfassen, die auch bei den Knospen- (Tab. 4) oder Saatgutproben (Tab. 5) des Reifejahres 2006 das höchste partielle R-Quadrat und damit die beste Erklärung für die Herkunft

liefern. Die im Vergleich zu den gelagerten Saatgutpartien (Tab. 3) deutlich geringeren F-Werte in Tabelle 4 und Tabelle 5 resultieren aus der größeren Streuung, da sich die kleinstandörtlichen Unterschiede zwischen den beernteten Einzelbäumen hier bemerkbar machen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der schrittweisen Auswahl von Variablen in einer Step-Disc-Analyse der Knospen von 2006 beernteten Einzelbäumen

Table 4: Summary of a stepwise selection of variables from a Step-disc-analysis of buds from harvested single trees in the year 2006

Schritt	Eingegeben	Partielles R-Quadrat	F-Wert	Pr > F
1	DE_29_28	0.6950	39.31	<.0001
2	Nprz_WLD	0.4792	15.64	<.0001
3	DE_46_44	0.3346	8.42	<.0001
4	DE_13_12	0.1420	2.73	0.0363

Tabelle 5: Zusammenfassung der schrittweisen Auswahl von Variablen in einer Step-Disc-Analyse der Saatgutproben von 2006 beernteten Einzelbäumen in 5 Beständen

Table 5: Summary of a stepwise selection of variables from a Step-disc-analysis of seed samples from single trees harvested in the year 2006

Schritt	Eingegeben	Partielles R-Quadrat	F-Wert	Pr > F
1	DE_29_28	0.7237	38.64	<.0001
2	DE_46_44	0.2769	5.55	0.0007
3	Nprz_WLD	0.3978	9.41	<.0001
4	DE_45_44	0.1696	2.86	0.0316
5	Cprz_WLD	0.1537	2.50	0.0531
6	Cprz_MS	0.1233	1.90	0.1239

Eine Zuordnung der Einzelbäume zum richtigen Bestand (Herkunft) ist mit einer Diskriminanzfunktion sowohl mit den nicht eng korrelierten Analysenwerten (DE_29/28, DE_46/44, DE_13/12, Nprz_WLD) von Knospen (Tab. 6) als auch mit den Analysenwerten (DE_29/28, DE_46/44, DE_45/44, Nprz_WLD und Cprz_WLD) von den auf Netzen unter Einzelbäumen gesammelten Bucheckern (Tab. 7) möglich, bleibt jedoch stärker fehlerbehaftet. Der Fehler belief sich bei

einer Kreuzvalidierung mittels quadratischer Distanzfunktion bei den Knospen auf 51,3 % (Tab. 6) und bei dem unter Einzelbäumen aufgesammelten Saatgut auf 26,2 % (Tab. 7).

Die bei Knospen (Tab. 6) in die Gruppe „Sonstige“ geordneten Proben blieben aufgrund der Analysenwerte unbestimmt in ihrer Zuordnung.

Tabelle 6: Zuordnung (Anzahl / Prozent) der Knospen von 74 Einzelbäumen aus 5 Buchenbeständen anhand der Analysenwerte nach Kreuzvalidierung mit quadratischer Distanzfunktion

Table 6: Association (number / percent) of buds from 74 trees out of 5 beech stands using a square discriminant function for cross validation of the analysed data

Von Herkunft	Heli	Lamp	Rom	Schlue	Weil	Sonstige	Summe
Heli	11 73.33	0 0.00	1 6.67	2 13.33	0 0.00	1 6.67	15 100.00
Lamp	0 0.00	6 40.00	2 13.33	2 13.33	3 20.00	2 13.33	15 100.00
Rom	1 7.14	0 0.00	7 50.00	2 14.29	3 21.43	1 7.14	14 100.00
Schlue	1 6.67	2 13.33	2 13.33	6 40.00	3 20.00	1 6.67	15 100.00
Weil	1 6.67	0 0.00	4 26.67	2 13.33	6 40.00	2 13.33	15 100.00
Summe	14	8	16	14	15	7	74

Tabelle 7: Zuordnung (Anzahl / Prozent) der Samen unter 64 Einzelbäumen aus 5 Buchenbeständen anhand der Analysenwerte nach Kreuzvalidierung mit quadratischer Distanzfunktion

Table 7: Association (number / percent) of seeds below 64 trees out of 5 beech stands using a square discriminant function for cross validation of the analysed data

Von Herkunft	Heli	Lamp	Rom	Schlue	Weil	Summe
Heli	9 81.82	0 0.00	0 0.00	1 9.09	1 9.09	11 100.00
Lamp	1 6.67	12 80.00	1 6.67	0 0.00	1 6.67	15 100.00
Rom	0 0.00	1 9.09	9 81.82	1 9.09	0 0.00	11 100.00
Schlue	1 7.69	2 15.38	1 7.69	7 53.85	2 15.38	13 100.00
Weil	2 14.29	0 0.00	0 0.00	2 14.29	10 71.43	14 100.00
Summe	13	15	11	11	14	64

**Roterle
Saatgutvergleich mehrerer Reifejahre**

Um die Tauglichkeit der Methode für die Unterscheidung von Saatgutpartien mehrerer Reifejahre zu demonstrieren, wurde Roterlensaatgut aus 16 Reifejahren und 19 Orten (28 Herkünfte) darunter die Samenplantagen Uetze, Laufen, Freilassing, Ochsenhausen, Weilheim, Danndorf, Harzer Gebirgstäler sowie Bestandesabsaaten (Tab. 8) untersucht. Bei den 127 Saatgutpartien konnte eine Unterscheidung

und Zuordnung zur Herkunft anhand der Analysenwerte von DE_29/28, DE_13/12 sowie der mittels Massenspektrometrie bestimmten Gehalte von Kohlenstoff und Stickstoff (Cprz_MS und Nprz_MS) bei einer Fehlerrate von 18,6 % erfolgen. Dabei wurden in 3- bis 5facher Wiederholung die Saatgutpartien von 14 der 28 Herkünfte fehlerlos zugeordnet (Tab. 9).

Tabelle 8: Herkunft der untersuchten Roterlen-Saatgutpartien

Table 8: Origin of the investigated seedlots of black alder

<i>Handelsbezeichnung</i>	<i>Ort/Forstamt</i>	<i>Reifejahr</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Probenzahl</i>
SPI Freilassing Hk 802 08	Freilassing	1984	Freila84	5
SHK Uetzer Roterle	Fuhrberg	1982	Fuhrbe82	5
SHK Uetzer Roterle	Fuhrberg	1998	Fuhrbe98	5
SHK Kinzigerle, Gelnhausen	Gelnhausen	1983	Gelnha83	3
Stadtwald Herbstein	Gerbenhain	1998	Gerben98	3
SPL-Uetze	Hadamar	1980	Hadama80	5
SPL-Harzer Gebirgstäler	Harsefeld	2000	Harsef00	5
SPL-Harzer Gebirgstäler	Harsefeld	1967	Harsef67	5
SPL-Harzer Gebirgstäler	Harsefeld	1976	Harsef76	5
SPL-Ostpreußen	Hessisch Lichtenau	1980	HessLi80	5
Hk 802 08	Landsberg/Lech	1980	Landsb80	5
SPL-FA Langburkersdorf	Langburkersdorf	2003	Langbu03	5
SPL-FA Langburkersdorf	Langburkersdorf	2004	Langbu04	5
SPL Laufen 802 08	Laufen	1968	Laufen68	5
SPL Laufen 802 08	Laufen	1984	Laufen84	5
SPL Ochsenhausen Hk 802 08	Ochsenhausen	1983	Ochsen83	5
SPL-Danndorf	Oldendorf	1978	Oldend78	5
SPL-Reinhardshagen Abt.607	Reinhardshagen	2004	Reinh04b	3
SPL-Reinhardshagen Abt.384	Reinhardshagen	1980	Reinh80a	5
SPL-Reinhardshagen Abt.607	Reinhardshagen	1980	Reinh80b	5
SPL Uetze-Wienhausen	Reinhausen	1970	Reinhu70	5
SPL Uetze-Wienhausen	Reinhausen	1972	Reinhu72	5
SPL Uetze-Wienhausen	Reinhausen	1980	Reinhu80	5
SPL-Wehretal Abt. 56 A	Wehretal	2001	Wehre01b	3
SPL-Wehretal Abt. 2580 A	Wehretal	1998	Wehre98a	3
SPL Weilheim Hk 802 07	Weilheim	1983	Weilhe83	5
SHK Kinzigerle, FA Wolfgang	Hanau-Wolfgang	2004	Wolfga04	3
SHK Kinzigerle, FA Wolfgang	Hanau-Wolfgang	1993	Wolfga93	4

Tabelle 9: Fehlerzählungsschätzwerte für 28 Roterlen-Herkünfte (127 Saatgutpartien aus 19 Orten und 16 Reifejahren) anhand der Analysenwerte von DE_29/28, DE_13/12, Cprz_Ms und Nprz_Ms) nach Kreuzvalidierung mit quadratischer Distanzfunktion (vgl. Tab. 2)

Table 9: Error count estimates of 28 origins of black alder (127 seedlots from 19 places of origin and 16 years of maturity) derived from a cross validation of the analysed data of DE_29/28, DE_13/12, Cprz_MS and Nprz_MS using a square discriminant function (see Tab. 2)

Herkunft:	Freila84	Fuhrbe82	Fuhrbe98	Gelnha83	Gerben98	Hadama80
Rate	0.2000	0.2000	0.0000	0.3333	0.0000	0.6000
Herkunft:	Harsef00	Harsef67	Harsef76	HessLi80	Landsb80	Langbu03
Rate	0.8000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4000
Herkunft:	Langbu04	Laufen68	Laufen84	Ochsen83	Oldend78	Reinh04b
Rate	0.4000	0.4000	0.0000	0.2000	0.4000	0.0000
Herkunft:	Reinh80a	Reinh80b	Reinhu70	Reinhu72	Reinhu80	Wehre01b
Rate	0.0000	0.2000	0.0000	0.0000	0.4000	0.3333
Herkunft:	Wehre98a	Weilhe83	Wolfga04	Wolfga93		Mittel
Rate	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000		0.1857
Priori						0.0357

Tabelle 10: Bestimmtheitsmaß und Korrelation zwischen den Deltawerten und Elementgehalten von Knospen / Zapfen / Saatgut von 8 Einzelbäumen der SPL Wehretal beerntet in 2005 (Kn05, Za05) sowie 1991 und 1993 (Sg91, Sg93)

Table 10: R-square and correlation of delta values and element content of buds / cones / seeds from 8 single trees of the seed orchard Wehretal, harvested in 2005 (Kn05, Za05) and 1991 or 1993 (Sg91, Sg93)

<i>Vergleich</i>		<i>DE_13/12</i>	<i>C_Prz_MS</i>	<i>DE_Luft</i>	<i>N_Prz_MS</i>
Kn05/Za05	Bestimmtheit	0,023	0,707	0,538	0,168
	Korrelation	0,151	0,841	0,733	-0,410
Kn05/Sg91	Bestimmtheit	0,012	0,100	0,547	0,097
	Korrelation	0,109	-0,316	-0,739	-0,312
Za05/Sg91	Bestimmtheit	0,089	0,003	0,735	0,140
	Korrelation	0,299	-0,052	-0,858	0,374
Kn05/Sg93	Bestimmtheit	0,074	0,001	0,001	0,106
	Korrelation	-0,271	0,031	0,036	0,325
Za05/Sg93	Bestimmtheit	0,173	0,010	0,051	0,002
	Korrelation	-0,416	0,100	-0,225	0,040

Saatgut / Knospen / Zapfen

In einem Vergleich der Deltawerte und Elementgehalte der Knospen mit den Analysenwerten der am gleichen Baum verbliebenen leeren Zapfen (Abb. 5) sowie mit den Analysenwerten der an diesen 8 Einzelbäumen der Samenplantage Wehretal 1991 oder 1993 geernteten Samen (Tab. 10) ergaben sich Bestimmtheitsmaße oder Korrelationen $> 0,7$ für den Vergleich der Knospen mit den im selben Jahr geernteten Zapfen beim C-Gehalt (Cprz_MS) sowie bei ^{15}N (DE_Luft). Der Vergleich der Analysenwerte der Saatgutpartien mit den Knospen oder Zapfen zeigte nur für das Saatgut des Reifejahres 1991 und die DE-Luft-Werte Korrelationen um 0,7. Ein Rückschluss von den Analysenwerten verschiedener Saatguternten auf den Erntebaum ist somit nicht möglich.



Abb. 5: Leere, nach der Beerntung am Baum verbliebene Zapfen der Roterle

Fig. 5: Empty cones remaining at the tree after the harvest season

4. Anwendung der Stabilisotopen-Methode

Die Stabilisotopen-Methode eignet sich für die Zertifizierung und Kontrolle von Saatgutpartien in der in Abbildung 6 skizzierten Form. Saatgutpartien einer Baumart, die durch ein Stammzertifikat gekennzeichnet sind, gelangen in Saatgutlager und in den Handel. Eine Unterscheidung und Überprüfung der Identität kleinerer Teilmengen ist nach massenspektrometrischer Analyse und Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte möglich. Dazu wird an gesicherten (z. B. durch Rückstellung) Proben eine Kreuzvalidierung mithilfe einer Diskriminanzanalyse durchgeführt.

Die zu verwendenden Variablen dürfen nicht eng miteinander korreliert sein und sollten ein möglichst hohes partielles R-Quadrat aufweisen, das mithilfe einer Step-Disc-Analyse ermittelt werden kann. Da das Probenkollektiv meistens nicht vollständig

vorhanden ist und somit die Messungen nicht in einer Serie erfolgen können, müssen zum Vergleich solche Variablen genutzt werden, die für einen Laborvergleich geeignet sind. Für die Kohlenstoff- und Stickstoffisotope sind dies der DE_13/12 PDB- bzw. der DE_Luft-Wert.

Die ermittelte Diskriminanzfunktion dient dann der Überprüfung der Zugehörigkeit unbekannter Proben zum geprüften Probenkollektiv.

Das Ergebnis der Prüfung kann, wie in Abbildung 6 gezeigt, die Zugehörigkeit als richtig oder falsch bestätigen. Falls die Proben der Gruppe „Sonstige“ zugeordnet werden, bleibt die Zuordnung unbestimmt.

In dieser Form wird es möglich sein, auch falsch deklarierte Proben als nicht einem Probenkollektiv zugehörig zu kennzeichnen.

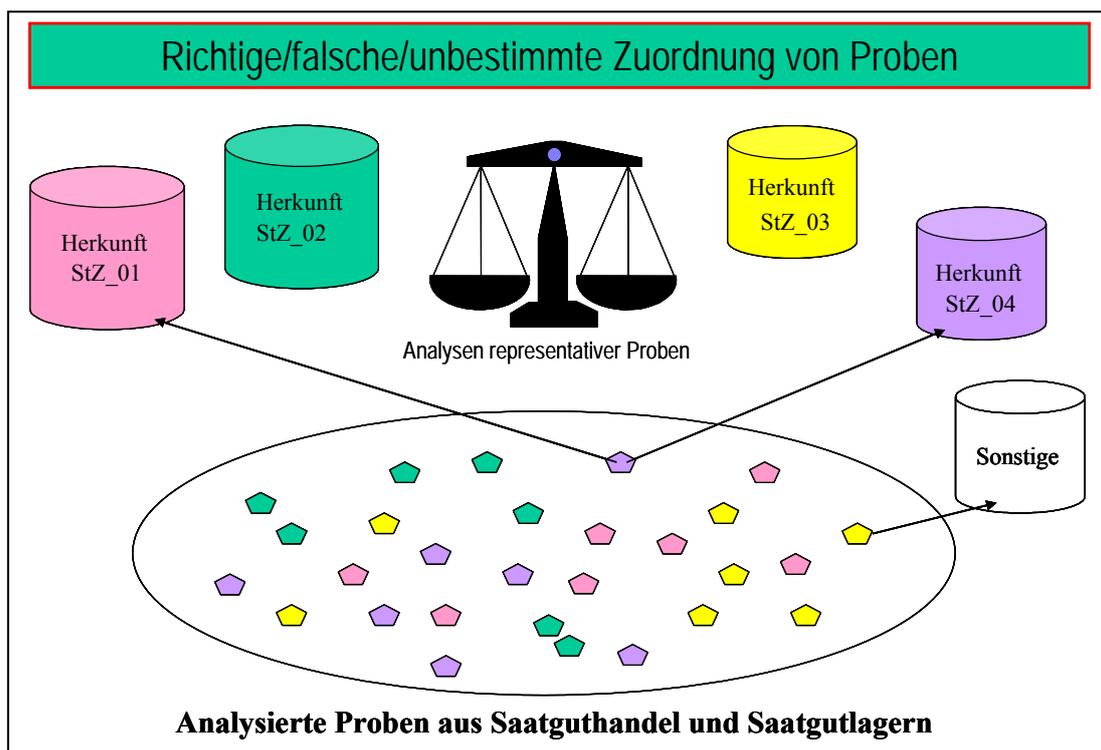


Abb. 6: Schema der Anwendung der Stabilisotopen-Methode für Zertifizierung und Kontrolle

Fig. 6: Application of stable isotope analysis for certification and control purposes

Tabelle 11: Klassifizierung von außerhessischen Buchen-Saatgutproben mithilfe einer quadratischen Diskriminanzfunktion der Variablen DE_13_12, DE_Luft, Cprz_WLD und Nprz_WLD

Table 11: Classification of nonhessian beech seedlots by use of a square discriminant function (variables: DE_13_12, DE_Luft, Cprz_WLD and Nprz_WLD)

Klassifizierungsergebnisse mit 3 Nächste Nachbarn
 Posteriori-Wahrscheinlichkeit für Zugehörigkeit zu Herkunft

richtige Herkunft	falsch deklariert	Klassifiziert in Herkunft		Heli	Lamp	Rom	Schlue	Weil
Schleswig	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Schleswig	Heli	Lamp	*	0.000	0.5946	0.4054	0.000	0.000
Schleswig	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Schleswig	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Radolfzell	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Radolfzell	Heli	Lamp	*	0.000	0.5946	0.4054	0.000	0.000
Rothemuende	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Rothemuende	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Stavenhagen	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Stavenhagen	Heli	Rom	*	0.000	0.2683	0.7317	0.000	0.000
Templin	Heli	Lamp	*	0.000	0.5946	0.4054	0.000	0.000
Templin	Heli	Lamp	*	0.000	0.5946	0.4054	0.000	0.000

* Falsch klassifizierte Beobachtung

Um diese Vorgehensweise zu demonstrieren, wurden außerhessische Saatgutproben von Buche des Reifejahres 2006 als Buchenherkunft „Hess. Lichtenau (Heli)“ falsch deklariert. Nach massenspektrometrischer Analyse wurde die Zugehörigkeit dieser falsch deklarierten Proben zu dem Kollektiv überprüft, das durch die Beerntung unter Einzelbäumen der fünf hessischen Bestände im gleichen Reifejahr gewonnen wurde und deren Analysenwerte (siehe Abb. 4) vorlagen. Das Ergebnis der Prüfung findet sich in Tabelle 11.

Alle zwölf Proben aus den Forstämtern Schleswig, Radolfzell, Rothemünde, Stavenhagen und Templin, die als „Hess. Lichtenau (Heli)“ deklariert worden waren, konnten anhand der Analysenwerte als falsch klassifiziert erkannt werden (Tab. 11). Die Proben wiesen teils größere Ähnlichkeit mit den Proben der Forstämter Lampertheim und Romrod jedoch keine Ähnlichkeit mit der deklarierten Herkunft auf. Eine positive Zuordnung wäre nur mit Referenzproben (bei gleichem Reifejahr) aus den Ursprungsforstämtern möglich geworden.

5. Zusammenfassende Diskussion

Wie FRY (2006) am Beispiel des Schwefels beschreibt, zirkulieren Elemente in isotopen Formen seit 3,5 Milliarden Jahren in der Biosphäre. Prozesse der Fraktionierung und Mischung produzierten charakteristische Verteilungen leichter und schwerer Isotope im Verlauf der Evolution der Biosphäre und bewirken auch in Gegenwart und Zukunft die An- und Abreicherung von Isotopen in biologischem Material.

Unterschiede zwischen Pflanzenarten beruhen z. B. auf unterschiedlicher CO₂-Fixierung bei C₃-/C₄-Pflanzen und Crassulaceen (FARQUHAR et al. 1989), sie können jedoch auch durch den unterschiedlichen Konsum von Gasen aus abgereicherten fossilen Brennstoffen entstehen. Messungen der Kohlenstoff- und Sauerstoffisotope im Phloemsaft von Buchen zeigen, dass die Aktivität der Spaltöffnungen beide Variablen entscheidend beeinflusst (KEITEL et al. 2003). Organ- und gewebespezifische Unterschiede ergeben sich durch unterschiedlichen Gehalt des Langzeit-Kohlenstoffspeichers Fett und durch Zellwandkomponenten wie Lignin und Cellulose (DEINES 1980). Bei dem angewandten Messverfahren (IRMS; isotope ratio mass spectroscopy) kann die Linearität der Messwerte durch Verwendung interner Feststoffstandards

sichergestellt werden. Akkreditierte Labore garantieren die Wiederholbarkeit ihrer Messungen in engen Grenzen. In Laborvergleichen, wie von KLIMMEK (2003) für Stabilisotopen des Weines beschrieben, ergaben sich für Mehrfachmessungen einer Probe Standardabweichungen von 0,05 bis 0,15 Promille.

Für die Kontrolle der Authentizität von Saatgutpartien, deren Herkunft bzw. Erntebestand und Reifejahr im Stammzertifikat bezeichnet ist, benötigt man Eigenschaften, die nur schwer oder gar nicht veränderbar sind. Genetische Methoden (KONNERT 2006) und die Stabilisotopen-Methode erfüllen diese Forderung und ergänzen sich, da auch Klone mit gleicher genetischer Eigenschaft in ihrem Stabilisotopen-Muster vom Anzuchtort geprägt werden. Umgekehrt ist ein Rückschluss vom Saatgut auf den abgeernteten Baum mit Stabilisotopen-Mustern nur schwer möglich, jedoch anhand identischer Allele im Ausschlussverfahren zu erbringen.

Die Stabilisotopen-Methode bietet zudem den Vorteil, dass unabhängig von den genetischen Strukturen der Saatgutpartien mit hinreichender Wahrscheinlichkeit die Zugehörigkeit zu einer definierten Saatgutpartie bestimmt werden kann, wenn Ver-

gleichsmöglichkeiten vorliegen und eine multivariate Auswertung der Analyseergebnisse erfolgt. Eine Erzeugergemeinschaft, die Rückstellproben sammelt, verfügt über solche Vergleiche und kann somit ihre Erzeugnisse gegenüber Dritten bzw. Fremdlieferanten abgrenzen. Die Lagerung der Referenzproben stellt für die Stabilisotopen-Methode geringe Anforderungen, da getrocknete Proben in geschlossenen Behältnissen bei beliebiger gleichmäßiger Temperatur aufbewahrt werden können. Wenn eine ausreichende Anzahl von Stichproben sofort nach der Ernte analysiert wird und dann alle Stabilisotopen-Werte und Elementgehalte vorliegen, würde sich zumindest eine kurzfristige Aufbewahrung erübrigen. Da an aufbewahrten Referenzproben jedoch auch zusätzliche Untersuchungen mit derzeit noch unüblichen Verfahren (z. B. seltene Erden) möglich werden, ergibt sich durch die Probenhaltung eine verbesserte Überprüfbarkeit. Bei Kontrollfällen könnten mit denselben Referenzproben in mehreren Laboren Untersuchungen durchgeführt und Ergebnisse bestätigt werden.

Die Probenahme muss für die Stabilisotopen-Methode ähnlich wie von SCHNECK & UHLMANN (2007) für Zwecke der Keimprüfung beschrieben erfolgen, da die Repräsentativität der Probenahme nur so sichergestellt werden kann. Anders als bei genetischen Untersuchungen müssen jedoch nicht einzelne Individuen analysiert werden, um Allelhäufigkeiten bestimmen zu können. Vielmehr genügte es, bei den hier beschriebenen Arten Buche und Roterle sowie bei Vogelkirsche (GEBHARDT & SCHÖNFELDER 2008) die Stabilisotopen-Werte und Elementgehalte in Mischproben

oder mit mindestens 20 Samen pro Einzelbaum zu analysieren. Eine Zuordnung von Einzelbaumernten zu Beständen setzt voraus, dass für jeden beernteten Baum Analysenwerte vorliegen. Um die Repräsentativität von Proben größerer Saatgutpartien sicherzustellen, sind mehrfache Ziehungen und Wiederholungen der Analysen erforderlich.

Die hier beschriebenen Messwerte der Stabilisotopen von Kohlenstoff und Stickstoff bewegen sich im Rahmen der natürlichen Verbreitung (FRY 2006) und zeigen eine von GESSLER et al. (2005) an Buchenproben aus Baden-Württemberg, von FÖRSTEL (2003) an Weizen sowie von GEBHARDT & GROTEHUSMANN (2005) an Einzelbaumernten von Winterlinden in Hessen beschriebene standörtliche Variation. Wie bei Winterlinde bestätigten sich auch bei Buche und Roterle signifikante Unterschiede zwischen den Reifejahren, so dass ein Rückschluss auf den Ernteort nur unter Berücksichtigung des Reifejahres möglich ist.

Für die Unterscheidung und Zuordnung von Teilmengen der durch Stammzertifikate definierten Saatgutpartien bei Kontrollfällen ist eine möglichst geringe Fehlerrate nötig. Eine Erweiterung der Stabilisotopen-Analytik durch die Überprüfung von organischem Sauerstoff-, Schwefel- und Wasserstoffisotopen ist in der Lebensmittelanalytik bereits Routine und kann somit die Präzision der Aussagen entscheidend verbessern. Die hier vorgestellte Stabilisotopen-Methode kann sowohl Zertifizierungsverfahren (HAASE et al. 2007) als auch die amtliche Kontrolle wirksam unterstützen.

Danksagung

Der Autor dankt dem Kompetenzzentrum für stabile Isotope der Univ. Göttingen (KOSI) für die Durchführung der Analysen.

Literatur

- BONER, M.; FÖRSTEL, H. (2001): Überprüfung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotope im Schaum- und Perlwein. Der Deutsche Weinbau, Heft 15: 18 – 23
- DEINES, P. (1980): The isotopic composition of reduced organic carbon. In P. FRITZ and J.C. FONTES (eds.): Handbook of Environmental Isotope Geochemistry Vol. I: The Terrestrial Environment. Elsevier, Amsterdam, New York: 329-407
- FARQUHAR, G.D., EHLERINGER, J.R.; HUBICK, K.T. (1989): Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40: 503– 537
- FÖRSTEL, H. (2002): Mit Isotopen Fingerabdruck den Lebensmitteln auf der Spur. BioWorld (1): 26-27
- FÖRSTEL, H. (2003): Kontrolle der Herkunft mittels Stabilisotopen. BfN-Skripten 96: 82-91
- FRY, B. (2006): Stable isotope ecology. Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA
- GEBHARDT, K.; GROTEHUSMANN H. (2006): Unterscheidung von Saatgutpartien der Winterlinde mittels Stabilisotopen. In HESSEN-FORST (Hrsg.): Forstliche Genressourcen als Produktionsfaktor. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung vom 20. bis 22. Oktober 2005 in Fulda. Hessen-Forst, Hann. Münden: 153-159
- GEBHARDT, K.; SCHÖNFELDER, E. (2008): Differentiation of seedlots of wild cherry by the analysis of stable isotopes (^{13}C , ^{15}N). Austrian Journal of Forest Science 125: 121-134
- GESSLER, A.; RENNENBERG, H.; ALDINGER, E.; DOUNAVI, A. (2005): Herkunftsbestimmung mit Hilfe von DNA- und Isotopenanalytik., unveröffentlicht
- HAASE, B.; HOSIUS, B.; LEINEMANN, L. (2007): Das FfV-Verfahren stellt sich vor. AFZ-Der Wald (16): 852-853
- 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
- SCHNECK, D.; UHLMANN, A. (2007): Hinweise zur Probenahme für die Untersuchung von Forstsaatgut. AFZ-Der Wald (16): 846-847
- KEITEL, C.; ADAMS, M.A.; HOLST, T.; MATZARAKIS, A.; MAYER, H.; RENNENBERG, H.; GEBLER, A. (2003): Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomata conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). Plant, Cell and Environment 26: 1157–1168
- KLIMMEK, A. (2003): Bestimmung des geografischen Ursprungs von Weinen mittels Multi-komponentenanalyse und multivariater Statistik. Diss. TU Berlin
- KONNERT, M. (2006): Erfolge (und Grenzen) bei dem Herkunftsnachweis mittels Isoenzym- und DNA-Analysen. In HESSEN-FORST (Hrsg.): Forstliche Genressourcen als Produktionsfaktor. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung vom 20. bis 22. Oktober 2005 in Fulda. Hessen-Forst, Hann. Münden: 49-58
- KONNERT, M.; BEHM, A. (1999): Genetische Strukturen einer Saatgutpartie –Einflussfaktoren und -möglichkeiten. Beitr. Forstw. u. Landschaftsökol. 33 (4): 152-157

Anschrift des Autors:

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

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?

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	http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm

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 MgCl₂ (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 ₂ 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

MgCl₂ (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 ₂ pro Ansatz	µl DNA pro Ansatz		Annealing-Temperatur in °C	Zykluswiederholungen	
		S (20ng/µl)	K (10ng/µl)		S	K
MFC5	1,75	4	1	57	27	27
MFC11	2	4	4	48	37	37
FS1-3	2,1	3	1	56	27	29
FS1-15	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 „Privatallelzahl“ 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 χ^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

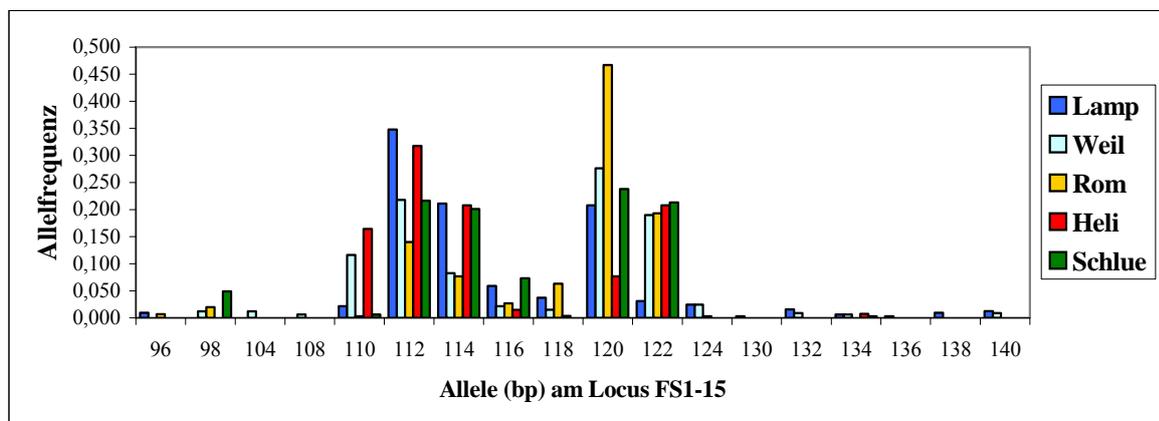


Abb. 2: Allelfrequenzen für den Locus FS1-15 in der Buche (Bestände: Lamp: Lampertheim, Weil: Weilburg, Rom: Romrod, Heli: Hess. Lichtenau, Schlue: Schlüchtern)

Fig. 2: Allele 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

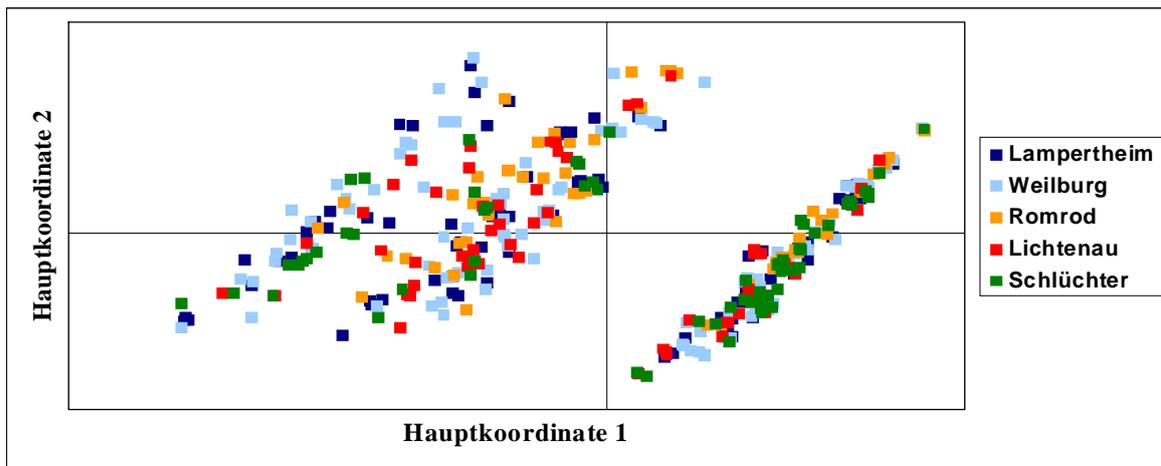


Abb. 3: Hauptkoordinatenanalyse mit den Multilocus-Genotypen aus allen fünf untersuchten Buchenbeständen, die hier mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet sind
 Fig. 3: The Principal Coordinates Analysis with all multilocus genotypes of the five studied beech populations which are marked with different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

zen 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.

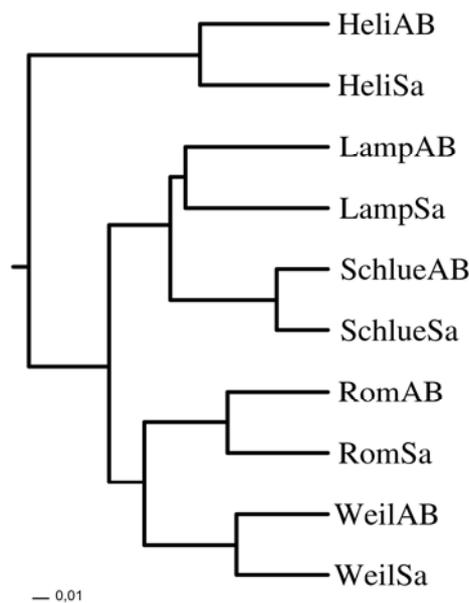


Abb. 4: „Unrooted tree“ der UPGMA-Methode („Unweighted Pair Group Method using Arithmetic mean“) der Multilocus Genotypen der Buche aus den fünf Beständen. (Heli: Hess. Lichtenau, Lamp: Lampertheim, Schlue: Schlüchtern, Rom: Romrod, Weil: Weilburg, AB: Altbäume, Sa: Samenschalen)

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	56,52 %	8,70 %	8,70 %	-	17,39 %
Hess. Lichtenau	14,81 %	48,15 %	11,11 %	-	14,81 %
Weilburg	10,53 %	10,53 %	26,32 %	15,79 %	21,05 %
Romrod	11,11 %	11,11 %	-	22,22 %	27,78 %
Schlüchtern	19,05 %	4,76 %	14,29 %	-	47,62 %

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.; POSPISKOVA, 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 36th 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

Umsetzung und Verbesserung des ZüF-Verfahrens mit Hilfe genetischer Analysen und der Stabilisotopen-Methode am Beispiel von Bergahorn, Fichte und Weißtanne

Monika Konnert, Eva Cremer, Hilmar Förstel

Zusammenfassung

Zur Verbesserung der Herkunftssicherheit bei forstlichem Vermehrungsgut wurde 2002 das Zertifizierungssystem „ZüF“ auf privatrechtlicher Basis in die Praxis umgesetzt. Es basiert im Wesentlichen auf der Ziehung von Referenzproben und deren genetischem Vergleich. Das System soll ständig neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen angepasst werden. Deshalb wurden für Bergahorn, Fichte und Tanne erstmals molekulare Marker der cp- und Kern-DNA auf ihre Eignung zum Einsatz in ZüF erprobt. Zudem wurde geprüft, ob durch Untersuchungen mit Stabilisotopen eine Erhöhung der Aussagekraft hinsichtlich der Identitätssicherung erreicht werden kann. Für Bergahorn und Tanne wurden Mikrosatelliten der Kern-DNA, bei Fichte sog. EST-Marker, erfolgreich an ZüF-Proben getestet. Durch die Verwendung von Isoenzymen und DNA-Markern kann ein größerer Teil des Genoms untersucht werden, was eine höhere Aussagekraft hinsichtlich der Herkunftsüberprüfung bedeutet. Auch stabile Isotope können bei der Überprüfung von Saatgutpartien grundsätzlich erfolgreich eingesetzt werden. Sie eignen sich jedoch derzeit nicht für den Vergleich Saatgut-Erntebaum und Saatgut-Pflanzen.

Schlagwörter: forstliches Vermehrungsgut, DNA-Marker, Stabilisotopen, Zertifizierung

Implementation and improvement of the ZüF certification system by genetic analysis and by analysis of stable isotopes, shown for the species sycamore, spruce and silver fir

Abstract

In order to improve the provenance identity of forest reproductive material a certification system was operationally established in 2002 - called ZüF. It is essentially based on reference samples and on the comparison of their genetic composition. This system should be constantly adjusted regarding the recent scientific knowledge. For this reason, molecular markers of chloroplast and of nuclear DNA were used in the tree species sycamore, spruce and silver fir in order to test their applicability for the practicability within the ZüF-system. Additionally, it was proofed if a more significant guaranty of identity could be obtained by means of stable-isotope analyses. In sycamore and in silver fir, nuclear microsatellites and in spruce so-called expressed-sequence-tag marker (EST) were successfully applied to ZüF-samples. By using isozyme markers as well as DNA markers it is possible to look at a bigger part of the genome implying a higher significance for the provenance control. Stable isotope can also be successfully used for this aim in general. They are, however, neither suited for the comparison of seed samples and harvested tree nor for the comparison seed samples and plants.

Key words: forest reproductive material, DNA-marker, stable isotopes, certification

1. Einleitung

Seit 2003 gibt es in Süddeutschland ein auf freiwilliger und privatrechtlicher Basis in die Praxis umgesetztes Zertifizierungssystem für forstliches Vermehrungsgut, das ZüF-Verfahren. „ZüF“ steht für Zertifizierung überprüfbarer forstliche Herkunft. Ziel des Systems ist es, Vermehrungsgut bereitzustellen, dessen Herkunft (Abstammung) mit hoher Sicherheit nachgewiesen (überprüft) werden kann. Das ZüF-Verfahren beruht im Wesentlichen auf der Sicherstellung von Referenzproben an verschiedenen Stellen des Produktionsprozesses bei der Ernte bis zur fertigen Pflanze und deren genetischem Vergleich. Am wichtigsten sind dabei die bei der Ernte gezogenen Saatgutproben (einzelbaumweise und / oder als Mischprobe) und die bei der Auslieferung der Pflanzen sichergestellten Pflanzenproben. Der genetische Vergleich zwischen diesen beiden Stadien derselben Partien dient als Identitätsnachweis (BEHM 2004; FRANKE 2004; FROMM & KONNERT 2004; HUSSENDÖRFER 2005; KONNERT & BEHM 2006; KONNERT & HUSSENDÖRFER 2002; KONNERT 2006).

Die verschiedenen Verfahrensschritte sind inzwischen genau dokumentiert und in Handlungsanweisungen niedergelegt. Details finden sich unter www.zuef.de. Zur Bestimmung genetischer Strukturen wurden anfangs nur Isoenzymanalysen verwendet. Es war aber von Beginn an festgelegt, dass das ZüF-System ständig den neuen Entwicklungen in der Wissenschaft angepasst werden soll, um einen möglichst hohen Grad an Herkunftssicherheit garantieren zu können. Die zahlreichen Fortschritte auf dem Gebiet der molekulargenetischen Marker sollten genutzt werden, um die genetischen Kontrolluntersuchungen schneller und sicherer zu machen. Um dies zu testen, wurden die Baumarten Bergahorn, Fichte und Weißtanne ausgewählt. Bei Fichte waren die auf der Basis von Isoenzymen festgestellten genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Erntepartien nicht

sehr hoch, was zu Falschzuordnungen führen kann. Bei Tanne ist die isoenzymatische Variation vergleichsweise gering, und bei Bergahorn ist die Bestimmung genetischer Strukturen mit Isoenzym-Genmarkern wegen der Polyploidie schwierig.

Zudem wurde geprüft, ob durch Untersuchungen mit Stabilisotopen eine Erhöhung der Aussagekraft hinsichtlich der Identitätssicherung erreicht werden kann. Dabei war auch der Rückschluss auf den Erntebestand im Fokus. Dies ist vor allem bei Buche und Eiche mit Hilfe von Genmarkern schwierig und aufwendig, weil die Ernten in meist sehr großen Beständen nicht einzelbaumweise, sondern durch Auslegen von Netzen oder durch Einsammeln durchgeführt werden.

2. Vorgehensweise

Als „Referenz- oder Vergleichsproben“ bezeichnet man Stichproben, die aus einer Partie von Saat- oder Pflanzgut an verschiedenen Stellen des Produktionsprozesses von forstlichem Vermehrungsgut gezogen werden und die zur Prüfung der Identität von Saat- und Pflanzgut über den Vergleich ihrer Erbanlagen herangezogen werden. Die im Rahmen des ZüF-Zertifizierungssystems anfallenden Referenzproben werden bezeichnet als:

- Probe R1 – gezogen unmittelbar nach der Ernte aus dem gesamten Erntegut
- Probe R2 – bei der Ernte einzelbaumweise sichergestellte Probe
- Probe R3 – gezogen aus dem aufbereiteten Saatgut
- Probe P – gezogen aus der ausgelieferten Pflanzenpartie

Diese Bezeichnungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit übernommen.

Zur Auswahl molekulargenetischer Marker und zur Überprüfung der Eignung von

Stabilisotopen für eine Anwendung im Rahmen des ZüF-Zertifizierungssystems wurde folgendermaßen vorgegangen:

Es wurden zuerst die genetischen Strukturen der Referenzproben (fallweise R1, R2, R3 und P) mit Hilfe von Isoenzymen und den zu testenden DNA-Markern bestimmt. Die für die einzelnen Baumarten eingesetzten Marker werden unter Punkt 3. Ergebnisse beschrieben.

Eine Teilprobe von jeder Referenzprobe wurde an die Firma Agroisolab zur Bestimmung des Isotopenmusters geschickt. Details zur Isotopenanalyse finden sich z. B. in dem Beitrag von FÖRSTEL (S. 16) und bei BONER & FÖRSTEL (2004) sowie KEHR (2007).

Ausgehend von den allelischen Strukturen wurden zuerst die genetischen Unterschiede zwischen den Referenzproben R1 und R3 derselben Partie quantifiziert. Berechnet wurde der genetische Abstand nach GREGORIUS (1974). Diese Abstandswerte wurden mit U1 bezeichnet. Mittels statistischer Tests (Chi²-Test, G-Test, Permutationstest) wurden die Werte auf ihre Signifikanz hin überprüft. In einem zweiten Schritt wurden die Abstandswerte zwischen den Referenzproben aus unterschiedlichen Erntepartien berechnet und mittels statistischer Tests abgesichert. Diese Abstandswerte wurden mit U2 bezeichnet. Nur Marker, für die U2 deutlich größer ist als U1, sind zum Einsatz im ZüF-System geeignet, weil dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Falschzuordnung gering ist.

Das Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) sieht vor, dass bei jeder Ernte mindestens 20 Bäume beerntet werden müssen (in einigen Ausnahmefällen 10 Bäume). Die für ZüF bei vielen Baumarten sichergestellten Einzelbaumproben R2 können zur Überprüfung dieser Anzahl herangezogen werden. Deshalb wurden die ausgewählten Marker auch hinsichtlich ihres Potentials zur Unterscheidung der Erntebäume überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Genetische Untersuchungen

3.1.1 Bergahorn

Für drei nach den Regeln des ZüF geernteten Bergahorn-Partien aus Bad Königshofen, Weißenhorn und Marquartstein, wurden die bei der Ernte sichergestellten Mischproben (R1) und die nach der Reinigung des Saatgutes gezogenen Proben (R3) mittels Genmarker untersucht. Für die Bestände Bad Königshofen und Weißenhorn wurden zudem die Genotypen der Erntebäume anhand von einzelbaumweise sichergestellten Knospenproben bestimmt. Für die Partie Marquartstein, von der die Samen bereits 2002 geerntet worden waren, wurden zudem zweijährige Pflanzen aus dem Pflanzgarten Laufen untersucht (P-Probe) und mit den Samenproben R1 und R3 verglichen.

Bei den genetischen Untersuchungen kamen folgende Marker zum Einsatz:

- Isoenzymanalysen - 12 Genorte: PGI-B, PGI-C, ADH-A, ADH-B, AAT-A, AAT-B, AAT-C, IDH-A, MNR-A, PGM-A, PGM-B, PGM-D (zur Methodik und zur genetischen Kontrolle siehe KONNERT et al. 2001)
- Kern-Mikrosatelliten - 7 Genorte: Map2, Map9, Map10, Map12, Map33, Map40, Map46 (PANDEY et al. 2004)
- Chloroplast-Mikrosatellit - 1 Genort: ccmp10 (WEISING & GARDNER 1999).

Der Test der sieben zur Verfügung stehenden Kern-Mikrosatelliten-Marker hat gezeigt, dass sich vier Mikrosatelliten aufgrund der Reproduzierbarkeit, Qualität und Auswertung für die Routine eignen. Es sind dies Map2, Map12, Map33 und Map40. Die populationsgenetischen und statistischen Berechnungen im Folgenden beziehen sich deshalb nur auf diese vier genannten Mikrosatelliten-Orte.

Vergleich der Referenzproben mittels Isoenzymanalysen und Kernmikrosatelliten

Aus Tabelle 1 sind die genetischen Unterschiede zwischen Referenzproben, die aus derselben Erntepartie unmittelbar nach der Ernte (R1) und nach der Aufbereitung des Saatgutes im Betrieb (R3) gezogen wurden und zwischen Referenzproben, die aus unterschiedlichen Erntepartien unmittelbar nach der Ernte gezogen wurden, zu ersehen. Diese Unterschiede werden durch die genetischen Abstände und die Anzahl der Genorte mit signifikanten Abstandswerten deutlich. Die

genetischen Abstände zwischen den Referenzproben derselben Partie (U1) sind deutlich geringer als zwischen den Referenzproben unterschiedlicher Partien (U2). Zudem sind beim Vergleich unterschiedlicher Partien viele Einzellocus-Abstandswerte mit mindestens 95 %-Wahrscheinlichkeit (mehrfach aber deutlich höherer) signifikant. Dies zeigt sich sowohl für die Isoenzym-Daten als auch für Kernmikrosatelliten-Daten. Für das Zertifizierungssystem „ZüF“ ist dies eine wichtige Voraussetzung für die Eignung der gewählten Marker bei der Herkunftssicherung.

Tabelle 1: Genetische Abstände zwischen Saatgut-Referenzproben derselben Erntepartie (U1) und unterschiedlicher Erntepartien (U2) sowie Anzahl Genorte mit signifikanten Werten für drei Bergahorn-Ernten

Table 1: Genetic distances between seed reference samples from the same seed lot (U1) and from different seed lots (U2) and number of loci with statistical significant values for three seed harvest of sycamore

Verglichene Samenproben	Genetischer Abstand (U _x) in % (Anzahl Genorte mit U signifikant)	
	Isoenzyme (12 Genorte)	Mikrosatelliten (4 Genorte)
U ₁ = innerhalb einer Erntepartie		
R1 zu R3 (Bad Königshofen)	3,3 (0)	18,1 (1)
R1 zu R3 (Weißenhorn)	3,2 (0)	17,9 (0)
R1 zu R3 (Marquartstein)	3,3 (0)	22,0 (1)
U ₂ = zwischen Erntepartien		
R1 (Bad Königshofen) zu R1 (Weißenhorn)	5,8 (7)	35,7 (4)
R1 (Bad Königshofen) zu R1 (Marquartstein)	11,1 (11)	41,8 (3)
R1 (Weißenhorn) zu R1 (Marquartstein)	10,0 (9)	40,5 (3)

Anfänglich wurde bei den Mikrosatelliten mit einer Stichprobe von 48 Proben pro Partie gearbeitet. Es hat sich aber gezeigt, dass diese Probenanzahl für statistisch abgesicherte Ergebnisse nicht ausreichend ist. Deshalb wurde die Stichprobengröße pro

Partie auf 96 erhöht. Neben den signifikanten genetischen Abständen zwischen verschiedenen Herkünften unterscheiden sich diese auch in der Häufigkeit bestimmter Genvarianten deutlich voneinander (Abb. 1a und 1b).

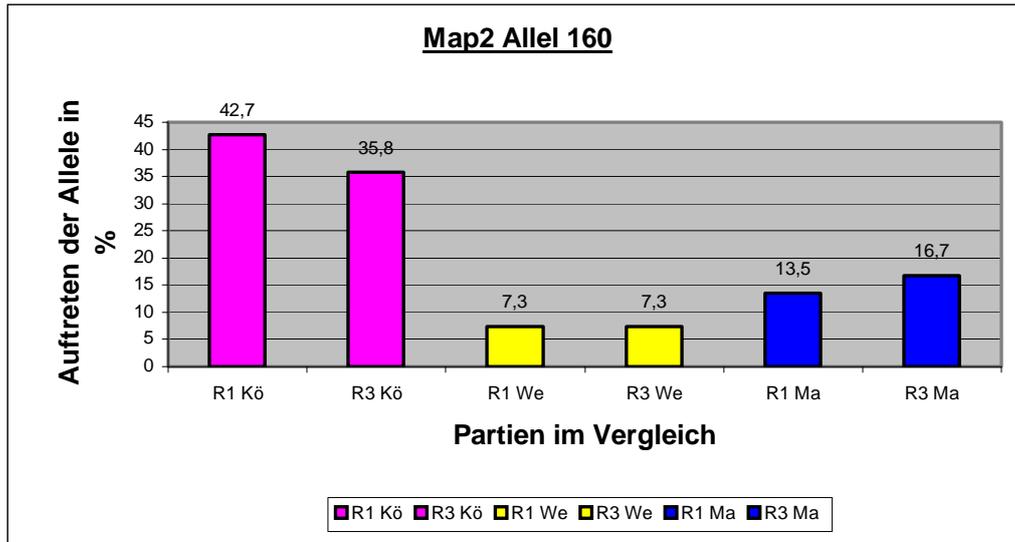


Abb. 1a: Häufigkeiten des Allels 160, Genort Map2, in den Referenzproben R1 und R3 der drei Bergahorn-Herkünfte

Fig. 1a: Frequencies of allele 160, gene locus Map2, in reference samples R1 and R3 for three sycamore samples

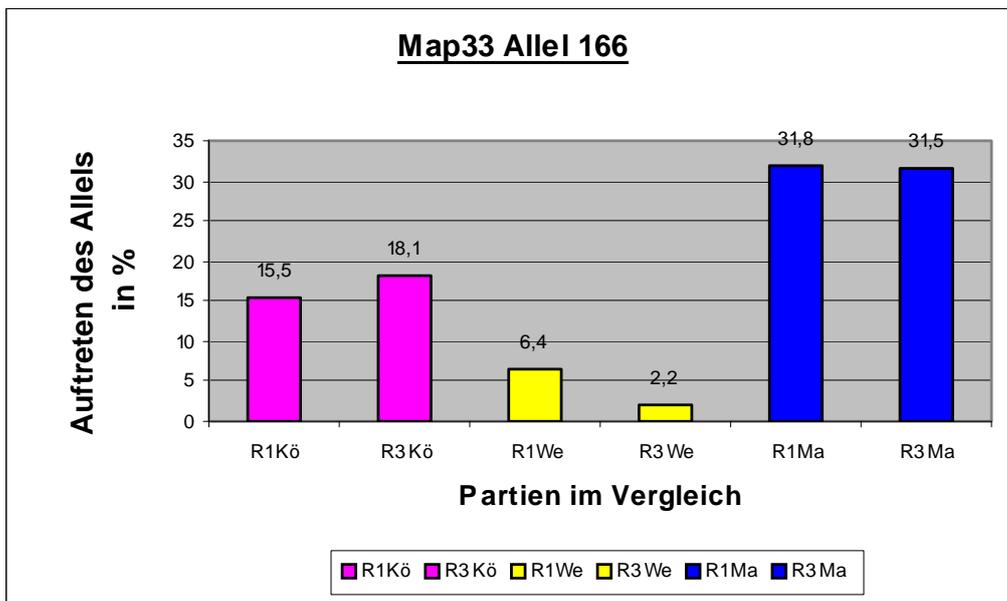


Abb. 1b: Häufigkeiten des Allels 163, Genort Map33, in den Referenzproben R1 und R3 der drei Bergahorn-Herkünfte

Fig. 1b: Frequencies of allele 163, gene locus Map33, in reference samples R1 and R3 for sycamore samples

So liegt z. B. die Häufigkeit der Variante 160 am Genort Map2 in Bad Königshofen sowohl bei der R1-Probe als auch bei R3-Probe über 35 %, in Marquartstein dagegen bei ca. 15 % und in Weißenhorn nur bei 7 %.

Das Allel 166 am Genort Map33 ist in Marquartstein doppelt so häufig als in Bad Königshofen und mehr als 5 mal so häufig als in Weißenhorn (Abb. 1b). Die Beispiele könnten fortgesetzt werden. Auch dies ist

eine wichtige Voraussetzung dafür, dass man diese Marker bei der Herkunftssicherung in dem Zertifizierungssystem „ZüF“ verwenden kann.

Somit wurden für Bergahorn geeignete nukleare Mikrosatelliten-Genmarker gefunden, die man erfolgreich zur Überprüfung der gesetzlichen Vorgaben hinsichtlich der Mindestanzahl an Erntebäumen je Partie und zur Identitätssicherung im Rahmen eines auf Referenzproben gestützten Herkunftssicherungssystems einsetzen kann. Dabei sollte aber die Anzahl der untersuchten Individuen je Kollektiv nicht zu gering sein. Unserer Einschätzung nach sollte der Stichprobenumfang pro Partie nicht kleiner als 100 sein, um statistisch sichere Aussagen zu erhalten. Da die Trennung der Mikrosatelliten beim tetraploiden Bergahorn viel einfacher und sicherer ist, als die der Isoenzyme und zudem unabhängig von der Lagerzeit, sollte man bei dieser Baumart die DNA-Mikrosatelliten-Marker bei genetischen Kontrolluntersuchungen bevorzugen.

Der Einsatz des Chloroplasten-Mikrosatelliten *ccmp10* hat gezeigt, dass sich am Beispiel Bayern deutlich zwei Haplotypen differenzieren lassen (KONNERT 2006). Dieser Markertyp kann somit im Verdachtsfall zusätzlich verwendet werden, um eine (erste) großräumige Zuordnung von Proben vorzunehmen.

Die genetischen Abstände zwischen den Samenproben R1 bzw. R3 und der Pflanzenprobe bei der Partie Marquartstein betragen 3,1 % bzw. 3,6 % bei Isoenzymen und 15 % bzw. 20 % bei Mikrosatelliten. Sie sind somit ähnlich denen zwischen R1 und R3. Das heißt, dass mit diesen Markern die Überprüfung der Abstammung der Pflanzen aus Saatgut möglich ist.

Trennung der Einzelbäume eines Saatguterntebestandes mittels Kernmikrosatelliten

Das Potential zur Unterscheidung von Einzelindividuen (ihre Identitätswahrscheinlichkeit) - errechnet an 55 Individuen - liegt für die 4 genannten Marker bei 0,00008. Dies bedeutet, dass in nur 8 von 100 000 Fällen zwei zufällig gezogene Individuen den gleichen Multilocus-Genotyp zeigen, und bestätigt damit die Eignung dieser Marker-Kombination zur Individualdifferenzierung.

Ist die Anzahl der beernteten Bäume sehr hoch, kann es allerdings vorkommen, dass einzelne Bäume identische Multilocus-Genotypen zeigen. Bei dem Bestand Weißenhorn, in dem 53 Bäume beerntet wurden, konnten zwei Bäume mittels der sieben hochvariablen Mikrosatelliten nicht getrennt werden (Baum 34 und 35). Auch die zusätzlichen Isoenzymuntersuchungen mit neun sehr variablen Genorten, führten zu keinen weiteren Unterscheidungsmöglichkeiten. Daher ist die Wahrscheinlichkeit in diesem Fall sehr hoch, dass die Zweigproben nicht von zwei, sondern nur von einem Baum stammen, zumal es sich auch um fortlaufende Nummern handelt.

Es kann aber festgehalten werden, dass man bei Bergahorn durch die Analyse dieser sieben Kern-Mikrosatelliten fallweise auch in Kombination mit Isoenzymen die gesetzliche Vorgabe von mindestens 20 Erntebäumen je Ernte sicher überprüfen kann.

3.1.2 Fichte

Bei Fichte wurden R1- und R3-Referenzproben aus drei ZüF-Ernten der Herkunft Altötting, Weißenhorn und Ravensburg untersucht. Von der Herkunft Altötting wurden neben den Saatgutproben auch Proben von verschulten Sämlingen (2+1) aus dem Pflanzgarten Laufen einbezogen.

Für die genetischen Untersuchungen wurden folgende Marker verwendet:

- Isoenzymanalysen - 17 Genorte: AAT-A, AAT-B, AAT-C, FEST-B, IDH-A, IDH-B, MNR-B, MNR-C, PGM-A, PGI-B, LAP-B, MDH-A, MDH-B, MDH-C, SDH-A, 6-PGDH-B, 6-PGDH-C (KONNERT & MAURER 1995)
- EST-Marker (expressed-sequence-tag marker) – 13 Loci: PA0005, PA0034, PA0043, PA0055, PA0066, SB08, SB16, SB17, SB42, SB51, SB58, SB70, SB72 (PERRY & BOUSQUET 1998; PERRY et al. 1999; SCHUBERT et al. 2001)

Der Test der EST-Marker hat gezeigt, dass der Locus SB08 in allen untersuchten Proben keine Variation zeigt (monomorph ist).

Vergleich der Referenzproben mittels Isoenzymanalysen und EST-Markern

In Tabelle 2 sind die genetischen Abstände und die Anzahl Genorte mit signifikanten Abständen bei mindestens 95 %-Wahrscheinlichkeit zwischen Referenzproben, die aus derselben Erntepartie unmittelbar nach der Ernte (R1) und nach der Aufbereitung des Saatgutes im Betrieb (R3) gezogen wurden, sowie zwischen Referenzproben, die aus unterschiedlichen Erntepartien unmittelbar nach der Ernte gezogen wurden, dargestellt.

Die genetischen Unterschiede zwischen Referenzproben derselben Partie sind mit bis zu 2,2 % für Isoenzyme bzw. mit bis zu 6,1 % für EST-Marker geringer als zwischen Referenzproben aus unterschiedlichen Partien (bis zu 4,9 % für Isoenzyme und bis zu

Tabelle 2: Genetische Abstände zwischen Saatgut-Referenzproben derselben Erntepartie (U₁) und unterschiedlicher Erntepartien (U₂) sowie Anzahl Genorte mit signifikanten Werten für drei Fichten-Ernten

Table 2: Genetic distances between seed reference samples from the same provenances (U₁) and from different provenances (U₂) and number of loci with statistical significant values for three seed harvest of spruce

Verglichene Samenproben	Genetischer Abstand (U _x) in % (Anzahl Genorte mit U signifikant)	
	Isoenzyme (17 Genorte)	Est-Marker (13 Genorte)
U ₁ = innerhalb einer Erntepartie		
R1 zu R3 (Altötting)	1,4 (0)	6,1 (1)
R1 zu R3 (Weißenhorn)	2,2 (0)	4,9 (1)
R1 zu R3 (Ravensburg)	1,1 (0)	4,8 (1)
U ₂ = zwischen Erntepartien		
R1 (Altötting) zu R1 (Weißenhorn)	3,5 (6)	7,1 (4)
R1 (Altötting) zu R1 (Ravensburg)	3,1 (7)	7,4 (3)
R1 (Weißenhorn) zu R1 (Ravensburg)	4,9 (10)	7,5 (3)

7,5 % für EST-Marker). Auch die Anzahl an Genorten mit signifikanten Abstandswerten ist höher beim Vergleich unterschiedlicher Erntepartien. Die relativen Unterschiede von U1 zu U2 sind bei Verwendung von Isoenzymen und EST-Markern in etwa gleich. Beide Markersysteme eignen sich somit für die Herkunftsüberprüfung bei der Fichte. Es hat sich allerdings kein höheres Differenzierungspotential der EST-Marker als molekulare Marker im Vergleich zu den Isoenzym-Markern herausgestellt. Mit den EST-Markern kann aber grundsätzlich ein größerer Teil des Genoms untersucht werden; hier ist die Anzahl der Loci noch nicht ausgeschöpft. Außerdem ist es von Vorteil, dass die DNA für den Einsatz der EST-Marker aus jedem Gewebe (Knospen, Nadeln etc.) isoliert werden kann. Diese Gewebeunabhängigkeit ist beim Einsatz von Isoenzym-Markern nicht gegeben; die Extraktion der Enzyme funktioniert nur aus Knospen und Samen, nicht aber aus Nadeln und Holz. Bei der Fichte ist die Lagerung von Samen und Knospen allerdings kein Problem, so dass für die Baumart Fichte zusammenfassend der Einsatz von Isoenzymen vorzuziehen ist, da er weniger auf-

wendig als DNA-Untersuchungen ist. Im Bedarfsfall können EST-Marker für ein höheres Unterscheidungspotential zusätzlich hinzugenommen werden.

Für die Herkunft Altötting wurde zusätzlich die Pflanzenprobe (P) nach der Verschulung untersucht. Hier ist der genetische Abstand zwischen Samen und Pflanzen mit 2,6 % (Isoenzymanalyse: P – R1) bzw. 3 % (Isoenzymanalyse: P – R3) deutlich höher als zwischen den Samenproben R1 und R3 (mit 1,4 %) und zudem an mehreren Genorten statistisch signifikant. Ähnlich ist das Ergebnis auch bei der Verwendung von EST-Markern. Dies lässt sich vermutlich auf die sehr hohe Ausfallrate bei der Verschulung der Pflanzen (ca. 70 %) zurückführen. Dieses Ergebnis zeigt aber auch, dass Parteien mit sehr hohen Ausfällen in der Pflanzschule aus dem ZüF-Verfahren heraus genommen werden sollten, weil eine genetische Überprüfung zu falschen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Identität führen kann. So können bei hohen Ausfällen Drift- oder Selektionseffekte zu einer Veränderung der genetischen Populationsstrukturen führen.

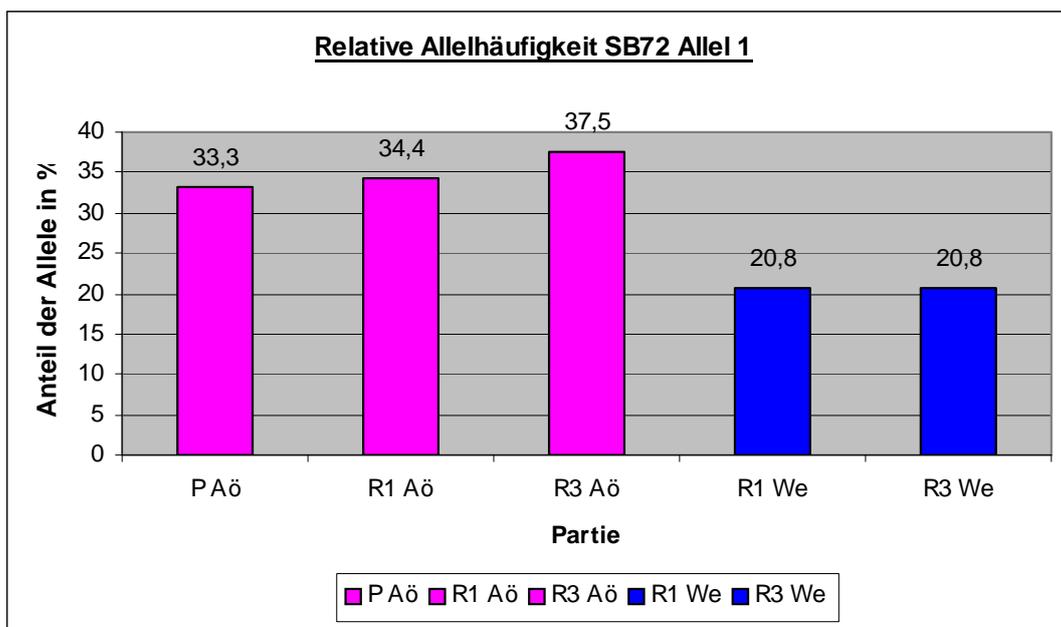


Abb. 2: Häufigkeiten des Allels 1 am Genort SB72 in den Fichten-Referenzproben aus Altötting (lila) und Weißenhorn (blau)

Fig. 2: Frequencies of allel 1 at genelocus SB72 in spruce reference samples from Altötting (purple) and Weissenhorn (blue)

Bei beiden Markertypen wurden an mehreren Genorten signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten bestimmter Allele zwischen verschiedenen Erntepartien festgestellt – unabhängig von der Probenart. Dies ist am Beispiel des Allels 1 am Genort SB72 in Abbildung 2 dargestellt.

Trennung der Einzelbäume eines Saatguterntebestandes

Die an einer Probe mit 55 Individuen berechnete Unterscheidungswahrscheinlichkeit (probability of identity, P_{ID}) für die beiden Marker-Systeme in Kombination zeigt einen Wert von $P_{ID} = 0.000000067$ für 13 EST-Marker und 17 Isoenzym-Marker. Dies bedeutet, dass in nur einem von 1 Mio. Fällen zwei zufällig gezogene Individuen nicht voneinander unterschieden werden können. Diese Wahrscheinlichkeit macht das hohe Differenzierungspotential der beiden Marker und deren Eignung zur Kontrolle der Anzahl der Erntebäume deutlich.

3.1.3 Weißtanne

Für die Baumart Weißtanne sind die Referenzproben R1 und R3 der beiden Herkunft Hinterzarten (Schwarzwald) und Marquartstein genetisch untersucht worden. Aus der Herkunft Marquartstein wurde zusätzlich eine Pflanzenprobe in die Untersuchungen (vorerst nur mit Isoenzymanalysen) mit einbezogen.

Bei den genetischen Untersuchungen kamen folgende Marker zum Einsatz:

- Isoenzymanalysen - 15 Genorte: AAT-A, AAT-B, AAT-C, ACO-A, AP-A, AP-C, FEST-B, IDH-B, MDH-B, MNR-B, 6-PGDH-A, 6-PGDH-B, PGI-B, PGM-A, SDH-A (KONNERT & MAURER 1995)
- Kern-Mikrosatelliten – 10 Loci: SF1, SFb4, SFg6, SF83, SF78, SF324, NFF3, NFF7, NFH3, NFH15 (CREMER et al. 2006; HANSEN et al. 2005)

- Chloroplast-Mikrosatelliten – 3 Loci: Pt 30141, Pt 30249, Pt 71936 (LIEPELT et al. 2001; VENDRAMIN et al. 1999)

Vergleich der Referenzproben mittels Isoenzymanalysen und Kernmikrosatelliten

Bei dem Vergleich der genetischen Abstände zwischen den Referenzproben R1 und R3 derselben Herkunft zeigen sich nur geringe Unterschiede (Tab. 3). Die genetischen Abstandswerte (bezogen auf Allele) mit maximal 2,2 % für Isoenzyme und mit maximal 13,5 % für Kern-Mikrosatelliten sind niedrig. Zudem sind alle Abstandswerte statistisch nicht signifikant.

Demgegenüber sind die genetischen Abstände zwischen den Herkunft Hinterzarten und Marquartstein mit bis zu 8,2 % bei Isoenzymen bzw. bis zu 35,9 % bei Kern-Mikrosatelliten deutlich höher und für letztere an allen Genorten statistisch signifikant.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Weißtanne neben Isoenzymen nukleare Mikrosatelliten als genetische Marker erfolgreich für die Herkunftssicherung im Zertifizierungssystem „ZüF“ eingesetzt werden können und die Kombination von Isoenzymanalysen und DNA-Markern eine sehr hohe Sicherheit im Herkunftsnachweis und im Nachweis der Anzahl Erntebäume (siehe unten) garantiert. In der Praxis können bei Prüffällen von den Isoenzym-Genmarkern und den DNA-Markern diejenigen verwendet werden, die reproduzierbare Trennmuster und entsprechende Variation zeigen. Da bei der Tanne die Anzahl variabler Isoenzym-Genorte nicht sehr hoch ist, ist die Ergänzung durch DNA-Marker besonders wichtig.

Auch anhand der Häufigkeiten einzelner Genvarianten bei den Mikrosatelliten lassen sich die verschiedenen Herkunft deutlich differenzieren (Abb. 3a und 3b). So liegt z. B. die Häufigkeit der Variante 221 am Genort SF1 in Hinterzarten über 34 %

sowohl bei der R1-Probe als auch bei R3-Probe, in Marquartstein dagegen bei maximal 17 %. Ähnlich verhält es sich mit

dem Allel 111 am Genort SFg6. Die Beispiele könnten fortgesetzt werden.

Tabelle 3: Genetische Abstände zwischen Saatgut-Referenzproben derselben Erntepartie (U₁) und unterschiedlicher Erntepartien (U₂) sowie Anzahl Genorte mit signifikanten Werten für zwei Tannen-Ernten

Table 3: Genetic distances between seed reference samples from the same provenances (U₁) and from different provenances (U₂) and number of loci with statistical significant values for two seed harvests of silver fir

Verglichene Samenproben	Genetischer Abstand (U _x) in % (Anzahl Genorte mit U signifikant)	
	Isoenzyme (15 Genorte)	Mikrosatelliten (10 Genorte)
U ₁ = innerhalb einer Erntepartie		
R1 zu R3 (Hinterzarten)	2,2 (0)	13,2 (1)
R1 zu R3 (Marquartstein)	1,6 (0)	13,5 (1)
U ₂ = zwischen Erntepartien		
R1 (Hinterzarten) zu R1 (Marquartstein)	7,4 (5)	33,8 (10)
R3 (Hinterzarten) zu R3 (Marquartstein)	8,2 (7)	35,9 (10)

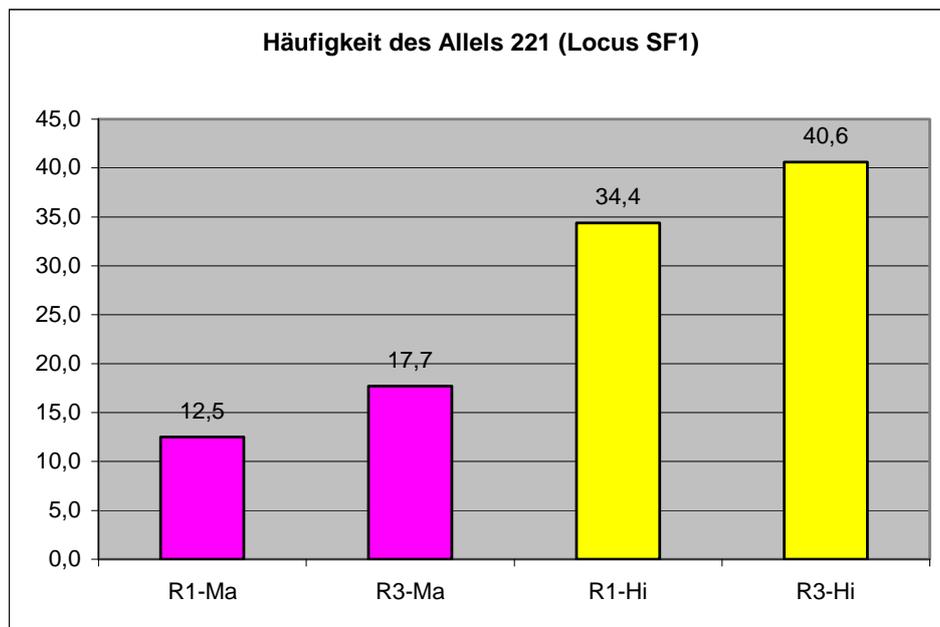


Abb. 3a: Häufigkeiten des Allels 221, Genort SF1, in den Referenzproben R1 und R3 der zwei Weißtannen-Herkünfte Hinterzarten und Marquartstein

Fig. 3a: Frequencies of allele 221, gene locus SF1, in reference samples R1 and R3 for two silver fir samples Hinterzarten and Marquartstein

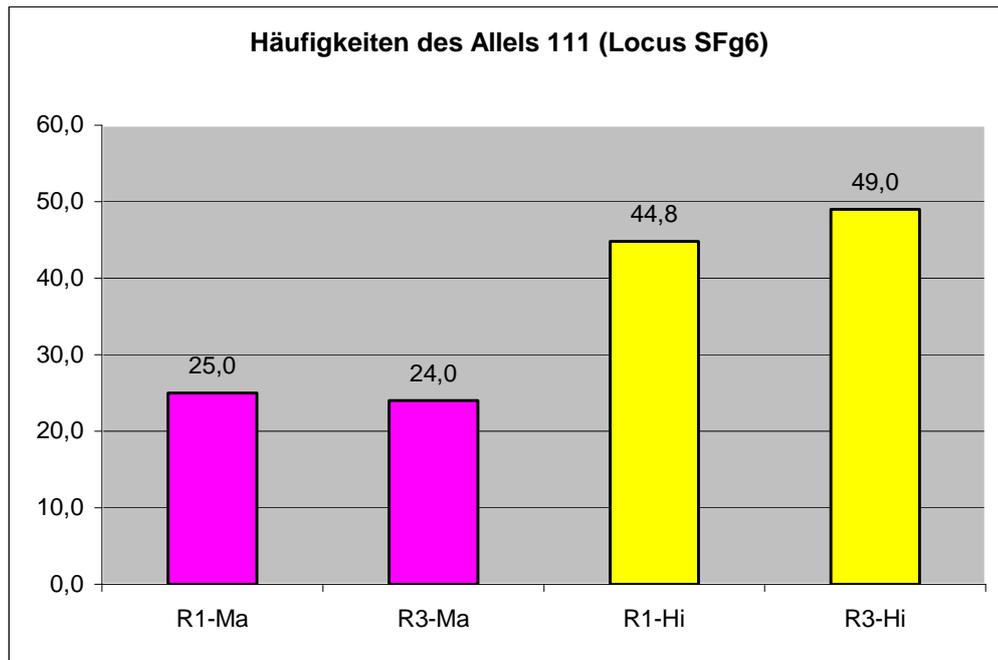


Abb. 3b: Häufigkeiten des Allels 111, Genort SFg6, in den Referenzproben R1 und R3 der zwei Weißtannen-Herkünfte Hinterzarten und Marquartstein

Fig. 3b: Frequencies of allele 111, gene locus SFg6, in reference samples R1 and R3 for two silver fir samples Hinterzarten and Marquartstein

Zwischen Samen und vierjährigen, verschulten Pflanzen der Herkunft Marquartstein wurde aufgrund von Isoenzymuntersuchungen ein genetischer Abstand von 3 % berechnet, ohne Signifikanz an einzelnen Genorten.

Trennung der Einzelbäume

Die Trennung der Einzelbäume jeder Partie ist durch die Kombination von Isoenzymanalysen und cpDNA-Marker eindeutig möglich. So konnten z. B. bereits durch die Isoenzymanalyse von den 20 Erntebäumen aus Hinterzarten 18 eindeutig getrennt werden. Die beiden nicht getrennten Bäume unterschieden sich in der Zusammensetzung der cpDNA, so dass davon ausgegangen werden kann, dass tatsächlich 20 Bäume beerntet wurden (siehe LIEPELT et al. 2004).

Mittels der 10 Kernmikrosatelliten liegt die Unterscheidungswahrscheinlichkeit bei $P_{ID} = 0,0000000016$. Das bedeutet, dass nur

in einem von 10 Mio. Fällen zwei zufällig gezogene Individuen anhand der genetischen Marker nicht voneinander unterschieden werden können. Das Differenzierungspotential ist damit sehr hoch. Werden zusätzlich im Bedarf noch Isoenzym-Marker hinzugekommen, potenziert sich die Unterscheidungsmöglichkeit noch entsprechend:

$$P_{ID} (\text{Isoenzyme+Mikrosatelliten}) = 22 \times 10^{-13}$$

Für die Baumart Weißtanne lässt sich somit die Anzahl der Erntebäume mit Hilfe der vorgestellten genetischen Marker ohne Weiteres nachweisen.

3.2 Untersuchungen mit stabilen Isotopen an den Referenz-Proben aus ZüF

Von allen mit genetischen Markern untersuchten Proben wurden Teilmengen zur Untersuchung mit stabilen Isotopen an die Firma Agrosolab geschickt. In die Auswertungen einbezogen wurden die Isotopenverhältnisse $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{org}}$, $\text{D}/\text{H}_{\text{org}}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$,

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise, einschließlich Probenvorbehandlung (Trocknung, Pulverisierung, Fettextraktion) und Analytik (IRMS) mit Ergebnissen finden sich bei KEHR (2007). Die unten dargestellten Grafiken wurden von der Firma Agrosolab in Jülich erstellt. Weitere Ergebnisse werden auch in diesem Band bei FÖRSTEL (S. 16) und GEBHARDT et al. (S. 101) vorgestellt. Im Weiteren werden die wichtigsten Ergebnisse aus der Sicht der Integration der Methode in das ZüF zusammenfassend dargestellt. Dabei wurden folgende Vergleiche angestellt:

- Vergleich der R1 und R3 Proben von drei Baumarten untereinander;
- Vergleich der Samenproben R1 und R3 aus den neun Erntepartien (3 x Bergahorn, 3 x Fichte, 3 x Weißtanne) und der R2-Proben (Samen Einzelbäume) – baumartenweise;
- Vergleich von R1-Samenproben mit entsprechender P-Proben (Pflanzen);

- Vergleich der R1-Samenproben mit Knospenproben der Erntebäume.

3.2.1. Ergebnisse

Vergleich der drei Baumarten

Die Korrelation der R1- und R3-Werte von Bergahorn, Fichte und Weißtanne war am eindeutigsten bei Betrachtung des Verhältnisses der Wasserstoffisotope in der mit Dichlormethan extrahierten Fettpartition der Samen (Abb. 4).

Berechnet man die Ausgleichsgerade, so ergibt die Funktion $y = 1.04 + 8.99$ (Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0.988$) eine hochsignifikante Übereinstimmung. Die Korrelationen anderer Isotopenpaare liegen zwischen 0.81 und 0.98.

Man sieht auch, dass die beiden Nadelbaumarten untereinander ähnlicher sind als im

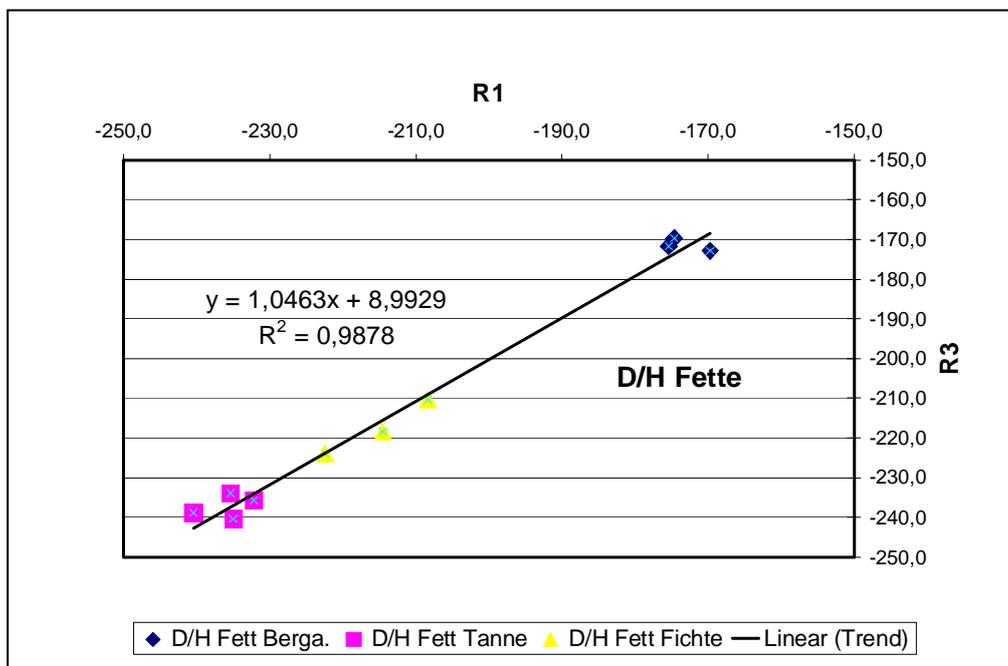


Abb. 4: Variation des Isotopenverhältnisses D/H. Variation der Fettpartition von Samen bei Referenzproben von Bergahorn, Fichte und Weißtanne

Fig. 4: Variation of the D/H isotope ratio of the fat partition of seeds in reference samples of sycamore (blue), spruce (yellow) and silver fir (pink)

Vergleich zur Laubbaumart. Dies kann mit den physiologischen Unterschieden beider Pflanzenordnungen erklärt werden.

Vergleich der Samenproben R1 und R3 einzelbaumweise

Die beste Übereinstimmung im Isotopenmuster hat man bei den Proben R1 zu R3 gefunden. Es reicht aber nicht aus, nur ein bestimmtes Isotop zu untersuchen, sondern es sollten möglichst viele Elemente einbezogen werden, um die einzelnen Partien voneinander zu unterscheiden. Dies zeigt auch der Vergleich anhand von einzelbaumweisen Samenproben in Abbildung 5.

Es wurden die für die oben genannten Isotopen gemessenen Werte an der fettfreien Samenpartition mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse abgeglichen. Zunächst erfolgte diese Analyse mit den Einzelbaumwerten, danach wurde die Bewertung mit einem vierfach rotierten Mittelwert erneut berechnet (Ergebnisbericht Agroisolab an das ASP 2007). Die Proben der Einzelbäume eines Bestandes zeigen dabei eine klare Klumpung und sind eindeutig von denen der anderen Bestände getrennt.

Vergleich von Samenproben mit Sämlingen

Bei dem Vergleich zwischen Samenproben und den daraus hervorgegangenen Sämlingen zeigte sich keine Übereinstimmung im Isotopenmuster. Es ist davon auszugehen, dass die Sämlinge während des Wachstums das Isotopenmuster des Anzuchtortes übernehmen. Daher kann die Methode nicht zur Überprüfung von Pflanzgut hinsichtlich seiner Abstammung von einer bestimmten Samenpartie verwendet werden.

Vergleich von Knospengewebe der Mutterbäume mit Samen

Auch dieser Vergleich führte zu keiner Übereinstimmung im Isotopenmuster. Damit ist die Methode der stabilen Isotopen für

einen direkten Rückschluss auf den Erntebaum derzeit nicht geeignet und kann leider nicht helfen, den direkten Rückschluss von der bei der Ernte gezogenen Referenzprobe auf den Erntebestand zu schließen.

4. Fazit

Für die Baumarten Bergahorn, Fichte und Weißtanne wurden DNA-Marker gefunden, die bei der Herkunftsüberprüfung im Rahmen des Zertifizierungssystems „überprüfbar forstliche Herkunft“ (ZüF) zum genetischen Vergleich der Referenzproben erfolgreich eingesetzt werden können. Bei Bergahorn und Weißtanne sind dies Mikrosatelliten der Kern-DNA, bei Fichte sog. EST-Marker, die für kodierende Sequenzen der Kern-DNA stehen. Neben der deutlich höheren Variabilität dieser Marker sind sie auch weitaus weniger abhängig vom Zustand des Gewebes. Während z. B. die meisten Isoenzyme nur bei Knospen in Winterruhe oder bei noch relativ frischen Samen gut auswertbare Trennmuster geben, kann DNA aus allen Gewebeteilen (Knospen, Nadeln, Blätter, Rinde, Samenschalen) auch nach längerer Lagerzeit oder vorheriger Trocknung extrahiert werden. Durch die Verwendung von Isoenzymen und DNA-Markern kann ein größerer Teil des Genoms untersucht werden, was eine höhere Aussagekraft hinsichtlich der Herkunftsüberprüfung bedeutet. Dies ist z. B. bei Fichte und Weißtanne der Fall. Bei dem tetraploiden Bergahorn hingegen sollten vorrangig Mikrosatelliten untersucht werden, da die Trennung viel sicherer ist als bei Isoenzymen mit ihren komplexen Mustern. Deshalb wurden bei Bergahorn die ZüF-Handlungsanweisungen folgendermaßen geändert:

„Bei Kontrolluntersuchungen im Rahmen von ZüF müssen die Mikrosatelliten-Genorte Map2, Map12, Map33 und Map40 an mindestens 96 Individuen untersucht werden. Daraus werden die genetischen Abstände berechnet. Bei Abstandswerten unter 20 % und Nichtsignifikanz auf dem 95 % Niveau

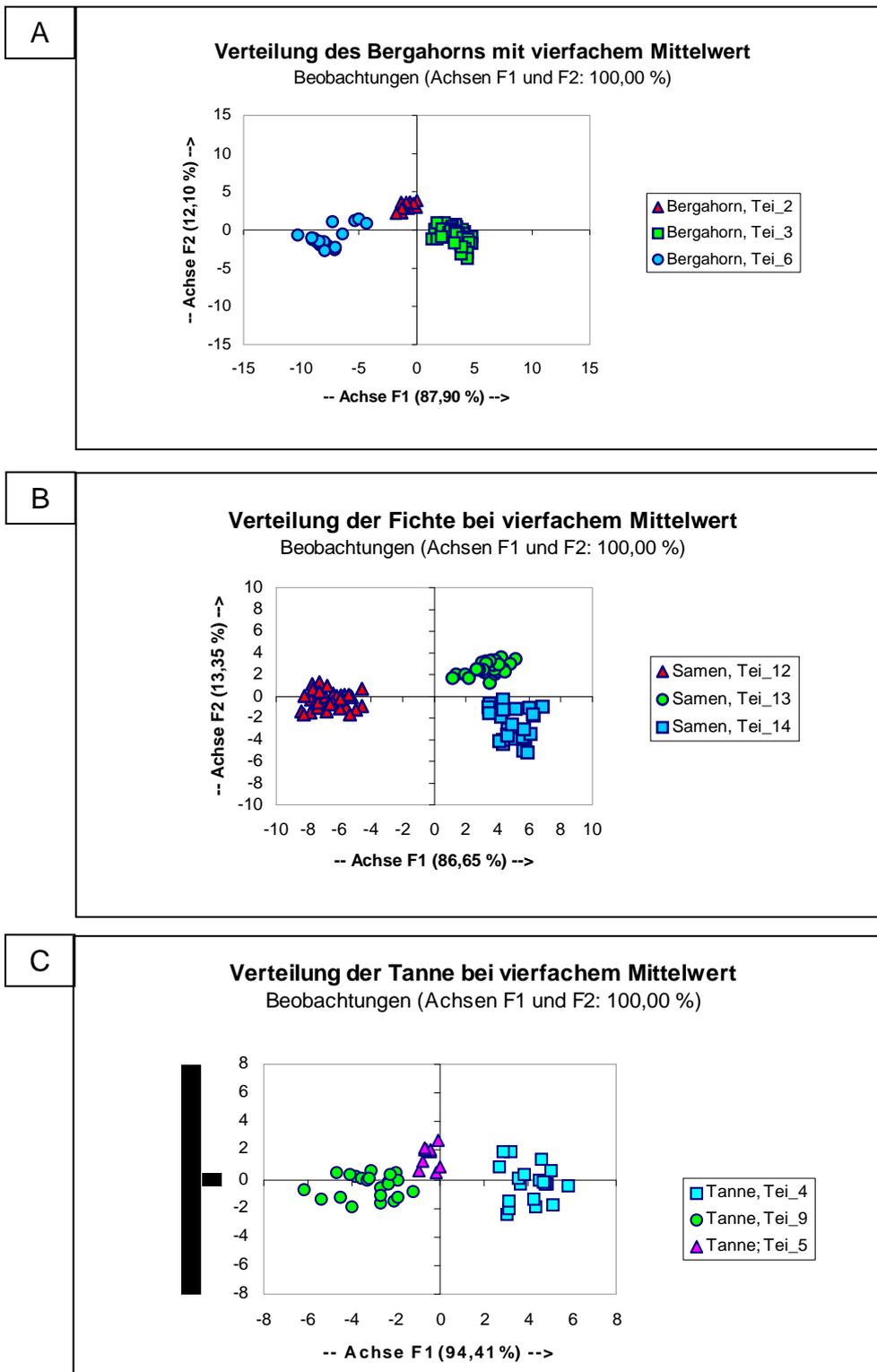


Abb. 5: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse der Isotopenmuster von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{org}}$, $\text{D}/\text{H}_{\text{org}}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ für Samenproben von (A) Bergahorn aus Königshofen (Tei_2), Weißenhorn (Tei_3) und Hohenschwangau (Tei_6); (B) Fichte aus Altötting (Tei_12), Weißenhorn (Tei_13) und Ravensburg (Tei_14) und (C) Weißtanne aus Titisee-Neustadt (Tei_4), Hinterzarten (Tei_5) und Lixenried (Tei_9).

Fig. 5: Result of a principal component analysis of the isotope signatures of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{org}}$, $\text{D}/\text{H}_{\text{org}}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ for seed samples of sycamore, spruce and silver fir. For details see German legend above.

wird von Identität ausgegangen. Gleichzeitig muss die Verteilung bestimmter Genvarianten in den beiden Parteien verglichen werden.

Bei Nichtübereinstimmung können in Absprache mit dem Zertifizierer weitere Analysen vorgenommen werden:

- Es wird der Genort *ccmp10* an jeweils 20 Individuen untersucht. Dieser kann zusätzliche Informationen zu dem potentiellen Ernteort liefern.
- Es wird eine Isoenzymanalyse unter Einbezug der Genorte AAT-A, AAT-B, AAT-C, ADH-A, ADH-B, MNR-A, PGI-B, PGI-C, IDH-A, 6-PGDH-A an 120 Individuen je Partie durchgeführt.

Hiermit wurden die Projektergebnisse unmittelbar in die Praxis umgesetzt.

Stabile Isotopen können bei der Überprüfung von Saatgutpartien, die an verschiedenen Stellen des Produktionsprozesses weggelegt wurden, erfolgreich eingesetzt werden. Sie eignen sich derzeit noch nicht für die Überprüfung der Abstammung vom Erntebaum und nicht für den Rückschluss von der angezogenen Pflanze auf den verwendeten Samen. Bei Verfügbarkeit von Referenzproben kann die Zugehörigkeit beliebiger Samenproben zu einer Erntepartie jedoch im Ausschlussverfahren mit Hilfe der Diskriminanzanalyse (siehe GEBHARDT et al. S. 101) überprüft werden.

Literatur

- BEHM, A. (2004): Das süddeutsche Konzept im Überblick. Berichte Freiburger Forstliche Forschung 54: 37-47.
- BONER, M.; FÖRSTEL, H. (2004) Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. Anal. Bioanal. Chem. 378: 301-310.
- CREMER, E.; LIEPELT, S.; SEBASTIANI, F.; ZIEGENHAGEN, B.; MICHALCZYK, I.; VENDRAMIN, G.G. (2006): Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. Molecular Ecology Notes (6): 374-376.
- FRANKE, A. (2004): Abgrenzung von hoheitlichen Aufgaben und Zertifizierung bei der Gewinnung und Anzucht von Forstlichem Vermehrungsgut. Berichte Freiburger Forstliche Forschung 54: 32-37.
- FROMM, M.; KONNERT, M. (2004): Identitätssicherung von Vermehrungsgut über Isoenzymanalysen – Erste Ergebnisse für Roteiche und Bergahorn. Berichte Freiburger Forstliche Forschung 54: 57-65.
- GREGORIUS, H.-R. (1974): Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der Abstandsmessung. Silvae Genetica 23: 22-27.
- HANSEN, O.K.; VENDRAMIN, G.G.; SEBASTIANI, F.; EDWARDS, K.J. (2005) Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.). Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. Molecular Ecology Notes (5): 784-787.
- HUSSENDÖRFER, E. (2005): ZÜF- eine erste Bewertung aus der Sicht des Zertifizierers. AFZ/Der Wald (5): 226-227.
- KEHR, M. (2007): Herkunftsnachweis von zertifiziertem Forstsaatgut mit Hilfe der Stabilisotopen-Methode. Diplomarbeit der FH Aachen, Abteilung Jülich: 129 S.
- KONNERT, M.; MAURER, W. (1995): Isozymic Investigations on Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European Silver Fir (*Abies alba* Mill.): A Practical Guide to Separation Methods and Zymogram Evaluation. From the German Federal-State Working Group "Conservation of Forest Gene Resources", ISBN 3-00-000042-9.
- KONNERT, M.; RUETZ, W.; FROMM, M. (2001): Genetic variation in *Acer pseudoplatanus* L.I. inheritance of isozyme variants. Forest Genetics 8: 25 – 37.

- KONNERT, M.; HUSSENDÖRFER, E. (2002): Herkunftssicherung bei forstlichem Vermehrungsgut durch Referenzproben. *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* 173: 97-104.
- KONNERT, M., BEHM, A. (2006): Proof of identity reproductive material based on reference samples. *Mitt. BFH Hamburg* 221: 61 – 71.
- KONNERT, M. (2006): Erfolge (und Grenzen) bei dem Herkunftsnachweis mittels Isoenzym- und DNA-Analysen. In HESSEN-FORST (Hrsg.): Forstliche Genressourcen als Produktionsfaktor. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung vom 20. bis 22. Oktober 2005 in Fuldata. Hessen-Forst, Hann. Münden: 49-57.
- LIEPELT, S.; KULENKAMP, V.; ANZIDEI, A.; VENDRAMIN, G.G.; ZIEGENHAGEN, B. (2001): Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes* (4): 332-335.
- LIEPELT, S.; CREMER, E.; ZIEGENHAGEN, B.; KONNERT, M.; HUSSENDÖRFER, E. (2004): Anwendung von molekularen Markern zur Individualdifferenzierung und Identitätssicherung. In: Forum Genetik-Wald-Forstwirtschaft. 11. Arbeitstagung. 20-22 September in Teisendorf. Posterbeitrag, S. 335.
- PANDEY, M.; GAILING, O.; FISCHET, D.; HATTEMER, H.H.; FINKELDEY, R. (2004): Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Molecular Ecology Notes* (4): 253-255.
- PERRY, J.D.; BOUSQUET, J. (1998): Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in Black spruce. *Genetics* 149: 1089-1098.
- PERRY, J.D.; ISABEL, N.; BOUSQUET, J. (1999): Sequence-tagged site (STS) markers of arbitrary genes: the amount and nature of variation revealed in Norway spruce. *Heredity* 83: 239-248.
- SCHUBERT, R.; MÜLLER-STRACK, G.; RIEGEL, R. (2001): Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulation genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1223-1231.
- VENDRAMIN, G.G.; DEGEN, B.; PETIT, R.J.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A.; ZIEGENHAGEN, B. (1999): High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology* 8: 1117-1126.
- WEISING, K.; GARDNER, R.C. (1999): A set of conserved PCR Primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

Anschrift der Autoren:

Dr. MONIKA KONNERT; EVA CREMER
Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht
Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf, Deutschland

Prof. Dr. HILMAR FÖRSTEL
Agroisolab GmbH
Karl-Heinz-Beckurts-Str. 13, 52428 Jülich, Deutschland

Nachweis der Herkunft von Saatgutpartien des Bergahorns, der Fichte und der Weißtanne mit Hilfe stabiler Isotopen

Karl Gebhardt, Monika Konnert, Hilmar Förstel

Zusammenfassung

Der Nachweis der Authentizität von Saatgutpartien bildet die Grundlage für die privatrechtliche Zertifizierung und dient im Kontrollfall der Aufdeckung von Verstößen gegen das Forstvermehrungsgutgesetz. Es wird eine weitgehend fälschungssichere Methode vorgestellt, die es ermöglicht Saatgutpartien anhand ihrer Stabilisotopensignaturen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) zu vergleichen. Der Vergleich erlaubt eine Prüfung von Einzelfällen mit Hilfe einer multivariaten Diskriminanzanalyse. Dabei wird für jeden Einzelfall eine statistische Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Zuordnung ausgewiesen. Am Beispiel von Beständen des Bergahorns, der Fichte und der Weißtanne wird gezeigt, dass zwischen den Ernten aus diesen Beständen signifikante Unterschiede der Deltawerte verschiedener stabiler Isotopen bestehen und die Zuordnung von Einzelbaumernten aus einem Bestand mit geringen mittleren Fehlerraten (0 bis 12 %) pro Bestand durch Kreuzvalidierung mit Hilfe von Diskriminanzfunktionen möglich ist.

Schlagwörter: Bergahorn, Fichte, Weißtanne, Stabilisotopen, Diskriminanzanalyse, Zertifizierung

Proof of the origin of seed lots of sycamore, Norway spruce and white fir trees by analysis of stable isotopes

Abstract

The proof of the authenticity of seed lots is the basis for the privately organized certification and is used in the control case, the discovery of violations of the Act on forest reproductive material (Forstvermehrungsgutgesetz, FoVG) in Germany. A largely forgery-proof method is described, which allows to compare seed lots based on their stable isotopic signatures ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). This comparison allows an examination of individual cases with the help of a multivariate discriminant analysis. With this method for each individual case, a statistical probability for the accuracy of the assignment is proven. For different stands of sycamore, Norway spruce and white fir it is shown that between the harvest of the stands significant differences in the delta values of different stable isotopes exist. The assignment of individual tree seed crops to the harvest was possible by the use of discriminant functions with cross validation and resulted in low mean error rates (0 to 12%) per stand.

Key words: sycamore, Norway spruce, white fir, stable isotopes, discriminant analysis, certification

Einleitung

Herkunftsversuche und genetische Analysen haben vielfältige Unterschiede zwischen den untersuchten Herkünften ergeben, die sich teils mit der standörtlichen, ökologischen und geographischen Differenzierung sowie mit der Verbreitungs- und Bestandesgeschichte erklären lassen.

Den in Herkunftsversuchen deutlich gewordenen Unterschieden in Stamm- und Kronenform sowie in der Anpassung an klimatische Verhältnisse muss durch die Herkunftswahl entsprechend den gültigen

Herkunftsempfehlungen der Länder bei allen Baumarten Rechnung getragen werden um insbesondere Schäden durch Trockenheit, Frost und Schneebruch vorzubeugen.

Das hohe Ernteaufkommen aus süddeutschen Beständen (Bayern und Baden-Württemberg) der drei untersuchten Baumarten (Tab. 1), belegt die Bedeutung dieser Arten für die Forstwirtschaft, den Saatguthandel und für die Pflanzenanzucht im weiteren Produktionsprozess.

Tabelle 1: Süddeutsches Ernteaufkommen des Erfassungszeitraumes 1.7.2006 bis 30.6.2007 nach Angaben der BLE (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung)

Table 1: Seed production in Southern Germany during the course of 1.7.2006 till 30.6.2007, according to statistic data from BLE (Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung)

Baumart	Samenmenge [kg]	Anteil am Ernteaufkommen der BRD	Beerntete Herkunftsgebiete
<i>Abies alba</i> Mill. - Weißtanne	5513,6	60 %	827.. 06, 07, 08, 10, 11, 12
<i>Acer pseudoplatanus</i> L. - Bergahorn	5308,0	46,5 %	801.. 04, 06, 08, 09, 10, 11
<i>Picea abies</i> Karst. - Fichte	402,7	44,5 %	840.. 17, 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29

Mit der Sicherstellung von Referenzproben aus dem Ernteprozess, wie es von den Zertifizierungssystemen ZüF (KONNERT & HUSSENDÖRFER 2002) und FfV (HAASE et al. 2007) operationalisiert ist oder im Einzelfall durch die amtliche Kontrolle veranlaßt wird, ist es nun möglich auch Saatgutpartien, die sich im Handel befinden oder eingelagert wurden auf ihre Identität hin zu überprüfen. Solche Saatgutpartien der dem FoVG unterliegenden Baumarten müssen durch ein Stammzertifikat bzw. einen Lieferschein mit Stammzertifikatsnummer gekennzeichnet sein. Das Formular enthält neben den Angaben zur Saatgutquelle (Anzahl der Einzelbäume)

bzw. dem Erntebestand auch Angaben zur Erntemenge, zum Reifejahr, Ernteverfahren, Empfänger und Lieferanten.

Wenn Saatgutmischungen hergestellt werden, müssen die Mischungsanteile mit ihren Stammzertifikatsnummern benannt und es muss ein eigenes Stammzertifikat für die Mischung beantragt werden.

Wie von KONNERT et al. (siehe S. 85) ausgeführt, sind Prüfungen der Identität von Saatgutpartien und Referenzproben mit genetischen Methoden oder mit der Stabilisotopenmethode (BONER & FÖRSTEL 2001) möglich. Voraussetzung bleibt

allerdings ein nachzuweisender genetischer Abstand oder gesicherter Unterschied zwischen den gehandelten Saatgutpartien aus unterschiedlichen Beständen (Abb. 1).

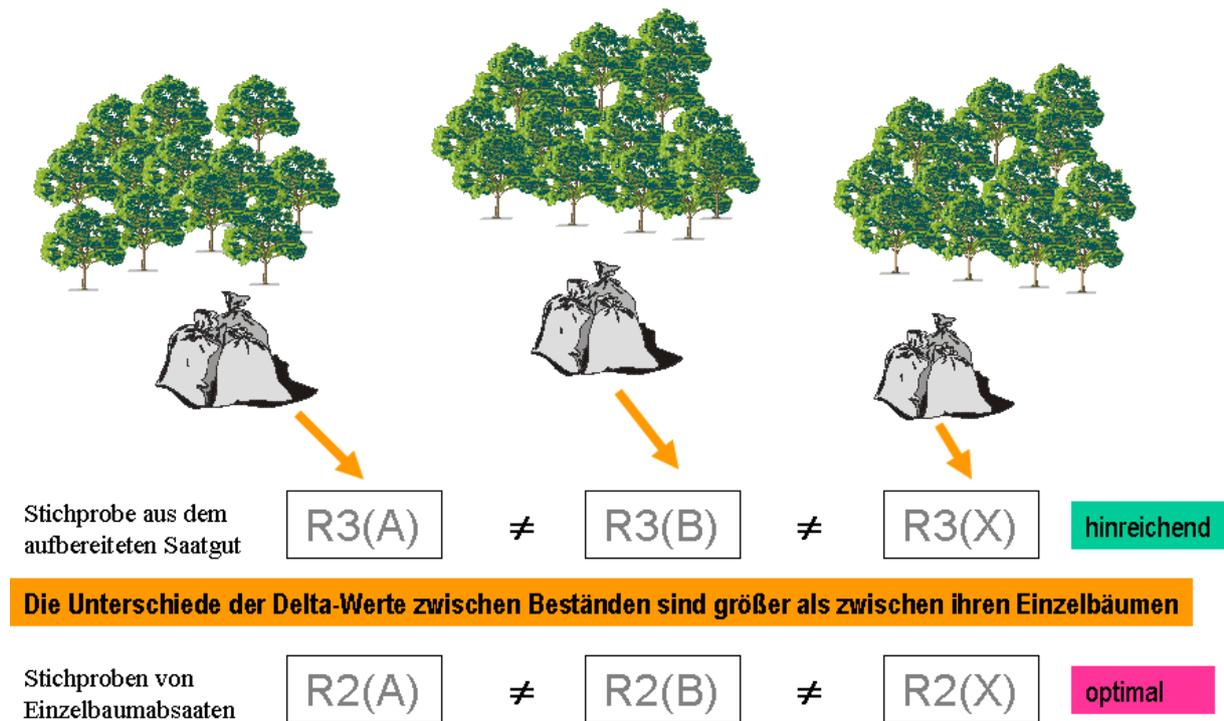


Abb. 1: Unterscheidung von Herkunft mit Bestandesmischungen und Einzelbaumabsaaten (R2)
 Fig. 1: Discrimination of provenances using seed mixtures of stands or single trees harvest (R2)

Die Zugehörigkeit fraglicher Saatgutpartien zu Referenzproben mit gleicher Stammzertifikatsnummer muss im Einzelfall so geprüft werden, dass für die Richtigkeit der Aussage eine Wahrscheinlichkeit in Prozent benannt werden kann. Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass es möglich

ist anhand der Stabilisotopensignaturen (Delta-Werte) die Einzelbaumernten von je drei Bergahorn- und Fichten- sowie zwei Weißtannenbeständen der jeweiligen Erntepartie (bescheinigt durch ein Stammzertifikat) zuzuordnen.

Material und Methoden

Es wurden die in Tabelle 2 bezeichneten Bestände einzelbaumweise beerntet und so genannte R2-Proben (s. KONNERT et al. S. 85) für die Analysen der Stabilisotopen an die Firma Agroislab vorgetrocknet übersandt.

Analytik

Nach Angaben von KEHR (2007) wurden die Samen mit Samenschalen vor der Analyse homogenisiert und mit dem apolaren Lösungsmittel Dichlormethan in einer Soxhlett-Apparatur fettextrahiert. Für die IRMS-Analysen (Isotope Ratio Mass Spectrometry) wurden je 2-2,5 mg des extrahierten Probenmaterials in Zinnhülsen eingewogen und für die Bestimmung von

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ bei 1000°C verbrannt. Als Feststoffstandard für ^{13}C und ^{15}N wurde Leucin, zur Schwefelbestimmung ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) Cystein verwandt. Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ erfolgte in einer gekoppelten Messung nachfolgend der Bestimmung des D/H-Verhältnisses. Dazu wurden 1,7 -2,0 mg Probenmaterial in Silberkapseln eingewogen und die Proben unter Verwendung einer Hochtemperatur-Pyrolyse verascht. Sauerstoff wird dabei mit Kohlenstoffüberschuss in Kohlenmonoxid überführt. Eine nähere Beschreibung der Analytik und der verwendeten Abkürzungen findet sich bei BONER und FÖRSTEL (2004) und BONER (2005). Die Delta-Notation (δ) der Isotopenverhältnisse R folgt der international üblichen Definition:

$$\delta_{S/R} = [(R_S / R_R) - 1] * 10^3 [\text{‰}]$$

R_S = Isotopenverhältnis der Probe

R_R = Isotopenverhältnis des Standards

Die Werte werden auf SMOW, PDB, Luft- N_2 und CDT bezogen angegeben und sind gegen Standardmaterialien der Internationalen Atomenergieagentur (IAEA) / Wien kalibriert worden. In der statistischen Auswertung werden die Isotopenverhältnisse mit ihren Massen wie folgt bezeichnet D/H als DE_2_1, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ als DE_13_12, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ als DE_18_16 und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ als DE_34_32 sowie $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ als DE_Luft.

Statistik

Alle Messwerte wurden varianzanalytisch mittels der GLM-Prozedur des Statistikprogramms SAS geprüft. Unterschiede der Mittelwerte wurden nach einem REGWQ-Test klassifiziert. Mittelwerte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich im REGWQ-Test auf dem 5 %-Niveau nicht-signifikant. Im Box-Plot ist das arithmetische Mittel als Punkt, das obere und untere Quartil, der Median sowie die Spannweite dargestellt. Die weitere Auswertung erfolgte mittels der SAS-Prozeduren Corr (Korrelationsanalyse), Stepdisc (schrittweise Diskriminanzanalyse) und Discrim (Diskriminanzanalyse).

Tabelle 2: Beschreibung der Erntebestände von drei Baumarten
Table 2: Description of the harvested stands of three species

A. Bergahorn / sycamore

Herkunft	Königshofen	Weißenhorn	Hohenschwangau
Registernummer	09 1 801 04 014 2	09 1 801 08 080 2	09 1 801 11 008 2
reduz. Fläche [ha]	3,0	8,5	12,7
Gründungsjahr(e)	1792	1884	1783-1811
Höhe [m ü. NN]	600-700	460	970-1620
geogr. Länge	10° 18' O	10° 10' O	10° 42' O
geogr. Breite	50° 26' N	48° 19' N	47° 34' N
Autochthonie	autochthon	autochthon	autochthon

B. Fichte / Norway spruce

Herkunft	Altötting	Weißenhorn	Ravensburg
Registernummer	09 1 840 27 251 2	09 1 840 27 388 2	08 4 840 27 516
reduz. Fläche [ha]	6,7	35,4	103,3
Gründungsjahre	1884-1894	1873-1926	1810
Höhe [m ü. NN]	389	550-580	570-580
geogr. Länge	12°50' O	10° 6' O	9° 43' O
geogr. Breite	48° 14' N	48° 13' N	47° 57' N
Autochthonie	unbekannt	nicht autochthon	unbekannt

C. Weißtanne / silver fir

Herkunft	Lixenried	Titisee-Neustadt
Registernummer	09 1 827 07 040 2	08 3 827 08 0472212
reduz. Fläche [ha]	0,9	10,3
Gründungsjahre	1890-1920	1800
Höhe [m ü. NN]	500-530	900-1000
geograph Länge	12° 44' O	8° 10' O
geograph Breite	49° 21' N	47° 47' N
Autochthonie	unbekannt	autochthon

Ergebnisse**Bergahorn**

Zwischen den drei Bestandesmittelwerten von DE_2_1 und DE_34:32 ergaben sich nach Varianzanalyse mit einem REGWQ-Test auf dem 5%-Niveau signifikante Unterschiede (Abb. 2). Bei DE_18_16 unterschied sich jeweils Königshofen und Weissenhorn signifikant von Hohenschwangau. Es bestehen keine engen Korrelationen zwischen den verschiedenen Deltawerten.

Nach einer Step-Disc-Analyse zeigten die Deltawerte von Wasserstoff, Schwefel und org. Sauerstoff ein hohes partielles R-Quadrat ($>0,5$) und hohe F-Werte (64 - 45). Sie können somit wesentlich zur Unterscheidung der Herkünfte bzw. Einzelbaumernten beitragen.

Mit Hilfe einer Diskriminanzanalyse, die einen multivariaten Vergleich mit den Variablen DE_2_1, DE_34:32, DE_18_16 und DE_Luft ermöglicht, wurde die Zugehörigkeit der Einzelbaumernten mittels Kreuzvalidierung geprüft, so dass für jede Einzelbaumernte eine Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu einem der drei Bestände ausgewiesen wird. Ein Auszug der Ergebnistabelle mit linearer Diskriminanzfunktion ist in Tab. 3 dargestellt.

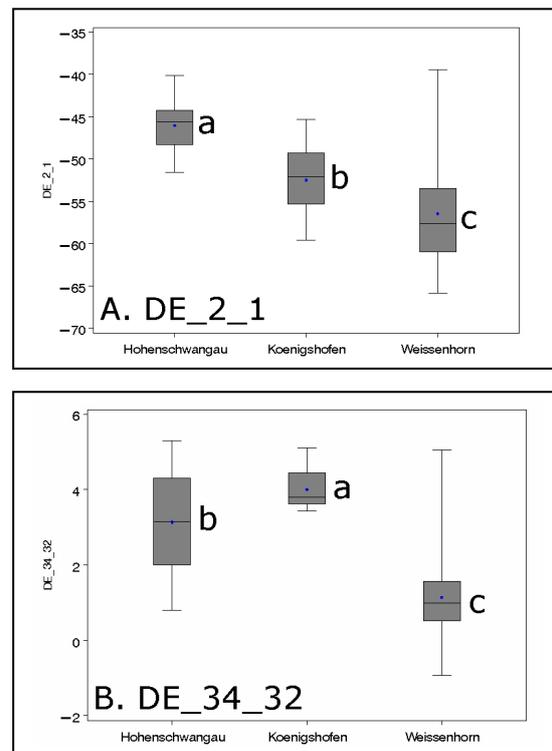


Abb. 2: Boxplots mit signifikanten Unterschieden der Bestandesmittelwerte von DE_2_1 (A.) und DE_34_32 (B.).

Fig. 2: Boxplots showing significant differences of DE_2_1 (A.) and DE_34_32 (B.) between means of stands.

Tabelle 3: Auszug der Posteriori-Wahrscheinlichkeiten für die Zugehörigkeit von 92 Einzelbaumernten zum bezeichneten Bestand als Ergebnis einer Kreuzvalidierung mit linearer Diskriminantenfunktion

Table 3: Excerpt of the posteriori probabilities of an association of 92 single trees to three harvested stands as a result of a crossvalidation using a linear discriminant function

Beob.	Klassifiziert in Herkunft	Hohenschwangau	Königshofen	Weißenhorn
1	Königshofen	0,0004	0,9133	0,0863
2	Königshofen	0,0000	0,9997	0,0003
3	Königshofen	0,0002	0,9891	0,0107
4	Königshofen	0,0012	0,9976	0,0011
5	Königshofen	0,0008	0,9980	0,0012
6	Königshofen	0,0000	0,8412	0,1588
7	Königshofen	0,0005	0,9968	0,0027
8	Königshofen	0,0010	0,9906	0,0084
9	Königshofen	0,0000	0,9536	0,0464
10	Königshofen	0,0000	0,9996	0,0004
31	Weißenhorn	0,0006	0,0719	0,9275
32	Weißenhorn	0,0000	0,0022	0,9978
33	Weißenhorn	0,0001	0,0307	0,9693
34	Weißenhorn	0,0004	0,0733	0,9263
35	Weißenhorn	0,0000	0,0310	0,9690
36	Weißenhorn	0,0000	0,0251	0,9749
37	Weißenhorn	0,0008	0,2230	0,7762
38	Weißenhorn	0,0000	0,0747	0,9253
39	Weißenhorn	0,0000	0,0153	0,9847
40	Weißenhorn	0,0000	0,0555	0,9445
73	Hohenschwangau	1,0000	0,0000	0,0000
74	Hohenschwangau	0,9996	0,0004	0,0000
75	Hohenschwangau	0,9999	0,0001	0,0000
76	Hohenschwangau	1,0000	0,0000	0,0000
77	Königshofen *	0,0000	0,9969	0,0031
78	Königshofen *	0,0000	0,9154	0,0846
79	Hohenschwangau	0,9986	0,0014	0,0000
80	Hohenschwangau	1,0000	0,0000	0,0000
81	Hohenschwangau	1,0000	0,0000	0,0000
82	Hohenschwangau	1,0000	0,0000	0,0000

* falsch klassifizierte Beobachtung

Falsch klassifizierte Beobachtungen werden in der Liste (Tab. 3) mit Stern ausgewiesen. Insgesamt ergaben sich mit der linearen Diskriminantenfunktion nach Kreuzvalidierung Fehlerzählungsschätzwerte von null für die Herkunft Königshofen, 0,1 für Hohenschwangau und 0,0377 für Weißenhorn. Insgesamt wurden jedoch nur vier von 92 Einzelbaumernten falsch zugeordnet.

Fichte

Nach Varianzanalyse der Einzelbaumernten in drei Beständen zeigten sich signifikante Unterschiede der Bestandesmittelwerte bei den Stabilisotopensignaturen des Wasserstoffs (Abb. 3A) und des Stickstoffs (Abb. 3B). Bei den Deltawerten Kohlenstoffs (Abb. 3C), des org. Sauerstoffs (Abb. 3D) und des Schwefels unterschieden sich jeweils die Herkünfte Weißenhorn und Altötting signifikant von Ravensburg.

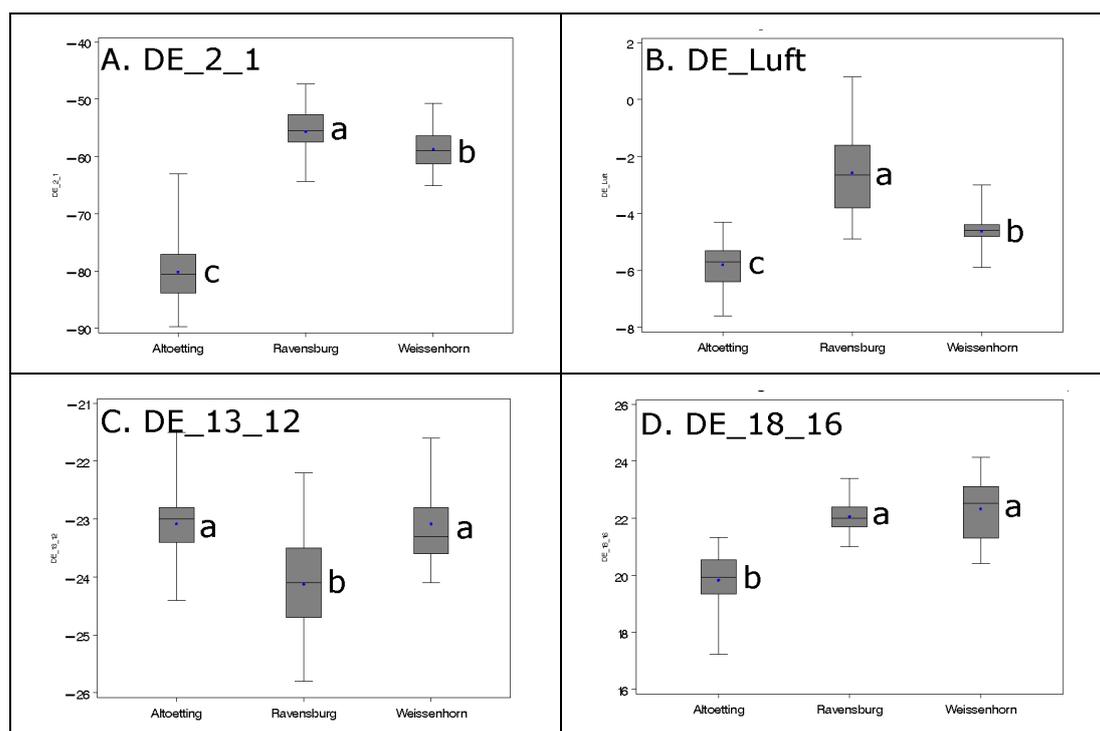


Abb. 3: Boxplots mit signifikanten Unterschieden der Bestandesmittelwerte von DE_{2_1} (A.), DE_{Luft} (B.), DE_{13_12} (C.) und DE_{18_16} (D.) bei Fichte.

Fig. 3: Boxplots with significant differences of DE_{2_1} (A.), DE_{Air} (B.), DE_{Air} (C.), and DE_{18_16} (D.) between means of three stands of Norway spruce.

Tabelle 4: Kreuzvalidierungsergebnisse der Einzelbaumernten aus 3 Fichtenbeständen mit einer quadratischen Funktion (3 nächste Nachbarn) in der Diskriminanzanalyse

Table 4: Results of a crossvalidation using a discriminant procedure and a square distance function (3 nearest neighbours) of single tree harvests from 3 stands of Norway spruce

A. Anzahl der Beobachtungen und Prozentwerte klassifiziert nach Herkunft

Number of observations and percent classified into provenance:

von Herkunft	Einheit	Altötting	Ravensburg	Weissenhorn	Summe
Altoetting	n	35	0	1	36
	%	97,2	0	2,8	100
Ravensburg	n	0	23	3	26
	%	0	88,5	11,5	100
Weissenhorn	n	0	1	26	27
	%	0	3,7	96,3	100
Summe	n	35	24	30	89
	%	39,3	27	33,7	100

B. Fehlerzählungsschätzwerte für Herkunft / Error count estimates for provenance

Herkunft:	Altötting	Ravensburg	Weissenhorn	Summe
Rate	0,0278	0,1154	0,0370	0,0601
Priori	0,3333	0,3333	0,3333	

Nachdem keine signifikanten Korrelationen zwischen den verschiedenen Variablen bestanden wurde eine Step-Disc-Analyse gerechnet. Hier zeigte sich, dass alle Deltawerte außer denen des Schwefels ein hohes partielles R-Quadrat lieferten und somit die Herkunft gut erklärten.

Nach einer Diskriminanzanalyse der Deltawerte des Wasserstoffs, org. Sauerstoffs, des Kohlenstoffs und Stickstoffs mit linearer Diskriminanzfunktion ergab sich nach Kreuzvalidierung ein Gesamt-Fehlerzählungsschätzwert von 0,0857.

Durch die Wahl eines nichtparametrischen Ansatzes nach der Methode der drei nächsten Nachbarn ergab sich mit einer quadratischen Diskriminanzfunktion eine Reduktion des gesamten Fehlerzählungsschätzwertes auf 0,0601. Wie Tabelle 4 zeigt wurde jeweils eine Einzelbaumernte der Herkunft Altötting und Weißenhorn, jedoch drei Einzelbaumernten der Herkunft Ravensburg falsch zugeordnet.

Weißtanne

In den Weißtannen-Beständen Lixenried und Titisee-Neustadt wurde das Saatgut von Einzelbäumen (R2) beerntet und wie oben beschrieben, analysiert.

Bei den Variablen DE_13_12, DE_Luft und DE_34_32 zeigten sich nach der Varianzanalyse signifikante Unterschiede der Bestandesmittelwerte, siehe Abb. 4A-C. Die Bestandesmittelwerte der Variablen DE_2_1 und DE_18_16 unterschieden sich nicht signifikant.

In der Step-Disc-Analyse lieferten die vorgenannten Variablen des Kohlenstoffs, Stickstoffs und des Schwefels auch ein hohes partielles R-Quadrat und wurden deshalb im Verfahren der Kreuzvalidierung mit der Prozedur Discrim für die Zuordnung der Einzelbaumernten zu den Beständen ausgewählt. Wie Tabelle 5 zeigt, gelingt

diese Zuordnung mit der geringen Fehlerrate von 2,17 Prozent bei 42 Einzelbaumernten.

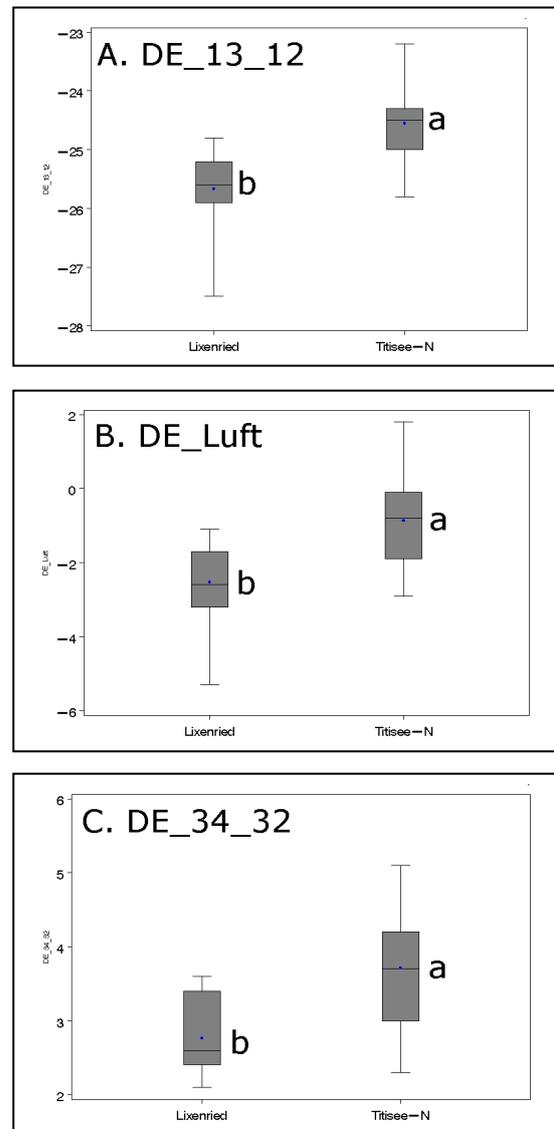


Abb. 4: Boxplots mit signifikanten Unterschieden der Bestandesmittelwerte von DE_13_12 (A.), DE_Luft (B.) und DE_34_32 (C.) bei Weißtanne

Fig. 4: Boxplots exhibiting significant differences of means of DE_13_12 (A.), DE_Luft (B.), and DE_34_32 (C.) of white fir stands

Tabelle 5: Kreuzvalidierungsergebnisse der Einzelbaumernten aus 2 Tannenbeständen nach Diskriminanzanalyse mit einer linearen Distanzfunktion

Table 5: Results of a crossvalidation using a discriminant procedure and a linear distance function of single tree harvests from 2 stands of silver fir

A. Anzahl der Beobachtungen und Prozentwerte klassifiziert nach Herkunft
Number of observations and percent classified into provenance

Herkunft	Einheit	Lixenried	Titisee-Neustadt	Summe
Lixenried	n	22	1	23
	%	95,7	4,3	100
Titisee-Neustadt	n	0	19	19
	%	0	100	100
Summe	n	22	20	42
	%	52,4	47,6	100

B. Fehlerzählungsschätzwerte für Herkunft / Error count estimates for provenance

Herkunft:	Lixenried	Titisee-Neustadt	Summe
Rate	0,0435	0	0.0217
Priori	0,5	0,5	

Diskussion

Für die Zwecke der Zertifizierung und Kontrolle des Saatguthandels ist es erforderlich die Herkunft von Saatgut aus einem Bestand oder seine Zugehörigkeit zu einer Saatguterntepartie mit einer Stammzertifikatsnummer zu überprüfen. Voraussetzung für eine solche Einzelfallentscheidung ist die Unterschiedlichkeit von Bestandesmittelwerten, die größer sein muss als die Unterschiede innerhalb einer Bestandesabsaat. Da sich Bestandesabsaaten aus Einzelbaumernten zusammensetzen ist anzunehmen, dass die Unterschiede beliebiger Teilmengen einer Bestandesmischung nicht größer sein werden als die Unterschiede zwischen den Einzelbaumernten eines Bestandes.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Zuordnung von Einzelbaumernten (R2-Proben) zu Bestandesernten desselben Reifejahres mithilfe der Stabilisotopen-Signaturen der Elemente C, N, O, S und H bei den

Baumarten Bergahorn, Fichte und Weißtanne mit geringen Fehlerraten möglich ist. Diese Zuordnung geschieht mithilfe einer Diskriminanzanalyse, die für jeden Einzelfall eine Posteriori-Wahrscheinlichkeit ausweist. Wie von GEBHARDT (siehe S. 51) gezeigt, kann mit der Diskriminanzfunktion im Ausschlussverfahren mit einem Saatgut/Saatgut-Vergleich auch die Zugehörigkeit beliebiger, unbekannter Proben zu den bezeichneten Bestandesernten geprüft werden. In das bezeichnete Prüfverfahren gehen die im Labor erhobenen Deltawerte und ggf. die Elementgehalte von Stickstoff und Kohlenstoff ein. Die Berechnung gleitender oder rotierender Mittelwerte, wie von KEHR (2007) beschrieben, erübrigt sich. Im Gegensatz zur Hauptkomponentenanalyse, die einen beschreibenden Charakter hat, bietet die Diskriminanzanalyse eine Entscheidungshilfe wenn entsprechende Referenzproben zur Verfügung stehen.

Sollte sich die Abstammung von einzelnen R2-Proben aus den bezeichneten Beständen als fraglich erweisen, kann zusätzlich eine Abstammungsanalyse mit genetischen Methoden (s. KONNERT et al. S.85) erfolgen.

Wenn bei R2-Proben das am Samen anhaftende (Flügelgewebe bei Bergahorn) oder im Samen enthaltene mütterliche Gewebe (weiblicher Gametophyt bei Koniferen) analysiert wird kann auf den Spenderbaum zurück geschlossen werden und bei Nichtübereinstimmung der genetischen Muster die Abstammung vom bezeichneten Baum ausgeschlossen werden. Solche Prüfungen setzen allerdings voraus, dass der Einzelbaum wieder aufgefunden werden kann also entweder markiert wurde oder mit geographischen Koordinaten beschrieben ist.

Ist die Authentizität der R2 in dieser Form überprüft und gesichert kann mit der Stabilisotopen-Methode relativ kostengünstig die Identität der R1- oder R3-Proben sowie die Identität aller gehandelten Teilmengen des Saatgutes bewiesen werden da sowohl R1 und R3 als auch die im Handel befindlichen Teilmengen die Gruppenmerkmale der R2 aufweisen müssen.

Genetische Analysen sind wiederum für den Nachweis der Abstammung von Pflanzen aus einer Saatgutpartie erforderlich, da die Pflanzen schon während ihrer Jugendentwicklung die Nährstoffe des Anzuchtortes aufnehmen und so in ihrem Stabilisotopengehalt geprägt werden.

Literatur

- BONER, M. (2005): Überprüfung der Authentizität von Rindfleisch (Bio) mit Hilfe der stabilen Isotope der Bioelemente. Dissertation Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn. 130 S.
- BONER, M.; FÖRSTEL, H. (2004): Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Anal. Bioanal. Chem* 378: 301-310.
- HAASE, B.; HOSIUS, B.; LEINEMANN, L. (2007): Das FfV-Verfahren stellt sich vor. *AFZ-Der Wald* (16): 852-853.
- KEHR, M. (2007): Herkunftsnachweis von zertifiziertem Forstsaatgut mit Hilfe der Stabil-Isotopen-Methode. Diplomarbeit der FH Aachen, Abteilung Jülich: 129 S.
- KONNERT, M., HUSSENDÖRFER, E. (2002): Herkunftssicherung bei forstlichem Vermehrungsgut durch Referenzproben. *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* 173: 97-104.

Anschriften der Autoren:

Dr. KARL GEBHARDT
Nordwestdeutsche Forstlich Versuchsanstalt, Abt. Waldgenressourcen
Prof.-Oelkers-Str. 6, 34346 Hann. Münden, Deutschland

Dr. MONIKA KONNERT
Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht
Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf, Deutschland

Prof. Dr. HILMAR FÖRSTEL
Agroisolab GmbH
Karl-Heinz-Beckurts-Str. 13, 52428 Jülich, Deutschland

GPS-gestützte Dokumentation von Saatguternten bei Waldbäumen: Erfahrungen und Perspektiven

Wolfgang Hüller und Karl Gebhardt

Zusammenfassung

Am Beispiel einer Kirschen-Saatguternte für Versuchszwecke im hessischen Forstamt Weilburg ist die Möglichkeit einer genauen Dokumentation der Position der Erntebäume und des Ernteablaufs mit Hilfe eines kleinen GPS-Hand-Empfängers überprüft worden. Mit relativ geringem Mehraufwand, d. h. die Aufnahme von Koordinaten und Eingabe der einzelnen Erntebaumnummern, wurde eine Möglichkeit aufgezeigt, auch Jahre nach einer Beerntung die Bäume oder auch Wurzelstöcke wieder aufzufinden. Somit können bei Verdachtsfällen, die beispielsweise erst nach Anlage einer Kultur auftreten, die Erntebäume wiederaufgefunden werden. Farbmarkierungen, sowie die langfristige Lagerung von Knospenmaterial lassen sich möglicherweise einsparen.

Schlagwörter: GPS-gestützte Dokumentation, forstliches Saatgut, Zertifizierung

GPS-based documentation of seed crops of forest trees: Experiences and Prospects

Abstract

By the example of a cherry seed harvest for experimental purposes which took place in the Hessian Forest district Weilburg, the possibility of an accurate documentation of the position and sequence of the harvested trees by use of a small GPS handheld was tested. With relatively little effort by the input of tree numbers and the recording of coordinates it will be possible to retrieve the harvested trees or the remaining stumps even years later. This allows for suspicious cases which often occur after the establishment of cultures, to trace back the harvested trees. By the way the colour marking, the collection and the long term storage of buds of the harvested trees can be possibly saved.

Key words: GPS-based documentation, forestry tree seed, certification

Einleitung

Das in Deutschland neu gefasste und seit 2003 geltende Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) regelt, dass nur in zugelassen Beständen Saat- und Pflanzgut bei insgesamt 26 Waldbaumarten gewonnen werden darf. Die Kontrolle der Beerntungen ist eine hoheitliche Aufgabe.

Ein zunehmender Saatgut- und Pflanzenhandel über Landesgrenzen hinweg (EU-Erweiterung), hoher Zeit- und Kostenaufwand der amtlichen Kontrollen sowie immer weniger Personal in den Behörden auf der einen Seite und ein hoher Preisdruck bei der Beschaffung der Forstpflanzen auf der anderen Seite begünstigen die Verwendung nicht angepasster Herkünfte. Die daraus resultierenden Probleme zeigen sich oft erst Jahre nach der Kulturbegründung mit negativen Folgen für Stabilität und Wirtschaftlichkeit zukünftiger Wälder.

Die Sicherheit der genauen Herkunft des gepflanzten Materials ist im Sinne des §1 Bundeswaldgesetz, sowie des FoVG eine entscheidende Forderung. Zunehmend wichtig wird es in diesem Zusammenhang Verfahren zu entwickeln, die auch nach der Ernte und sogar noch nach dem Ausbringen der Jungpflanzen in den Wald eine Kontrollmöglichkeit bieten, die Verwendung der richtigen Herkunft nachzuweisen.

Zertifizierungssysteme, wie beispielsweise ZüF oder FfV, bieten solche Möglichkeiten. Über genetische Methoden können Identitätsvergleiche zwischen Saatgut und Knospen entsprechender Elternbäume und teilweise auch mit den verbliebenen Wurzelstöcken sowie zwischen Saatgut und den daraus angezogenen Jungpflanzen erbracht werden.

Voraussetzung ist, dass bei Beerntungen und späterem Weitervertrieb von Saatgut sowie den daraus angezogenen Pflanzen jeweils Rückstellproben für jede Partie gezogen

werden. Für Baumarten die einzelbaumweise beerntet werden, bedeutet dies für jeden Erntebaum eine Probe

Lücken im Nachweisverfahren können jedoch entstehen, wenn beispielsweise Saatgut und anderes Pflanzenmaterial von außen in den Bestand gebracht wurde, bevor die Entnahme der 1. Referenzprobe erfolgt und die Referenzprobe dann schon aus der „falschen“ Partie stammt. Der saisonbedingte Kontrollaufwand staatlicher Behörden oder auch privatrechtlicher Zertifizierungssysteme ist jedoch so groß, dass sich die Kontrolle bisher nur auf das Verpacken der Einzelprobensäckchen in einen Sammelversandsack beschränkt. Beim tatsächlichen Einsammeln der Einzelbaumproben ist i. d. R. nur die Erntefirma anwesend.

Das bisher praktizierte Markieren der beernteten Einzelbäume mit Sprühfarbe oder Farbbänder kann nur wenige Jahre zur sicheren Rückverfolgung vom Saatgut zum Erntebaum genutzt werden und ist bei Kontrollfällen, die erst nach Anlage der Kulturen auftreten, ungeeignet.

Hier kann, wie unten beschrieben, ein satellitengestütztes Kontrollsystem helfen, das die beernteten Bäume genau und dauerhaft lokalisiert. Somit kann auch in vielen Fällen auf das Werben von Zweig- und Knospenmaterial und dessen Langzeitlagerung verzichtet werden. Im Kontrollfall ist dieses Material auch nachträglich verfügbar.

Kontrollbehörden und Zertifizierungssysteme hätten weiterhin die einfache Möglichkeit einer zeitnahen Plausibilitätskontrolle der Beerntung. Es besteht ebenso die Möglichkeit eine GPS-gestützte Ernteprognose, die von einer Behangkontrolle abgeleitet wurde mit der tatsächlich erfolgten Ernte oder mit früheren Ernten zu vergleichen.

Arbeitsablauf, Material und Methoden

Zur Erprobung der Methodik wurde bei der Beerntung eines Kirschenbestandes im hessischen Forstamt Weilburg ein GPS-Handgerät Modell GPSMAP 60Cx der Fa. Garmin (Abb. 1) eingesetzt. Das Gerät verfügt über einen hochempfindlichen SirfSTAR-III-GPS-Empfänger, der auch im voll belaubten Sommerwald oder bei bewölktem Himmel ausreichend genaue Satellitensignale empfängt. Das Gerät kann bis zu 1000 Einzelpunkte mit Beschreibungsmöglichkeit für Baumbezeichnungen speichern. Sämtliche Bewegungen im Erntebestand werden als sogenannte Track-Aufzeichnungspunkte erfasst und auf einer Speicherkarte gesichert. Neben den Koordinaten werden Datum und Uhrzeit erfasst und daraus ein Bewegungsprofil errechnet. Das Gerät wird mit 2 Mignon-Akkus betrieben, die voll geladen einen Arbeitstag reichen, aber auch jederzeit problemlos gewechselt werden können.

Mit entsprechender Software besteht die Möglichkeit sich bis zum Waldrand navigieren zu lassen.

Datenerfassung und -versand

Am Waldrand oder Erntebestand wird das Gerät eingeschaltet, findet innerhalb weniger Sekunden bis max. wenige Minuten die aktuelle Position und beginnt mit der Aufzeichnung der Bewegungen im Bestand. Das Gerät kann mit Clip am Gürtel oder Rucksack befestigt werden. Mit einer sogenannten Mark-Funktion werden dann die einzelnen Erntebäume erfasst, und es besteht die Möglichkeit, Einzelbaumbezeichnungen oder -nummern in das Gerät einzugeben, die dann den Einzelbaum-Referenzproben entsprechen.

Nach Abschluss der Ernte werden die Daten per USB-Anschluss auf einen PC gespielt und zeitnah an die Internetadresse einer

Kontroll- und / oder Zertifizierungsstelle gesendet.



Abb. 1: Kartenfähiger GPS-Handempfänger mit Farbdisplay-Darstellung

Fig. 1: GPS handheld equipped with a color display and digital maps source

Ergebnisse

Zur Überprüfung der Daten wurden verschiedene Karten, wie die Forstwirtschaftskarte (Abb. 2), die genauere Forstgrundkarte (Abb. 3) oder die Topografische Karte (Abb. 4) mit einem PC-Programm (z. B. Fugawi) georeferenziert, sprich in ein geografisches Koordinatensystem eingepasst.

Die folgenden Abbildungen 2 bis 4 zeigen die Anpassung der Daten des Erntebestandes an die verschiedenen Kartenwerke.

Diese Anpassung eröffnet die Möglichkeit einer Plausibilitätskontrolle, da Lage und Größe des Erntebestandes dargestellt werden.

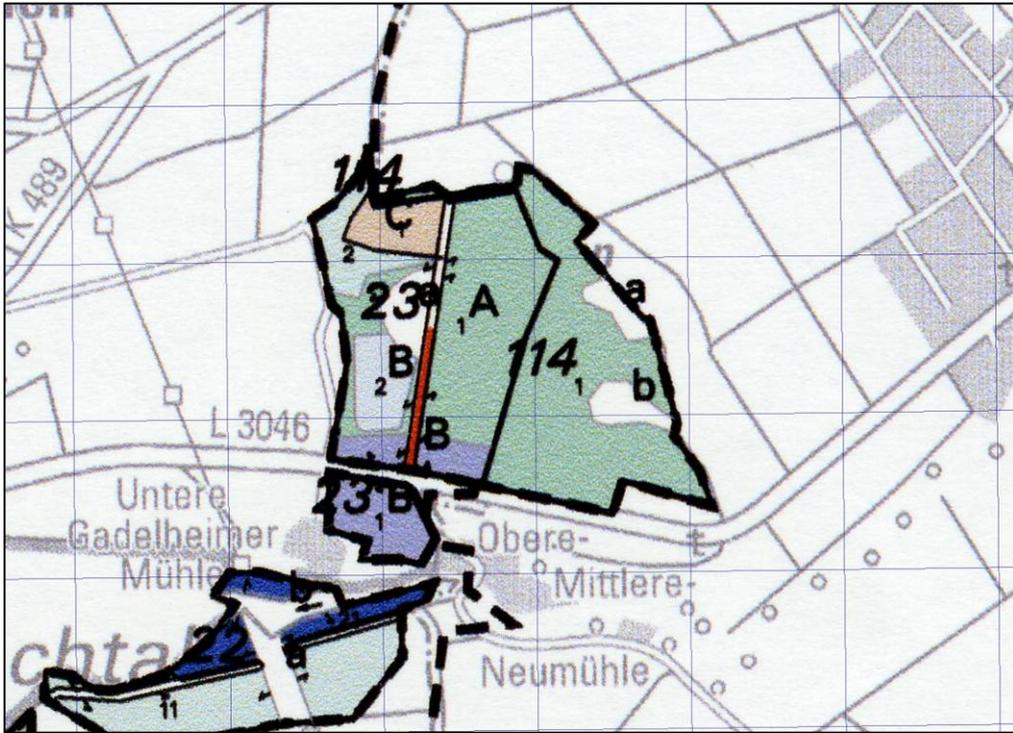


Abb. 2: Auszug der Forstwirtschaftskarte (1:25.000) des Forstamts Weilburg mit Kirschenbestand
Fig. 2: Excerpt of the forestry map (1:25.000) of forest district Weilburg with a stand of cherries

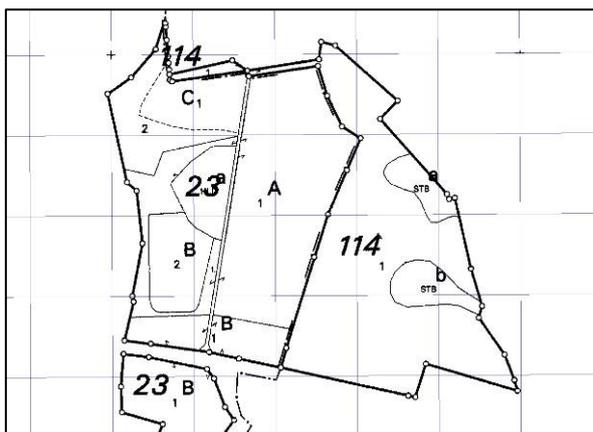


Abb. 3: Forstgrundkarte 1:5.000; Ausschnitt des Erntebestandes
Fig. 3: Basic forestry map 1:5.000; excerpt of the harvested stand

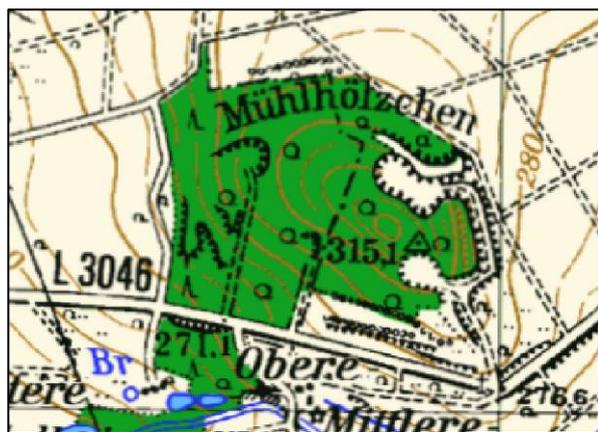


Abb. 4: Topografische Karte 1:25.000; Ausschnitt des Erntebestandes
Fig. 4: Topographic map 1:25.000; excerpt of the harvested stand

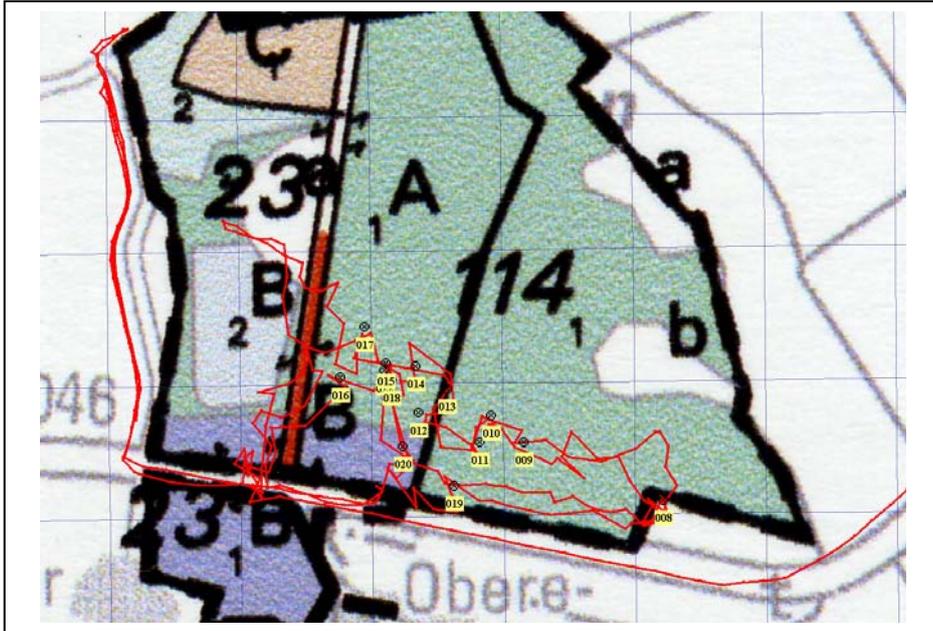


Abb. 5: Forstwirtschaftskarte 1:25.000; Ausschnitt des Erntebestandes mit Position der Erntebäume und Bewegungsprofil (grobe Darstellung). Die Abfolge der Nummern entspricht der Reihenfolge der Beerntung.

Fig. 5: Forestry map 1:25.000; excerpt of the harvested stand exhibiting position of the harvested trees and profile of movement (crude display). The sequence of numbers is in order of seed harvest.

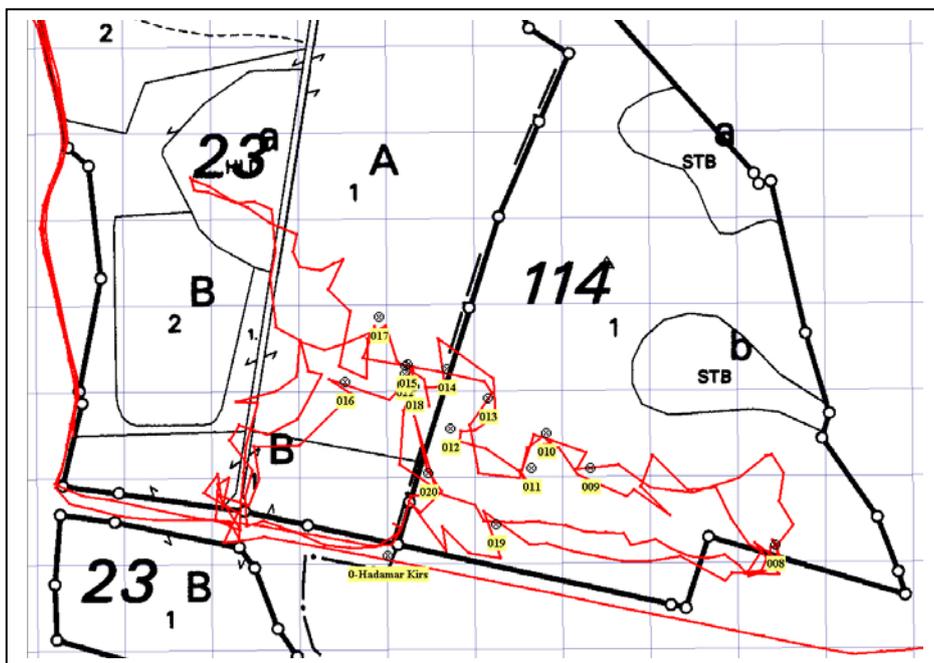


Abb. 6: Forstgrundkarte 1:5.000; Ausschnitt des Erntebestandes mit Erntebäumen und Bewegungsprofil (genaue Darstellung). Die Abfolge der Nummern entspricht der Reihenfolge der Beerntung.

Fig. 6: Basic forestry map 1:5.000; excerpt of the harvested stand exhibiting position of harvested trees and profile of movement (fine display). The sequence of numbers is in order of the harvest.

Plausibilitätskontrolle

Dem örtlichen Revierleiter werden die Daten oder ein Ausdruck übersandt. Dieser überprüft die Darstellung auf Plausibilität. Die Daten sollten dann in einem möglichst programmunabhängigen, allgemein lesbaren Text-Format (z. B. GPX-Datei, Abb. 7) in einer Datenbank, die das Sammelbuch ergänzt, abgelegt werden. Programmabhängige Formate bieten in der Regel zwar einen höheren Bedienkomfort, eine programmunabhängige Lesbarkeit ist über viele Jahre jedoch oft nicht gegeben.

Die Daten dienen zur Kontrolle darauffolgender Beerntungen oder bei einem Überprüfungsbedarf auch nach Jahren dem Wiederauffinden der Erntebäume oder Wurzelstöcke.

User Waypoint	N51 26 01.7 E9 45 09.2
User Waypoint	N51 26 02.0 E9 45 04.9
User Waypoint	N51 26 00.0 E9 45 07.9
User Waypoint	N51 25 59.5 E9 45 09.1
User Waypoint	N51 26 02.7 E9 45 07.3
User Waypoint	N51 26 02.6 E9 45 09.1
User Waypoint	N51 26 03.8 E9 45 10.2

Abb. 7: GPX-Dateiformat, von vielen Programmen sicher auch in Zukunft lesbar

Fig. 7: GPX file expected to be compatible to future programs

Wie in Abbildung 8 gezeigt, erleichtert die Darstellung der Positionsdaten in den dreidimensionalen Bildern von GoogleEarth oder in entsprechenden Luftbildern die Orientierung und das Wiederauffinden der Erntebäume in der Landschaft.

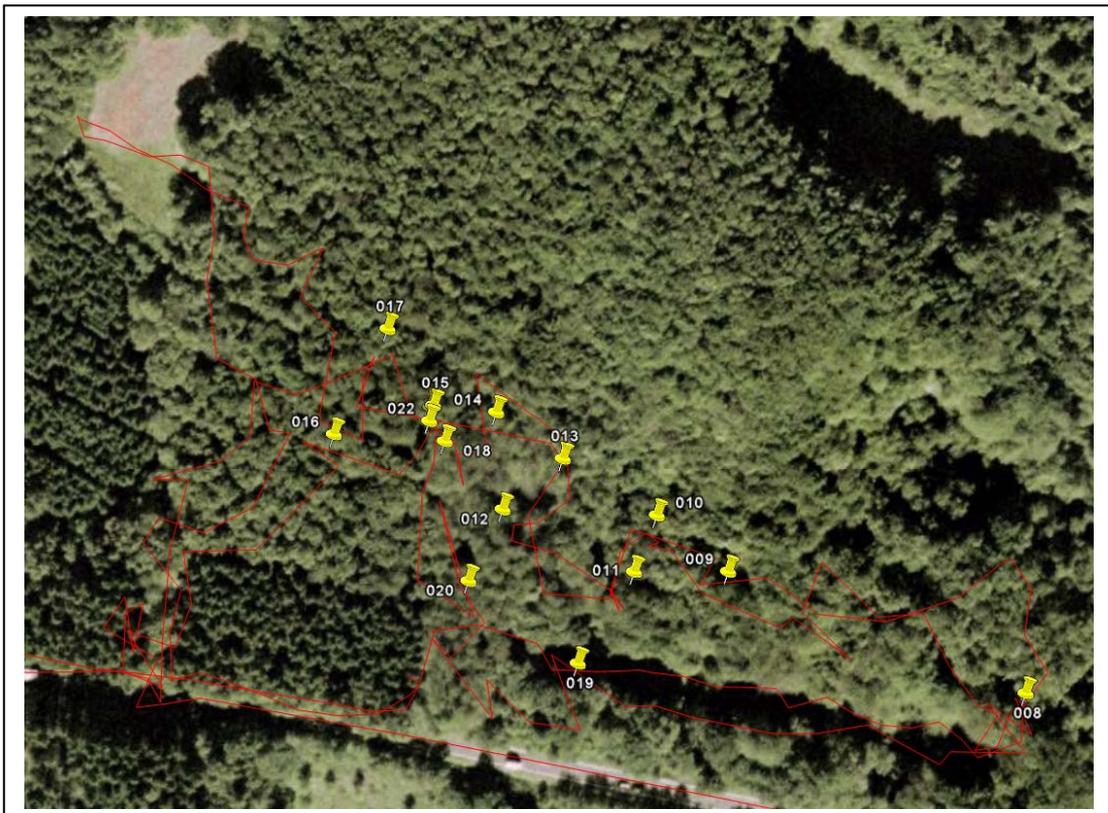


Abb. 8: Bestand mit Erntebäumen und Bewegungsprofil in GoogleEarth dargestellt

Fig. 8: Stand with position of harvested trees and profile of movement, displayed in GoogleEarth

Diskussion

Dieses Verfahren ist bei allen Baumarten, die einzelstammweise beerntet werden, sehr gut einsetzbar, aber auch bei der Bucheckernernte kann z. B. die Lage der Netze dokumentiert werden. In Verbindung mit den genauen Zeitangaben, den herrschenden Wetterverhältnissen und Hauptwindrichtungen lässt sich die Anzahl der potentiellen Mutterbäume auch bei einer Netzernte grob abschätzen. Bei der Eichenernte kann durch eine Erfassung der Hauptsammelplätze im Bestand ähnlich verfahren werden.

Genetische Untersuchungen können die dokumentierten Angaben zur Anzahl und Identität der Erntebäume verifizieren oder falsifizieren.

Vorteile:

- Dauerhafte Dokumentation der Erntebäume / Lage der Erntenetze durch ein schnelles und kostengünstiges, zeitgenaues Verfahren.
- Übersicht der Verteilung der Erntebäume im Bestand.
- Problemloses Wiederauffinden der meisten Erntebäume auch nach vielen Jahren.
- Leichte und schnelle Plausibilitätsprüfung durch den Revierleiter vor Ort.
- Eingrenzung der möglichen Erntebäume für Kontrolluntersuchungen.
- Mögliche Reduktion oder Einsparung der Werbungs- und Lagerungskosten von Knospen- und Zweigproben für Überprüfungs-zwecke oder Zertifizierung.

Anschrift der Autoren:

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

Grenzen des Verfahrens:

Bei freier Sicht zum Himmel sind Genauigkeiten bis 3 m Radius zu erreichen. Die Genauigkeit bei stark bewölktem Himmel und dichtem Blätterdach kann sich auf bis zu 8 m Radius verschlechtern.

Die Positionierung von einzelnen Bäumen im Erntebestand mit Abständen unter diesen Werten ist nicht zu 100 % sicher.

Bei eng stehenden Erntebäumen müssen im Zweifel alle in Frage kommenden Bäume beprobt werden.

Ausblick

Die Genauigkeit der Positionsbestimmung wird bei zukünftigen Gerätegenerationen und neuen Satellitensystemen (Galileo) sicherlich noch weiter verbessert werden. Die Verfügbarkeit digitaler Karten und Luftbilder wird zunehmen und die Beschaffung kostengünstiger werden.

Situation der amtlichen Herkunftskontrolle (in Bayern)

Anton Paulus

Zusammenfassung

Vorrangiger Zweck des Forstvermehrungsgutgesetzes ist die Identitätssicherung, die durch Kontrolle von Erzeugung, Handel und Vertrieb des forstlichen Vermehrungsgutes sicherzustellen ist. Kontrollbeamte dürfen Grundstücke und Geschäftsräume betreten, Auskünfte verlangen, Prüfungen vornehmen, Proben entnehmen und Unterlagen einsehen. Nach einer Darstellung der rechtlichen Grundlagen folgen Ausführungen zur Organisation und Geschichte des Kontrollwesens in Bayern. Es werden Zuständigkeiten, Aufgabenverteilung, Kontrollverfahren und -aufwand sowie Prinzipien und Akzeptanz der amtlichen Kontrolle beschrieben. Wesentlicher Berührungspunkt zwischen amtlicher Kontrolle und privatrechtlicher Zertifizierung ist die Ausstellung des Stammzertifikates und die Unterzeichnung eines Ernteprotokolls durch eine Amtsperson.

Schlagwörter: Forstliches Vermehrungsgut, Zertifizierung, amtliche Kontrolle

Situation of the official control of forest reproductive material (in Bavaria)

Abstract

The primary purpose of the German Act on Forest Reproductive Material is the identity assurance by control of production, trade and distribution of forest reproductive material. Officials are allowed to control land and business premises, enter information which audits, to collect samples and documents any time. After a presentation of the legal foundations, the organization and history of the official control system in Bavaria is shown. Responsibilities, tasks, control procedures and expenses, as well as principles and acceptance of the official control are described. The main contact point between official control and private certification is the release of the master certificate of identity for reproductive material and the signature of a harvest protocol by an official person.

Key words: forest reproductive material, certification, official control

Vorbemerkungen

Vorrangiger Zweck des Forstvermehrungsgutgesetzes (FoVG) ist die Identitätssicherung, die weitgehend mit der Herkunftssicherung identisch ist.

Aus dem Titel könnte möglicherweise der Eindruck entstehen, dass die Herkunftskontrolle ein Teil der Kontrolle wäre. Dem ist nicht so! Da der Zweck des FoVG die Herkunftssicherung ist, dient die gesamte Kontrolle diesem Zweck. In diesem Sinne wird der allgemeinere Begriff „Kontrolle“ hier verwendet.

Die Durchführung der Kontrolle obliegt in Deutschland Länderzuständigkeit. Die hier getroffenen Aussagen gelten zuerst für Bayern, die Kontrolle ist aber in allen Bundesländern ähnlich organisiert und folgt denselben Grundsätzen.

Rechtliche Grundlagen für die Kontrolle

Das FoVG erstreckt sich auf alle Stufen der Erzeugung, beginnend von der Ernte des Samenkorns bis zur Abgabe der Forstpflanzen an den Waldbesitzer. Eine Kontrolle, die sich nur auf die Prüfung der Bücher und der Nachzuchtflächen beschränken würde, wäre ungenügend! Die Kontrolle muss sich auf alle Stufen der Erzeugung erstrecken und hier vor allem auch auf die Ernte.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass ein Kontrollbeamter einen frühzeitigen Überblick über das Erntegeschehen in seinem Bereich bekommt. Sehr hilfreich dafür ist die bayerische Regelung, dass die Ämter für Landwirtschaft und Forsten alle benötigten Stammzertifikate bei den Kontrollbeamten anfordern müssen und diese von den Kontrollbeamten vorbereitet werden.

In § 18 FoVG ist geregelt, wer die Kontrolle in den Ländern durchführt. Dies sind die zuständigen Landesstellen, die wiederum Personen mit der Kontrolle beauftragen können.

Diese dürfen

- Grundstücke, Geschäftsräume usw. betreten;
- Auskünfte verlangen;
- Prüfungen vornehmen;
- Proben entnehmen;
- Geschäftliche Unterlagen einsehen.

Nachdem Grundlage des Forstvermehrungsgutgesetzes die Richtlinie 1999/105/EG (Council Directive 1999/105/EC) des Rates der Europäischen Union ist, werden die Vorschriften für die Kontrolle auch in den anderen EU-Ländern in ähnlicher Form umgesetzt.

Darüber hinaus gibt es auch Regelungen für die gegenseitige Amtshilfe. Ein Ausfluss dieser Vorschrift ist z. B. die Information des Kontrollbeamten über Vermehrungsgut, das aus anderen EU-Ländern in seinen Kontrollbezirk verbracht wurde.

Die Einfuhr aus Drittländern – also nicht EU-Ländern – wird überwacht von der Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft (BLE) unter Mitwirkung des Zolls.

In Firmen, die sehr viel ein- und ausführen, kann von der BLE ohne weiteres auch einmal eine Prüfung angesetzt werden.

Organisation der Kontrolle in Bayern

- Landesstelle am Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP) in Teisendorf angesiedelt (2 Mitarbeiter des höheren Dienstes)
- 4 Kontrollbeamte auf 3,5 Stellen des gehobenen technischen Forstdienstes (angesiedelt am ASP und an 2 Ämtern für Landwirtschaft und Forsten)
- Ämter für Landwirtschaft und Forsten mit Revierleitern

Abbildung 1 zeigt die kartenmäßige Darstellung der Kontrollbezirke der Kontrollbeamten. In Bayern haben wir noch 46 Ämter für Landwirtschaft und Forsten (ÄLF), die u. a. für hoheitliche Aufgaben zuständig sind. Der gesamte Staatswald ist abgegliedert und in Form einer Anstalt des öffentlichen Rechts organisiert.

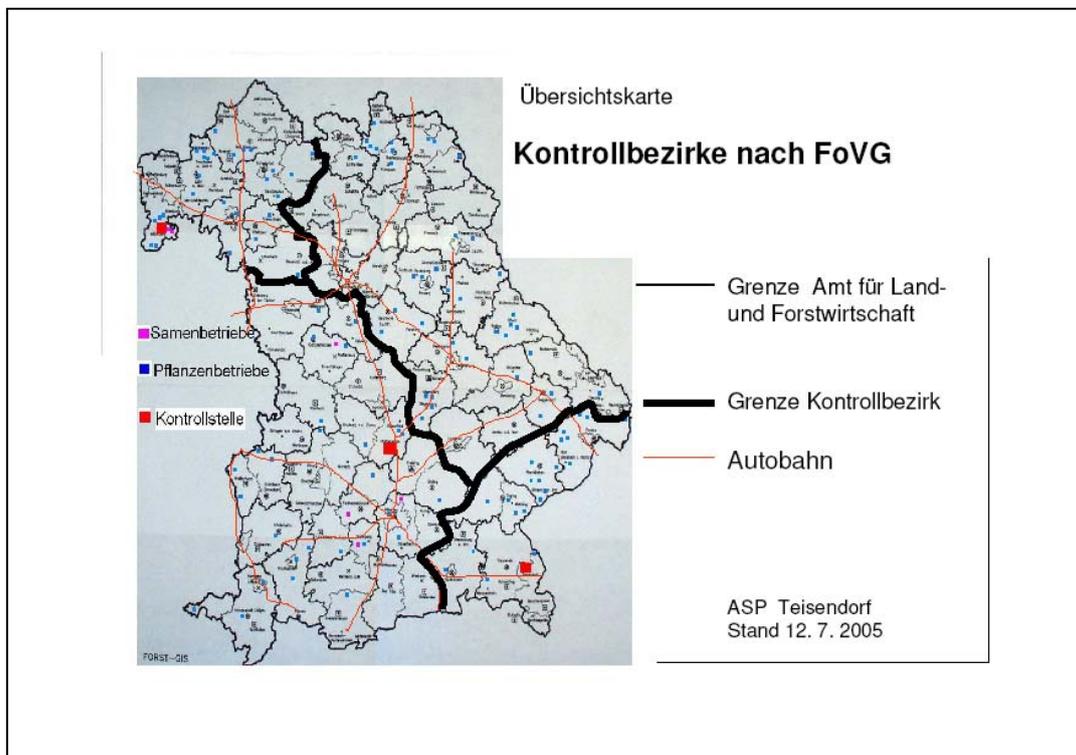


Abb. 1: Kontrollbezirke und Lage der Ämter für Landwirtschaft und Forsten in Bayern
Fig. 1: Control districts and location of the State offices for Agriculture and Forestry in Bavaria

Geschichte des Kontrollwesens in Bayern

Bayern hat eine längere Entwicklung des Kontrollwesens durchgemacht:

- Zunächst war jeder Forstamtsleiter (bzw. sein Stellvertreter) in seinem Bereich Kontrollbeamter. Damals galt noch das Prinzip des Einheitsforstamtes. In den 80er Jahren hatten wir ca. 140 Forstämter und damit 140 mögliche Kontrollbeamte.
- 1999 wurde das System dahingehend geändert, dass nur noch 10-12 Kollegen des höheren oder gehobenen Dienstes für die Kontrolle zuständig waren, allerdings immer neben einer anderen Haupttätigkeit.
- Mit der Forstreform zum 1.7.2005 wurde das Kontrollsystem weitgehend den Strukturen der anderen Bundesländer angeglichen.

Zuständigkeiten und Aufgabenverteilung in Bayern

Landesstelle

- Fachvorgesetzte Stelle der Kontrollbeamten
- Zulassung von Erntebeständen, Führung des Erntezulassungsregisters
- Anmeldung, Löschung, Untersagung der Fortführung von Forstamen- und Forstpflanzenbetrieben
- Verfolgung von Ordnungswidrigkeiten auf dem Gebiet des FoVG

Kontrollbeamte

- Kontrolle von Forstamen- und Forstpflanzenbetrieben
- Ausstellung von Mischungsstammzertifikaten
- Unterstützung der ÄLF bei der Kontrolle von Ernten von Vermehrungsgut
- Vorbereitung der Stammzertifikate

Ämter für Landwirtschaft und Forsten sowie Revierleiter:

- Kontrolle der Ernten von Vermehrungsgut in allen Waldbesitzarten
- Ausstellen von Stammzertifikaten

Prinzipien der Kontrolle in Bayern

Kontrollbeamte und Landesstelle sehen ihre Aufgabe nicht nur in der Kontrolle sondern auch in der Beratung, Information und der Erbringung gewisser Serviceleistungen auf dem Gebiet des FoVG für die Betriebe und die Ämter für Landwirtschaft und Forsten. Dies reicht von der Information zu Fragen zum FoVG über das Internetangebot des ASP bis zur Erarbeitung von Merkblättern für die unterschiedliche Klientel.

Ein wichtiges Prinzip ist der Grundsatz „Prävention vor Verfolgung“. Dazu ein Beispiel: 2 Firmen haben in einem Jahr, in dem bei einer bestimmten Baumart keinerlei Erntemöglichkeiten zu erwarten waren, trotzdem Netzernten in die Wege geleitet. Wir haben uns daraufhin die Ernten näher betrachtet und festgestellt, dass – wenn überhaupt – nur taubes Material auf den Netzen lag. Wir teilten das den Firmen mit,

damit sie wussten, dass diese Ernten kritisch von uns beobachtet wurden.

Die amtliche Kontrolle stellt klare Anforderungen an die Betriebe, was sie zu beachten haben und in welcher Form etwas von ihnen erwartet wird.

Ein weiteres Prinzip ist die Gleichbehandlung privater und staatlicher Forst-samen- und Forstpflanzenbetriebe, aber auch großer und kleiner Betriebe.

Die amtliche Kontrolle drängt z. B. darauf, dass auch kleine Pflanzenhändler oder Firmen, die Komplettkulturen – also Pflanze und Arbeitsleistung – anbieten, ebenso wie spezialisierte große Betriebe die Vorschriften des FoVG erfüllen. Das FoVG darf nicht nur für die großen Betriebe gelten.

Zum Prinzip Unvoreingenommenheit gehört, dass ohne Vorurteile an die Sache herangegangen wird. Unter Vermeidung von Emotionen verstehe ich beispielsweise, dass Vorfälle möglichst nicht persönlich genommen und abgeschlossene Fälle nicht weiter nachgetragen werden. Man sollte auch nach einem Streitfall noch miteinander umgehen können!

Eine Selbstverständlichkeit ist Verschwiegenheit. Das FoVG (§ 18) enthält die Bestimmung „Die erlangten Informationen dürfen nur zur Durchführung dieses Gesetzes verwendet werden.“. Dieser Grundsatz bezieht sich auf alles, was im Zusammenhang mit der Kontrolle bekannt wird, ob es nun Geschäftsvorgänge oder aber auch Sanktionen, wie z. B. die Verhängung einer Ordnungswidrigkeit, sind.

Jeder von uns wäre mit Recht erbost, wenn die Polizei verbreiten würde, welche Ordnungswidrigkeit man begangen hat. Manche Bescheide über Ordnungswidrigkeiten enthalten z. B. die Auflage, die Käufer des Pflanzmaterials zu informieren. Hier ist es natürlich nicht zu vermeiden, dass die Angelegenheit bekannt wird und u. U. zu

einem gewissen Imageschaden für die betreffende Firma führen kann.

Gegenstand der Kontrolle

Gegenstand sind

- alle Stufen der Erzeugung:
 - Saatguternte
 - Bearbeitung, Produktion, Lagerung von Vermehrungsgut (Saatgut, Pflanzen, Wildlingen, Pflanzenteilen)
 - Vertrieb von Vermehrungsgut
 - bei Pflanzenteilen (Stecklingen) auch die Anlage der Mutterquartiere
- Bücher, Lagepläne, Belege (z. B. Stammzertifikate, Einfuhrzeugnisse, Lieferpapiere), Etikettierung

Kontrollverfahren

Kontrollverfahren umfassen die Prüfung von Büchern, Lageplänen, Belegen und Etikettierung.

Die Kontrollbeamten des Bundesgebietes und teilweise auch einiger Nachbarstaaten – wie z. B. Österreich – pflegen sehr gute Kontakte untereinander. Kontrollersuchen oder aber auch verdachtsunabhängige Quermitteilungen werden auf direktem Weg zwischen den Kontrollbeamten weitergegeben und bearbeitet.

Bei der Prüfung von Saatgut- und Pflanzenbeständen wird die Übereinstimmung mit der Kontrollbuchführung und der Mengennachweis überprüft.

Anhand von Plausibilitäten können z. B. Ausbeuteergebnisse bei der Saatgutgewinnung und der Pflanzenproduktion überprüft werden. Bei Zweifeln an den Altersangaben von Pflanzenpartien ist in verschiedenen Instituten die mikroskopische Jahrringanalyse möglich.

Immer bessere Methoden biochemisch-genetischer Prüfungen ermöglichen bei

vermuteten Verstößen gegen das FoVG die Beweisführung. Allerdings ist dieses Gebiet so komplex und fachspezifisch, dass Kontrollbeamte für jeden Kontrollfall, bei dem diese Methoden zur Anwendung kommen sollen, Rücksprache mit dem ASP (Landesstelle) nehmen. Von dort ihnen, auf die Problemstellung zugeschnitten, mitgeteilt wird, welche und wie viele Proben und welche Vergleichsproben notwendig sind.

Aus meiner Amtspraxis dazu 2 Fälle:

- In einem Fall wurde ein Mutterquartier angelegt mit 2 verschiedenen Pappelklonen. Da Zweifel an der Identität der Klone aufkam, wurde aus jedem Beet von einer Stichprobe der Aufwüchse Knospenproben entnommen und genetisch untersucht. In diesem Fall konnte die Identität der Klone bestätigt werden.
- In einem anderen Fall wurden bei der Beerntung von Vogelkirschen vom Kontrollbeamten bei einer Erntekontrolle nur wenige kleine braune Kerne vorgefunden. Bei einer späteren zweiten Kontrolle fand er deutlich mehr größere helle Samen vor. In genetischen Vergleichen mit Kambiumproben der Erntebäume konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrheit der größeren Samen nicht von den Bäumen stammen konnte, unter denen sie gesammelt wurden.

Kontrollaufwand

Arten der Kontrolle

- Erntekontrollen
- Unangemeldete Betriebskontrollen
- Angemeldete Betriebskontrollen

Häufigkeit der Kontrollen:

In Bayern sind derzeit ca. 170 Forstsamen- und Forstpflanzenbetriebe angemeldet. Die Kontrollbeamten bemühen sich, jährlich eine unangemeldete Betriebskontrolle – als

Versandkontrolle - und eine angemeldete Kontrolle durchzuführen.

Zeitlicher Aufwand:

Der zeitliche Aufwand für eine angemeldete Betriebskontrolle ist sehr unterschiedlich und hängt ab von

- dem Umfang der Geschäftsvorgänge,
- den Beständen,
- der Intensität und
- dem Zeitpunkt der letzten Kontrolle.

Dabei kann bei großen Betrieben der Kontrollaufwand bis zu 6 oder 7 Tagen betragen. Das bedeutet aber nicht, dass der Kontrollbeamte so lange im Betrieb bleibt. Individuell wird dazu übergegangen, die Firmenunterlagen abzuholen, im Büro vorzuprüfen und an einem Tag mit den Verantwortlichen zu besprechen sowie die Außenprüfung durchzuführen.

Verhältnis von staatlicher Kontrolle und privatem ZüF

Das ZüF-Verfahren ist privatrechtlicher Natur. Der einzige Berührungspunkt zwischen ZüF und staatlicher Kontrolle besteht bei der Ausstellung des Stammerzifikates. Hier wird bei Laubbäumen in Anwesenheit des zuständigen Revierleiters von der Erntefirma die Mischprobe aus der gesamten Erntepartie entnommen. Der zuständige Revierleiter unterzeichnet auch das ZüF-Ernteprotokoll und bestätigt damit die Verpackung und Verplombung der Proben.

Für die Kontrolle ist natürlich auch interessant zu wissen, wie es um die Weitergabe von Informationen an die Kontrollbeamten bzw. die Einholung von Auskünften bei ZüF steht.

Generell kann gesagt werden, dass hier sehr hohe Hürden für die Weitergabe von

Informationen an die staatlichen Kontrollgremien bestehen:

- Kontrollbeamte können Auskünfte nur auf Antrag und mit Beschluss des Vorstandes erhalten.
- Der Zertifizierer kann Verstöße gegen das FoVG mit Beschluss des Vorstandes an die staatlichen Kontrollgremien weitergeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es derzeit keine Synergien zwischen ZüF und staatlicher Kontrolle gibt!

Erfolge und Akzeptanz staatlicher Kontrolle

Selbstverständlich ist es ein Erfolg der Kontrolle, wenn ein Verstoß gegen das FoVG aufgedeckt wird.

Ein Erfolg ist es auch, wenn Verstöße gegen das FoVG verhindert werden. Allerdings liegt es hier z. T. im Bereich von Mutmaßungen, was evtl. hätte passieren können, gäbe es nicht die staatliche Kontrolle. Es sei an den geschilderten Fall erinnert, wo Firmen trotz nicht vorhandener Erntemöglichkeiten Saatguternten eingeleitet haben.

Wenn von den Firmen erkannt wird, dass Verstöße gegen das FoVG zu riskant sind, ist das ebenfalls als Erfolg zu bewerten.

Wir sehen es auch als Erfolg, wenn ein gewisses Vertrauen in die Kontrollinstanzen entsteht und sich Firmen bei schwierigen Sachverhalten bereits im Vorfeld an die Kontrollbeamten wenden und sich abstimmen – anstatt ein Ordnungswidrigkeitenverfahren und Korrekturschreiben an die Kundschaft zu riskieren.

Anschrift des Autors:

ANTON PAULUS
Kontroll- und Servicestelle FoVG 3, Amt für Landwirtschaft und Forsten
85276 Pfaffenhofen/Ilm, Deutschland

Im ersten Moment paradox hört es sich an, wenn wir feststellen, dass es ein Erfolg ist, wenn eine Baumschule nicht alles gewünschte Material liefern kann. Gerade im Herbst 2006 und im Frühjahr 2007 haben uns einige Anrufe von Kollegen aus dem Revierdienst erreicht, die bemängelten, dass eine Baumschule diese oder jene Pflanzensortimente nicht liefern kann. Wir gaben den Kollegen zur Antwort, dass diese Tatsache positiv gesehen werden muss, da es besser ist, in einer Saison keine Pflanzen zu bekommen, als „irgendwas“ geliefert zu bekommen.

Abschließend einige persönliche Bemerkungen zur Akzeptanz:

Wenn wir Kontrollbeamte die Akzeptanz unserer Kontrolle beurteilen sollen, kann dies nur mit Vorbehalt geschehen. Würden wir von den Betrieben über alles gelobt werden, wäre das nur auf den ersten Blick positiv. Denn der Rückschluss wäre, dass wir zu harmlos sind!

Wichtiger sind hier m. E. die kleinen Nebenbemerkungen, die bei verschiedenen Gelegenheiten abgegeben werden – auch gegenüber Dritten - die wir dann manchmal erfahren und die von mir zu folgenden Aussagen zusammengesetzt werden:

Unser Vorgehen besitzt bei den Firmen eine hohe Akzeptanz, da

- es von den Firmen gewürdigt wird, dass wir nicht nur kontrollieren, sondern auch beratend wirken und Serviceleistungen erbringen;
- durch eine intensivere Kontrolle die Mehrheit der korrekt arbeitenden Firmen gestärkt wird gegenüber den schwarzen Schafen.

Herkunfiskontrolle im Rahmen von PEFC

Dirk Teegelbekkers

Zusammenfassung

Es werden die Ziele, die Organisation, der Ablauf der Zertifizierung und der erreichte Stand des internationalen Zertifizierungssystems PEFC (Programme for the Endorsement of Forest Certification Schemes) dargestellt. Das PEFC-Gütesiegel steht für nachhaltige, pflegliche und verantwortungsbewusste Waldbewirtschaftung. So werden unsere Wälder für gegenwärtige und zukünftige Generationen erhalten: als Lebensgrundlage, Arbeitsplatz und Erholungsraum. Das Ziel von PEFC ist es, die Waldbewirtschaftung ständig zu verbessern, den Wald zu erhalten sowie seine positiven Wirkungen auf die Umwelt zu sichern. Für die Verwendung von forstlichem Vermehrungsgut gilt: *„Es ist Saat- und Pflanzgut mit überprüfbarer Herkunft zu verwenden, soweit es am Markt verfügbar ist.“* Die Überprüfbarkeit der Herkunft (Identität) wird durch ein fachlich allgemein anerkanntes Verfahren sichergestellt.

Schlagwörter: PEFC, forstliches Vermehrungsgut, Zertifizierung

Control of forest reproductive material within the framework of PEFC

Abstract

The objectives, the organization, the process of certification and the achieved status of the international certification system PEFC (Programme for the Endorsement of Forest Certification Schemes) is presented. The PEFC label stands for sustainable, careful and responsible forest management. So our forests will be a basis for life, work and recreation for present and future generations. The aim is to continuously improve the forest management and to preserve its positive effects on the environment. Therefore forest reproductive material (seeds, plants and seedlings) of verifiable origin must be used, where it is available on the market. The verifiability of origin (identity) is to ensure by a generally accepted and technically safe procedure.

Key words: PEFC, forest reproductive material, certification

Einleitung - Hintergrund

Das Zertifizierungssystem für nachhaltige Waldbewirtschaftung PEFC basiert inhaltlich auf internationalen Beschlüssen der Nachfolgekonferenzen der Umweltkonferenz von Rio (1992). Bei uns sind dies die Kriterien und Indikatoren, die auf den Ministerkonferenzen zum Schutz der Wälder in Europa (Helsinki 1993, Lissabon 1998, Wien 2003) von 37 Nationen im Pan-Europäischen Prozess verabschiedet wurden.

Ziele

Vorrangiges Ziel von PEFC ist die Dokumentation und Verbesserung der nachhaltigen Waldbewirtschaftung im Hinblick auf ökonomische, ökologische sowie soziale Standards. Ferner bietet die Forstzertifizierung ein hervorragendes Marketinginstrument für den nachwachsenden Rohstoff Holz, das zur Verbesserung des Images der Forstwirtschaft und ihrer Marktpartner beiträgt.

Rückblick

Der PEFC-Prozess wurde im August 1998 von skandinavischen, französischen, österreichischen und deutschen Waldbesitzern zusammen mit Vertretern der Holzwirtschaft initiiert. Vorausgegangen waren intensive Diskussionen zwischen Repräsentanten dieser Länder. Als Pan European Forest Certification Council (= PEFC) am 30. Juni 1999 in Paris gegründet, traten 2002 auch nicht-europäische Mitglieder bei, so dass am 31. Oktober 2003 die Bedeutung des Akronyms PEFC in „Programme for the Endorsement of Forest Certification Schemes“ geändert wurde. PEFC bildet den internationalen Rahmen zur Anerkennung nationaler Zertifizierungssysteme und -initiativen. Das Technische Dokument sowie die Satzung des PEFC (siehe <http://www.pefc.org>) definieren Mindestanforderungen für Forstzertifizierungssysteme

und Standards, die auf nationaler und regionaler Ebene erfüllt werden müssen. Holz und Holzprodukte, die den Anforderungen von PEFC genügen, können mit dem PEFC-Gütesiegel gekennzeichnet werden, wenn ein glaubwürdiger Produktkettennachweis (sprich: Chain-of-Custody) sichergestellt ist.

Charakteristika

Aufgrund des regionalen Ansatzes ist PEFC kosteneffizient und für sämtliche Waldbesitzer, insbesondere die in Deutschland typischen Familienforstbetriebe, geeignet. Eine Überprüfung durch unabhängige Gutachter gibt Kunden und Marktpartnern die Gewähr, dass die Wälder nach hohen Standards bewirtschaftet werden. PEFC ist offen für die Anerkennung anderer forstlicher Zertifizierungssysteme, sofern sie ebenfalls glaubwürdig, freiwillig und transparent sind und Waldbesitzer nicht diskriminieren.

Gremien in Deutschland

Das wichtigste Gremium im Hinblick auf Zertifizierungssystem und -kriterien ist der Deutsche Forst-Zertifizierungsrat (DFZR), in dem Entscheidungen in offener und transparenter Form getroffen werden. Der DFZR wird von den Mitgliedern von PEFC Deutschland e. V. gewählt. Im DFZR sind Vertreter des Privat-, Staats- und Körperschaftswaldes, der Holzwirtschaft und Papierindustrie, der Umweltverbände, der Berufsvertretungen, der Forstunternehmer sowie weiterer gesellschaftlicher Gruppen vertreten. Das deutsche PEFC-System wurde am 7. März 2000 vom DFZR verabschiedet und am 31. Juli 2000 vom PEFC-Council anerkannt. Die nach fünf Jahren obligatorische Revision des Systems wurde am 9. Dezember 2005 mit der erneuten Anerkennung durch das PEFC-Council abgeschlossen.

Stand der Zertifizierung in Deutschland

66 Prozent der bundesdeutschen Waldfläche in 13 Regionen (s. Abb. 1 – grün koloriert) sind zurzeit unter dem Dach von PEFC. Legt man eine Umfrage vom Dezember 1999

zugrunde, werden sich Waldeigentümer mit einer Gesamtfläche von 7,7 Mio. Hektar für PEFC entscheiden.

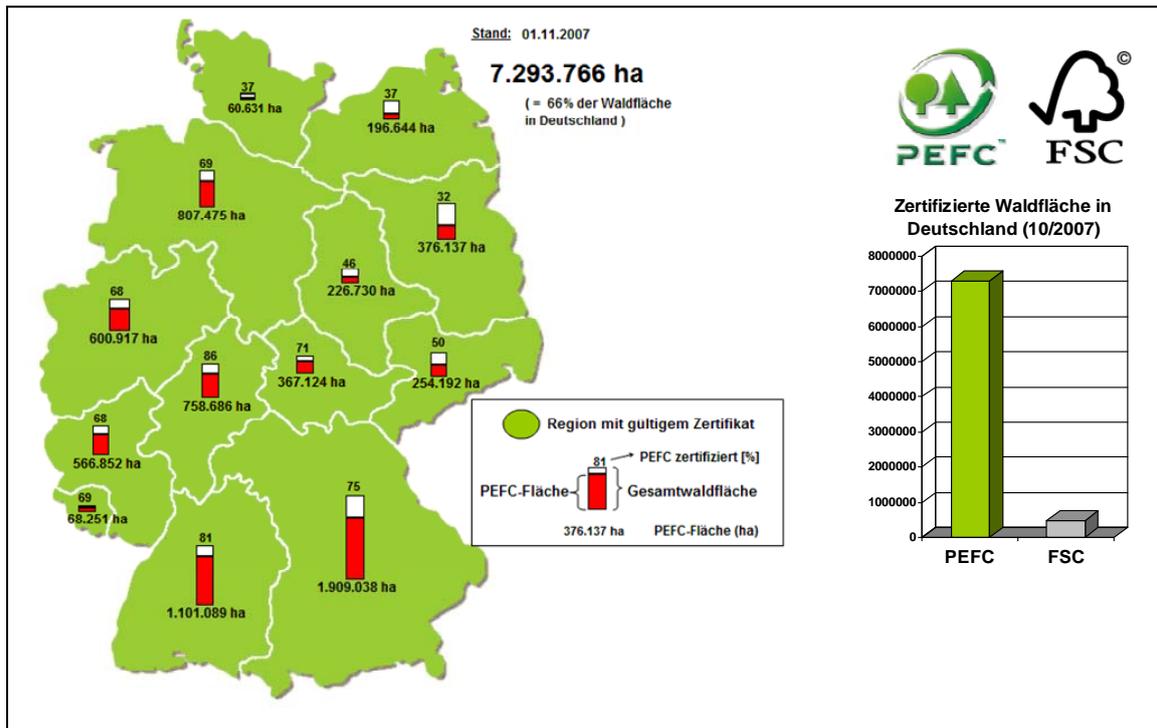


Abb. 1: Zertifizierte Waldfläche in Deutschland, Stand 01.11.2007
Fig. 1: Certified forest area in Germany, valid 01.11.2007

Prinzipien

Regional denken ... lokal handeln

Bezugsebene für die Zertifizierung nach PEFC ist die Region. Die Nachhaltigkeit der Waldbewirtschaftung wird auf regionaler Ebene dokumentiert und kontrolliert, da viele Nachhaltigkeitsweiser, wie z. B. die Biodiversität, auf einzelbetrieblicher Ebene nicht überprüfbar sind.

Das Verfahren der regionalen Zertifizierung wird mit der Bildung einer regionalen Arbeitsgruppe eingeleitet. Auf Initiative der

Waldbesitzervertreter werden alle relevanten Interessengruppen eingeladen, sich an der Arbeit zu beteiligen. Die Arbeitsgruppe hat zwei wesentliche Aufgaben. Zum einen die Erstellung des regionalen Waldberichtes, in dem anhand einer Checkliste von 54 Indikatoren (Tab. 1) die Waldbewirtschaftung in der Region durchleuchtet wird. Dazu gehört die Erarbeitung von Zielformulierungen und Maßnahmen zur Erreichung dieser Ziele für die nächsten fünf Jahre. Zum anderen müssen Verfahren zur Systemstabilität entwickelt werden, um in der konkreten Region

sicherzustellen, dass die Waldbesitzer und die interessierte Öffentlichkeit mit Informationen versorgt werden und wirksame Rückkoppelungsmechanismen ("internes Audit") vorhanden sind.

Tabelle 1: Liste der Indikatoren (Auszug)
Table 1: List of indicators (excerpt)

<ul style="list-style-type: none"> • Gesamtwaldfläche • Waldfläche je Einwohner • Erstaufgeforstete und umgewandelte Fläche • Gesamtvorrat • Vorratsstruktur • Kohlenstoffvorrat ... 53) Freizeit- und Erholungseinrichtungen 54) Anzahl der Waldflächen, denen kulturelle oder spirituelle Werte zugeordnet sind.

Nach Fertigstellung des Waldberichtes überprüft eine unabhängige Zertifizierungsstelle die Konformität mit den Anforderungen des PEFC und vergibt das Zertifikat für die Region.

Ablauf der Zertifizierung

Mit der positiven Begutachtung des regionalen Waldberichts erhalten die Waldbesitzer in der Region die Möglichkeit, an der Zertifizierung nach PEFC teilzunehmen. Notwendig ist dazu die Unterzeichnung einer freiwilligen Selbstverpflichtungserklärung, mit der sich der Waldeigentümer zur Einhaltung der PEFC-Standards verpflichtet. Nach Zahlung einer Gebühr (0,11 €/ha*Jahr und einmalig 11,00 €) erhält der Waldbesitzer die Teilnahmeurkunde, mit der er das Recht erhält, Holz als „aus PEFC-zertifizierter nachhaltiger Waldbewirtschaftung kommend“ zu deklarieren und das PEFC-Logo zu nutzen. Er unterzieht sich ferner stichprobenartigen Vor-Ort-Audits, und er muss mit Sanktionen bei Nichterfüllung der Standards rechnen. Die Erkenntnisse aus den Vor-Ort-Audits werden von der regionalen PEFC-Arbeitsgruppe verarbeitet.

Herkunftssicherung

Zur Sicherung der Herkunft gilt derzeit:

„Es ist Saat- und Pflanzgut mit überprüfbarer Herkunft zu verwenden, soweit es am Markt verfügbar ist.“

- Die Überprüfbarkeit der Herkunft (Identität) wird durch ein fachlich allgemein anerkanntes Verfahren sicher gestellt, das mit dem genetischen Vergleich zwischen Rückstellprobe und Saat- und Pflanzgut arbeitet.
- Die Wildlingswerbung im eigenen Forstbetrieb und die Verwendung eigenen Saatgutes bleiben von dieser Regelung unberührt.

Vor der Änderung am 11. Januar 2006 galt: *Die Überprüfung hat nach einem fachlich allgemein anerkannten, geeigneten Verfahren, z. B. des Zertifizierungsrings für überprüfbare forstliche Herkunft (ZüF¹), zu erfolgen. (siehe www.pefc.de) „Bemerkung: Bisher existieren auf dem Markt zwei anerkannte Verfahren, nämlich ZÜF und FfV/ISOGEN².“*

¹ ZüF (Zertifizierungsring für überprüfbare Forstliche Herkunft Süddeutschland e. V.)

² FfV (Forum für forstliches Vermehrungsgut e. V.)

Neu: Ein allgemein anerkannter Herkunftsnachweis für Saat- und Pflanzgut wird verlangt. Es gibt einen Verweis auf die ZüF-Initiative, jedoch keine Verpflichtung zum Einsatz entsprechenden Pflanzgutes, wenn es lokal nicht verfügbar ist. Weitere geeignete Verfahren zum Herkunftsnachweis können in Zukunft von PEFC anerkannt werden.

Vor-Ort-Audits

Jeder Waldbesitzer, der eine Selbstverpflichtungserklärung unterschrieben hat, wird überprüft (Abb. 2). Es wird die Einhaltung der PEFC-Standards, d. h. der Leitlinie für nachhaltige Waldbewirtschaftung, überprüft, dazu gehört selbstverständlich auch die

Einhaltung aller gesetzlichen Vorgaben (nicht ordnungsgemäß entsorgtes Zaunmaterial – eine beliebte Unregelmäßigkeit).

Unabhängige forstliche Gutachter der von PEFC zugelassenen Zertifizierer, siehe http://www.pefc.de/images/download/broschueren/pefc_coc-broschuere.pdf. Regeln zum Kontrollverfahren finden sich in Anhang IV.

Jährlich werden zufällig Betriebe ausgewählt, wobei die Auswahlwahrscheinlich

mit der Größe steigt. Zertifizierer können zwischen drei Stufen der „Nicht-Einhaltung“ differenzieren:

Verbesserungspotenzial liegt vor, wenn keine Abweichung festgestellt wurde, und hat lediglich eine Aufklärung zur Folge.

Bei festgestellten Neben- und Hauptabweichungen werden Korrekturmaßnahmen vereinbart oder ein Entzugsverfahren eingeleitet.

Vor-Ort-Audits Mit Fachleuten im Gespräch



Wer? Alle teilnehmenden Waldbesitzer

Was? Einhaltung der PEFC-Standards

Durch wen? Gutachter der akkreditierten Zertifizierungsstellen

Wie?

- gemäß Anhang IV der PEFC-Systembeschreibung
- jedes Jahres
- stratifiziert nach Betriebsgrößen
- Zufallsauswahl

Welche Stufen?

- Verbesserungspotenzial
- Nebenabweichung
- Hauptabweichung

Welche Folgen?

- Aufklärung
- Korrekturmaßnahmen mit Fristsetzung (von Stellungnahme bis Re-Audit)
- Aussetzung oder Entzug der Urkunde

Abb. 2: Organisation und Konsequenzen der „Vor-Ort-Audits“

Fig. 2: Organisation and consequences of "local audits"

Situationsanalyse

Mit Verbesserung der wirtschaftlichen Lage und Verringerung der Arbeitslosigkeit nimmt die Sensibilität in der Bevölkerung für das Thema Umwelt und zertifizierte bzw. schonende Waldwirtschaft in Deutschland

wieder zu (Abb. 3). Laut Emnid-Institut würden 92 Prozent der Verbraucher bei gleichem Preis Holzprodukte aus kontrollierten Herkünften vorziehen. Selbst höhere Preise würden noch mehr als 70 Prozent der

Deutschen in Kauf nehmen, um so ihren Beitrag zu Umwelt- und Klimaschutz zu leisten.

Neben der steigenden gesellschaftlichen Bedeutung von Natur- und Ressourcenschutz gibt auch die im Januar in Kraft getretene Beschaffungsrichtlinie für Holz und Holzprodukte Rückenwind. Diese Selbstverpflichtung des Bundes, nur Ware aus legaler, nachhaltiger Waldwirtschaft zu beziehen, zeigt Wirkung. Sie zwingt die Lieferanten, einen Herkunftsnachweis für

Holzprodukte zu erbringen. Hierfür ist das PEFC-Zertifikat voll anerkannt.

In der zur Zeit boomenden Papierbranche kommt dieser Trend schon an: In nur vier Monaten stieg allein die Anzahl der PEFC-zertifizierten Druckereien um 52 Prozent. Auch Bau und Innenausstattung nehmen im Sinne der nachhaltigen Waldwirtschaft langsam Fahrt auf. Hauptgrund hierfür ist vor allem der Druck von Kunden, die großen Wert auf eine nachhaltige Beschaffungspolitik legen.

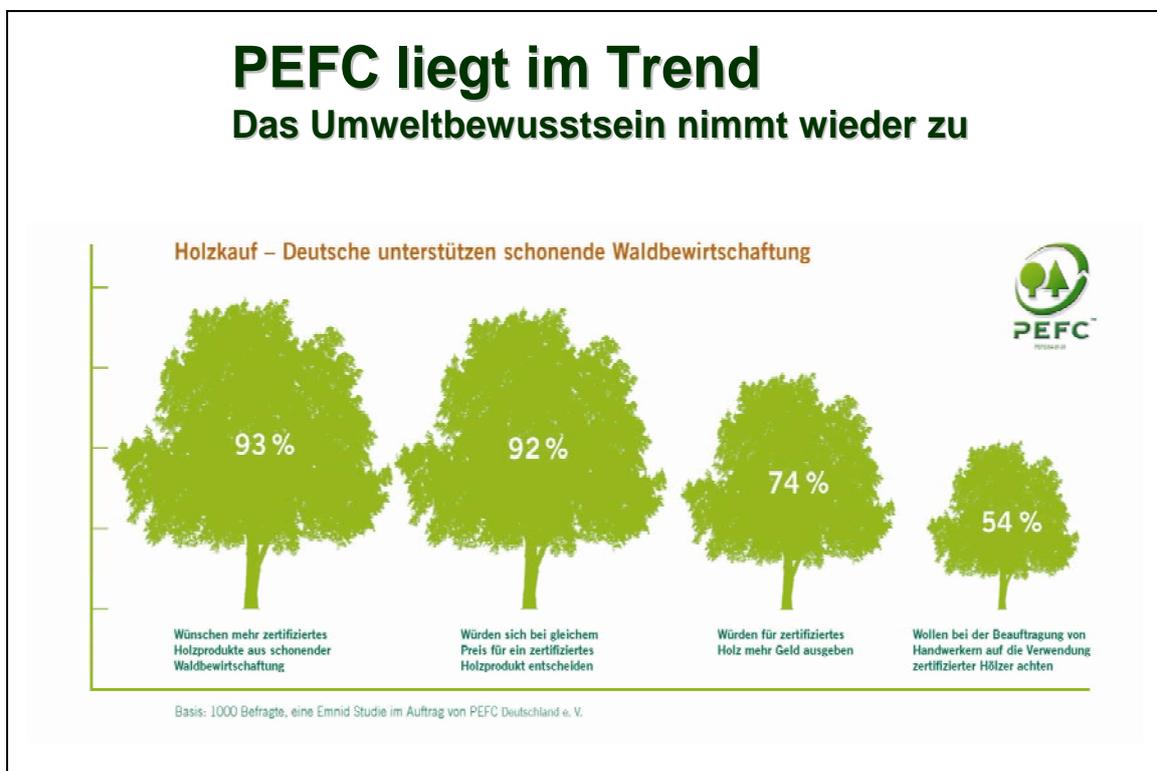


Abb. 3: Unterstützung der nachhaltigen Waldbewirtschaftung durch die öffentliche Meinung
Fig. 3: Support of sustainable forest management by public opinion

Schlusswort

Nachhaltige Waldbewirtschaftung beginnt nicht erst mit der Holzernte sondern schon bei der Saatguternte. Mit der Forderung nach einem Verfahren, das mit Hilfe genetischer Analysen und Referenzproben die Zurückverfolgbarkeit des Pflanzmaterials bis zum Erntebestand ermöglicht, werden zwar die

derzeit gängigen Verfahren von ZüF und FfV unterstützt. Andere Verfahren des Herkunftsnachweises werden jedoch nicht ausgeschlossen, sofern diese als „fachlich allgemein anerkannt“ und ebenfalls als „geeignet“ angesehen werden können.

Die Unabhängigkeit der Zertifizierungsstellen ist bei PEFC durch deren Akkreditierung nach internationalen Standards in besonderem Maße gewährleistet. PEFC bietet den lückenlosen und verbindlichen Nachweis einer nachhaltigen Wirtschaftsweise, auf den sich jeder Verbraucher verlassen kann. PEFC ist bemüht, pragmatisch

und kosteneffizient nachhaltige Waldbewirtschaftung und die Verwendung des umweltfreundlichen Rohstoffes Holz zu fördern. PEFC ist innovativ und fühlt sich dem Prinzip einer kontinuierlichen Verbesserung verpflichtet.

Anschrift des Autors:

DIRK TEEGELBEKKERS
Geschäftsführer PEFC Deutschland e. V.
Danneckerstr. 37, 70182 Stuttgart, Deutschland

Zur Kontrolle und Zertifizierung von forstlichem Vermehrungsgut unter Nutzung von Labormethoden

Monika Konnert und Bernhard Hosius

Zusammenfassung

Bei der künstlichen Waldverjüngung zeigen sich Fehler in der Wahl der Herkunft erst zu spät und lassen sich zumeist nicht mehr beheben. Deshalb muss der Waldbesitzer Sicherheit über die Herkunft des Materials haben, das er in seinen Wald einbringt. Mit der Etablierung der Genmarker bei Waldbäumen eröffneten sich neue Perspektiven zur Überprüfung der Herkunft zusätzlich zu den gesetzlich vorgeschriebenen Kontrollmechanismen. Neue privatrechtlich organisierte Zertifizierungsverfahren schaffen die Voraussetzungen zur Überprüfbarkeit von der Ernte bis zur fertigen Pflanze. Sie basieren im Wesentlichen auf dem genetischen Vergleich von Referenzproben. Dazu bedienen sie sich unterschiedlicher Labormethoden und Vorgehensweisen, die kurz angesprochen werden. Der Weg von den ersten mit Labormethoden bearbeiteten Kontrollfällen bis zu den heutigen Zertifizierungssystemen für Forstsamen und -pflanzen wird aufgezeigt. Es wird erklärt, welche Eigenschaften derzeit mit genetischen Markern und stabilen Isotopen überprüft werden können. Die Systeme sind für Produzenten und Abnehmer von Vorteil, weil sie Vertrauen schaffen und mehr Sicherheit beim Handel mit forstlichem Vermehrungsgut bringen.

Schlagwörter: Zertifizierung, forstliches Vermehrungsgut, FoVG, amtliche Kontrolle

About control and certification of forest reproductive material with the use of laboratory methods

Abstract

In artificial forest regeneration the choice of suitable provenance is essential for the ecological and economical success. Consequences of incorrect provenances arise only late and can be hardly corrected then. Therefore, it is important that forest owners are sure of the provenance of their plant material. The establishment of genetic markers in tree species have resulted in recent possibilities to proof the provenance identity in addition to the control system due to the Law of Forest Reproductive Material. Novel certification processes under private law provide appropriate assumption to verify the way from the harvest to the final forest plant. They are essentially based on reference samples and on the comparison of their genetic composition. For this, different laboratory techniques are applied that are shortly discussed here. The way from the first control case analysed by genetic methods up to the present certification system for forest seeds and plants is displayed. We describe the possibility of the application of genetic markers and stable isotops within the control system. These certification systems are advantageous for producers as well as for consumers, because they provide confidence and more assurance in the trade with forest reproductive material.

Key words: certification, forest reproductive material, FoVG, official control

1. Einführung

Für die Waldverjüngung und den Waldumbau werden Jahr für Jahr standortangepasste, herkunftsgesicherte Forstpflanzen benötigt. Dabei kommt es wesentlich auf die Erbinformation an, denn auf ihr beruht die Anpassung an die derzeitigen Umweltbedingungen des Pflanzortes und die Fähigkeit, auf neue Bedingungen reagieren zu können.

Die wirtschaftlichen Rückschläge, die mit der Verwendung unpassender Herkünfte einhergehen, sind gravierend und seit langem bekannt. Verbringen von Tieflagenherkünften der Fichte in Hochlagen mit gravierenden finanziellen Auswirkungen durch Schnee-, Eis- und Windbrüche, schlechte Stammformen bei Kiefer bei Einbringung von Vermehrungsgut unbekannter Herkunft, die Rückschläge beim Douglasienanbau, bedingt durch die bei uns unpassenden Herkünfte der grauen Douglasie, sind nur einige Beispiele dafür (z. B. BEHM et al. 2002; HAUSRATH 1982). Anhand von Herkunftsversuchen durchgeführte Berechnungen zeigen klar die ökonomischen Vorteile standortangepasster Herkünfte (KLEINSCHMIT 2002).

Fehler in der Wahl der Herkunft zeigen sich erst zu spät und lassen sich zumeist nicht mehr beheben. Deshalb braucht der Waldbesitzer Sicherheit über die Herkunft des Materials, das er in seinen Wald einbringt.

2. Zum Begriff der Herkunft

Als „Herkunft“ wird im Forstvermehrungsgutgesetz (ANONYMUS 2003) der Ort bezeichnet, an dem das Ausgangsmaterial wächst. ROHMEDER & SCHÖNBACH (1959) verwenden in ihrem Standardwerk zur Genetik und Züchtung der Waldbäume den Begriff sowohl im Sinne einer neutralen Ortsangabe als auch als „eine in einem begrenzten Teil des Verbreitungsgebietes der Art vorkommende Population“.

In den weiteren Ausführungen soll der Begriff „Herkunft“ eine wie auch immer geartete Menge von Samen oder Pflanzen bezeichnen, die von einer bestimmten Population abstammt. Sie hat eine bestimmte Ausstattung an Erbanlagen (Genen), ähnlich der Ausstattung der Population, aus der sie kommt. Dies, weil auch im üblichen Sprachgebrauch von „passender Herkunft“ gesprochen wird, wobei nicht der Ort; sondern das Material mit passenden genetischen Merkmalen gemeint wird.

In diesem Sinne ist wohl auch die im FoVG unter Abschnitt 6 beschriebene „Herkunftsicherung“ zu verstehen und unter „Herkunftsüberprüfung“ wird im Allgemeinen nicht die Überprüfung eines Ortes, sondern die Überprüfung der Abstammung von einer bestimmten Population verstanden.

Auch wenn man diese Auslegung des Begriffes, wie HATTEMER & ZIEHE (2004) zeigen, aus Sicht der Wissenschaft durchaus kritisch sehen muss, so hat sie sich in der Praxis des Handels mit forstlichem Vermehrungsgut „eingebürgert“. Man verkauft und kauft heute „Herkünfte“ bestimmter Baumarten, das heißt Samen und Pflanzen, die von einem bestimmten Erntebestand abstammen oder aus einem größeren „Herkunftsgebiet“ kommen. Diese Abstammung wird durch Angaben auf Begleitpapieren bestätigt. Ob diese Angaben richtig sind und ob das Vermehrungsgut tatsächlich aus dem angegebenen Bestand stammt, muss prinzipiell überprüfbar sein, da andernfalls die Begleitdokumente wertlos wären.

3. Möglichkeiten zur Überprüfung der Herkunft bei forstlichem Vermehrungsgut

Der Handel mit forstlichem Vermehrungsgut ist im Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) geregelt. Es enthält Vorschriften zur Auswahl der Erntebestände, zur Durchführung der Ernten, zum Inverkehrbringen von Samen und Pflanzen etc. Ein staatliches System kontrolliert die Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben. Diese Kontrolle basiert im Wesentlichen auf der Überprüfung von Angaben auf Begleitpapieren (Stammzertifikat, Lieferschein) und der Naturalbuchhaltung der Erntebetriebe und Baumschulen. Eine lückenlose Kontrolle erfordert einen sehr hohen zeitlichen und personellen Aufwand. Dazu kommen Unsicherheiten in den Schätzungen der Reinheit des Erntegutes, die in die bei der Ernte ausgestellten Stammzertifikate eingetragen wird. Während der Aufbereitung der Zapfen oder Samen ändern sich diese Charakteristika einer Partie ohnehin noch einmal. Gerichtlich verwertbare Gutachten sind auf dieser Basis nur schwer zu erstellen. Auch sind bis heute die Kontrollsysteme der einzelnen EU-Staaten noch nicht vereinheitlicht, was die internationale Zusammenarbeit erschwert.

Mit der Etablierung von Genmarkern zur serienmäßigen Bestimmung der Erbanlagen bei Waldbaumarten etwa ab 1980 eröffneten sich neue Möglichkeiten zur Kontrolle der Einhaltung des FoVG. Es ist nun z. B. möglich, die Artzugehörigkeit, die Anzahl beernteter Bäume, die Abstammung von bestimmtem Ausgangsmaterial, von Pflanzen aus einer bestimmten Saatgutpartie, die Getrennthaltung von Partien zu überprüfen. Bei den genannten Anwendungsfällen sind zum Teil unterschiedliche Voraussetzungen und Vorgehensweisen notwendig, um sichere Aussagen zu erhalten, letztendlich geht es aber immer um einen Vergleich von Erbanlagen. Unbestritten ist, dass die genetischen Kontrollen, richtig angewandt, die Sicherheit bei der Einhaltung gesetz-

licher Vorschriften deutlich erhöhen und so eine effiziente Ergänzung zu diesen Regelungen sein können. Dies ist im Sinne des Verbraucherschutzes letztendlich ein Vorteil für den Abnehmer von forstlichem Vermehrungsgut.

4. Zur Zertifizierung von forstlichem Vermehrungsgut

4.1 Entwicklung des Zertifizierungsgedankens

Nachdem Isoenzyme als Genmarker etabliert waren, intensivierten sich die Überlegungen zum Einsatz der Methode bei der Kontrolle von forstlichem Vermehrungsgut (z. B. BERGMANN 1975; GREGORIUS et al. 1984; GEBUREK & MUHS 1986; HOSIUS et al. 1996; HERTEL & DEGEN 1998; KONNERT 2006). Etwa ab 1990 wuchs in Deutschland das Interesse der Forstpraxis und der hoheitlich verantwortlichen Stellen, bei der Lösung von Verdachtsfällen beim Vertrieb von Forstsaamen und -pflanzen genetische Untersuchungen zu Hilfe zu nehmen. Dies schlug sich 1993 in einer Verwaltungsvorschrift zum Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut („Prüfung mit biochemisch-genetischen Methoden“) nieder. Eine Zunahme der Anfragen aus der Praxis, vor allem von Kontrollbeamten, war die Folge. So wurden z. B. zwischen 1992 und 1999 ca. 50 Kontrollfälle allein am ASP Teisendorf bearbeitet. Leider war die anfängliche Euphorie schnell verflogen, weil wegen fehlender Referenzproben keine zufriedenstellenden bzw. gerichtlich verwertbaren Ergebnisse erhalten werden konnten. Es zeichnete sich ab, dass für sichere Aussagen geeignetes Vergleichs- oder Referenzmaterial notwendig ist und reproduzierbare Methoden der Genanalyse festgelegt werden müssen (z. B. KONNERT et al. 2005; KONNERT 2006). Aus diesem Grund haben die Landesforstverwaltungen Bayerns und Baden-Württembergs und die Erzeugergemeinschaft für Qualitätsforstpflanzen „Süddeutschland“ e. V. 1998 eine Arbeits-

gemeinschaft zur Entwicklung eines praxisreifen Verfahrens gebildet. Die Arbeiten wurden auch mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Wichtigstes Ziel war es, ein Herkunftssicherungsverfahren zu schaffen, das die lückenlose Überprüfbarkeit von der Ernte, über die einzelnen Produktionsschritte bis zur Auslieferung im Wald leistet. Nach erfolgreichen mehrjährigen Probeläufen mündeten die Bemühungen in einem Produkt-Zertifizierungssystem zur Gewährleistung von Forstpflanzen mit überprüfbarer Herkunft. Die Trägerschaft und Organisation des neuen Herkunftssicherungsverfahrens übernahm im Jahre 2002 ein gemeinnütziger Verein, der „Zertifizierungsring für überprüfbare forstliche Herkunft Süddeutschland e. V.“ (ZüF).

Im Jahr 2006 gründete sich auf Initiative der DKV in Göttingen der Verein „Forum forstliches Vermehrungsgut e. V.“ (FfV) mit demselben Ziel: überprüfbare Dokumentation der Produktionskette von der Ernte bis zur Pflanzung (HAASE et al. 2007). 2006 hat PEFC die Verwendung von Vermehrungsgut mit überprüfbarer Herkunft in seine Zertifizierungsleitlinien aufgenommen.

4.2 Begriffsbestimmungen

Da der Begriff der „Zertifizierung“ bei forstlichem Vermehrungsgut sehr unterschiedlich verwendet wird, sollen zunächst die wichtigsten Termini geklärt werden.

Unter *Zertifizierung* versteht man die Bescheinigung (Zusicherung) einer bestimmten Eigenschaft (eines Zustandes) durch unabhängige Experten z. B. für ein bestimmtes Produkt (*Produktzertifizierung*) oder einen bestimmten Betrieb (*Betriebszertifizierung*). Es gibt natürlich auch die Möglichkeit einer *gemischten Zertifizierung* (Betrieb und Produkt), wenn sowohl eine Bescheinigung der Betriebsführung (Bewirtschaftung) als auch der daraus hervorgehenden Qualität eines bestimmten Produktes (Waldbestand) vorgenommen wird.

Das *Zertifizierungsverfahren* ist der Vorgang, der die Voraussetzungen zur Überprüfung der zu bescheinigenden Eigenschaft erzeugt. Im Rahmen eines Zertifizierungsverfahrens werden Regeln festgelegt und deren Einhaltung überwacht.

Zum Unterschied dazu ist ein *Kontrollfall* nur die Überprüfung eines Sachverhalts für eine bestimmte Partie und hiermit ein einmaliger und in sich abgeschlossener Vorgang.

Ein *Gütesiegel* ist eine einmalige Bescheinigung bestimmter Qualitätsmerkmale ohne periodische, unabhängige Kontrolle (z. B. DKV-Sonderherkünfte). Es ist somit keine Zertifizierung im eigentlichen Sinne.

Marker und Methoden sind Werkzeuge, die ein Zertifizierungssystem zur Kontrolle der zugesicherten Eigenschaft braucht.

4.3 Was soll und kann ein Zertifizierungssystem für forstliches Vermehrungsgut leisten?

Ein Zertifizierungssystem soll Produkte bereitstellen, die die Anforderungen der Kunden und allfällige behördliche Anforderungen (Normen) erfüllen. Es soll zwischen Erzeuger und Abnehmer, durch die Zusicherung bestimmter Eigenschaften, Vertrauen schaffen. Der Erzeuger garantiert eine bestimmte Eigenschaft, die durch einen unabhängigen Zertifizierer bescheinigt wird. Der Abnehmer hat durch diese Bescheinigung die Sicherheit, das Produkt mit der gewünschten Eigenschaft auch tatsächlich zu bekommen. Bei dem Produkt „forstliches Saat- und Pflanzgut“ sind die Erzeuger die Erntefirmen und Baumschulbetriebe, die Abnehmer die Waldbesitzer sowie der Naturschutz und die Landschaftsplaner.

Das Zertifizierungsverfahren muss sicherstellen, dass die gewünschte und bescheinigte Eigenschaft entlang der gesamten Produktionskette kontrolliert werden kann, von der Ernte bis zur Auslieferung der Pflanze.

Damit das System glaubwürdig ist, braucht es klar festgelegte und nachvollziehbare Regeln für alle Schritte, die die Teilnehmer im Verfahren befolgen. Bescheinigt werden sollten nur Eigenschaften, die auch im Rahmen des Systems kontrolliert werden können. Wie HATTEMER & ZIEHE (2004) betont haben, ist das erwünschte Vertrauen nur dann zu erlangen, wenn sich die zugesicherten Eigenschaften eindeutig wiederholbar nachweisen bzw. widerlegen lassen.

Im Falle von forstlichem Vermehrungsgut und den derzeit vorhandenen Zertifizierungssystemen in Deutschland sind dies z. B. die Artzugehörigkeit; die Anzahl der im Stammzertifikat angegebenen Erntebäume, die Abstammung von bestimmtem Ausgangsmaterial; die Anzucht von Pflanzen aus einer bestimmten Saatgutpartie. Die letzten beiden Angaben werden vereinfachend unter dem Begriff der „Herkunfts-kontrolle“ zusammengefasst.

Phänotypische Qualitätsmerkmale, z. B. Wuchsverhalten, Wuchsform, Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten, Frostresistenz können, auch wenn sie genetisch bedingt sind, für Forstsamen und -pflanzen bislang nicht bescheinigt (zertifiziert) werden, da sie am Saat- und Pflanzgut nicht kontrolliert werden können. Dies wird sich ändern, sobald Marker entwickelt werden, die mit der einen oder anderen Eigenschaft im unmittelbaren Zusammenhang stehen (sog. adaptive Marker). Bis dahin wird auch bei zertifiziertem Vermehrungsgut davon ausgegangen, dass die äußere Qualität („passende Herkunft“) durch die gesetzlichen Vorgaben zur Auswahl der Erntebestände sichergestellt wird.

Eine Betriebszertifizierung, z. B. für Erntefirmen oder Baumschulbetriebe erscheint wenig sinnvoll, weil eine vorbildliche Betriebsführung nicht unmittelbar mit den vom Abnehmer erwünschten Eigenschaften von Vermehrungsgut (z. B. Abstammung aus einer bestimmten Partie) in Zusammenhang stehen muss und nicht unmittelbar die

Voraussetzungen zur Überprüfbarkeit der Abstammung (Herkunft) schafft.

4.4 Labormethoden zur Kontrolle der zertifizierten Eigenschaft

Die Überprüfung der „Herkunft“ steht im Mittelpunkt der derzeitigen Zertifizierungssysteme für forstliches Vermehrungsgut. Die Kontrolle beruht bislang auf dem Vergleich der genetischen Zusammensetzung von Referenzproben, die an verschiedenen Stellen des Produktionsprozesses gezogen wurden. Zur Bestimmung der genetischen Strukturen werden sog. Genmarker eingesetzt. Anfangs wurden fast ausschließlich Isoenzyme als biochemisch-genetische Marker untersucht. Zunehmend werden jetzt molekulargenetische Marker der Kern- oder Organellen-DNA eingesetzt, weil sie eine höhere Variabilität haben und sich für Elternschaftsanalysen oft besser eignen. Häufig kann über einen kombinierten Einsatz von Isoenzymen und DNA-Markern ein sicheres Ergebnis bei minimalen Kosten erhalten werden.

In dem vom BMBF geförderten Projekt, dessen Ergebnisse im vorliegenden Band zusammengefasst sind, wurde untersucht, ob sich stabile Isotope zur Herkunftskontrolle eignen und im Zertifizierungssystem „ZüF“ zu einer weiteren Verbesserung der Kontrolle führen können (siehe KONNERT et al. S. 101). Bei der Überprüfung der Saatgutpartien erscheint diese Methode geeignet. Nicht geeignet ist sie für den Vergleich Pflanze vs. Samen, weil das Isotopenmuster des Anzuchtortes durchschlägt.

Merkmale aus der Keimprüfung, wie z. B. Tausendkorngewicht, Hohlkornanteil, Keimfähigkeit können zusätzlich zu anderen Labormethoden Hinweise geben, wie viele Pflanzen einer bestimmten Herkunft und Erntejahr auf dem Pflanzenmarkt vorhanden sein können, reichen aber als alleinige Methode zur Überprüfung der zertifizierten Eigenschaft nicht aus.

Die Quantifizierung der genetischen Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Referenzproben erfolgt durch den genetischen Abstand nach Gregorius (GREGORIUS 1974), welcher ausgehend von den Allelhäufigkeiten berechnet wird. Gleichzeitig werden über statistische Tests (z. B. G-Test, χ^2 -Test) die Werte auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Bei Nichtübereinstimmung (hohe genetische Abstandswerte, statistisch signifikant) kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die beiden Parteien nicht aus einer Grundgesamtheit (Erntepartie) stammen.

Kennt man die genetische Ausstattung der Erntebäume, so kann man über Elternschaftsanalysen die Abstammung von einem Samenelter überprüfen. Findet die Beernung nicht am Einzelbaum, sondern über den Bestand statt (z. B. Netzernte bei Buche, Handsammeln bei Eiche), so ist auf der Grundlage des Ausschlussprinzips die Kenntnis der Genotypen aller Bäume des Erntebestandes und aller weiterer potentieller Pollenspenders außerhalb des Bestandes notwendig. Auch wenn sich die Labormethoden enorm weiterentwickelt haben, sind Kosten und der Aufwand dazu unverhältnismäßig hoch. Lediglich bei kleinen, klar abgegrenzten und isolierten Ernteeinheiten, wie z. B. Samenplantagen, ist diese Vorgehensweise eine Alternative zu den Referenzproben.

4.5 Zwei Zertifizierungssysteme – ein Ziel

Zur Zeit gibt es in Deutschland zwei Zertifizierungslabels für forstliches Vermehrungsgut, nämlich „ZüF“ und „FfV“. Erklärtes Ziel beider Verfahren ist die Verbesserung der Herkunftssicherheit von Forstsamen und -pflanzen, durch die Überprüfbarkeit der gesamten Handelskette, von der Ernte bis zur Auspflanzung im Wald.

Beide Zertifizierungsverfahren ersetzen nicht das FoVG, sondern ergänzen es in freiwilliger und privatrechtlicher Form. Sie sind auf privatwirtschaftlicher Basis

(Verein) organisiert und bemühen sich um Offenheit, Transparenz und geringste mögliche Kosten. Die Vorteile für die teilnehmenden Produzenten und Abnehmer müssen klar überwiegen und in einem sinnvollen Verhältnis zum Aufwand stehen.

Auch wenn es in der konkreten Abwicklung des Zertifizierungsvorgangs und organisatorischen Details durchaus Unterschiede zwischen den beiden Systemen gibt, ist das Grundgerüst das Gleiche und zwar:

- Sicherstellung von Rückstellproben (Referenzproben) ab Ernte
- lückenlose Erfassung und Dokumentation sämtlicher Handlungsabläufe
- genau festgelegte Verfahrensregeln
- stichprobenartige Kontrolluntersuchungen mittels genetischer Marker
- laufende Anpassung an neue wissenschaftliche Erkenntnisse

Dass die eigentlichen Kontrollmechanismen „Referenzprobe, Datenbank und genetische Kontrolle“ sehr effektiv sind, hat sich in der nun über 6jährigen Praxis des ZüF-Systems bereits bei vielen Kontrollfällen eindrucksvoll bestätigt (z. B. HUSSENDÖRFER 2005).

Informationen mit Handlungsanweisungen zu den beiden Systemen finden sich im Internet:

- für ZüF unter www.zuef.net
- für FfV unter www.isogen.de

5. Schlussfolgerung

Laboruntersuchungen mittels Genmarker und stabiler Isotopen haben neue Möglichkeiten zur Herkunftskontrolle bei forstlichem Vermehrungsgut eröffnet. Eingebunden in Zertifizierungsverfahren helfen sie, Produkte mit nachweisbar höherer Herkunftssicherheit bereitzustellen, die sowohl für die Produzenten als auch für die Waldbesitzer interessant sein können. Zum einen

stärken solche „Premiumprodukte“ die Position der Produzenten gegenüber dem reinen Handel mit Forstpflanzen. Zum anderen geben sie den Waldbesitzern eine hohe Sicherheit und schaffen Vertrauen zwischen den Handlungspartnern. Im Zuge der Zertifizierung rückt nach langer Zeit wieder die Frage nach qualitativ hochwertigen

Forstpflanzen in den Vordergrund. Viel zu lange wurden die Kaufentscheidungen der Waldbesitzer durch den Preis und nicht durch die Qualität bestimmt. Endlich wächst das Bewusstsein über die herausragende Bedeutung hochwertiger Forstpflanzen für den waldbaulichen und ökonomischen Erfolg der Forstbetriebe.

Literatur

- ANONYMUS (2003): Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) vom 22.05.2002. BGBl 2002 Teil I Nr. 32, S. 1658.
- BEHM, A.; DIMPFLMEIER, R.; KONNERT, M.; RUETZ, W. (2002): Vom bayerischen Salinenmeister Lohmayer zur genetischen Analyse an Waldbäumen – genetische Nachhaltigkeit gestern und heute. In H. BLEYMÜLLER, E. GUNDERMANN, R. BECK (Hrsg.): 250 Jahre Bayerische Staatsforstverwaltung – Rückblicke, Einblicke, Ausblicke – Band II: 445-461.
- BERGMANN, F. (1975): Herkunfts-Identifizierung von Forstsaatgut auf der Basis von Isoenzym-Genhäufigkeiten. Allg. Forst- u. Jagd.-Ztg. 146: 191-195.
- GEBUREK, TH.; MUHS, H.-J. (1986): Über die Identifikation von forstlichem Vermehrungsgut. AFZ (51): 1309-1312.
- GREGORIUS, H.-R. (1974): Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica* 23: 22-27.
- GREGORIUS, H.-R.; HATTEMER, H.H.; BERGMANN, F. (1984): Über Erreichtes und kaum Erreichbares bei der „Identifikation“ forstlichen Vermehrungsguts. Allg. Forst- u. Jagd.-Ztg. 155: 201-214.
- HAASE, B.; HOSIUS, B.; LEINEMANN, L. (2007): Das FfV-Verfahren stellt sich vor. AFZ/Der Wald (16): 852-853.
- HATTEMER, H.H.; ZIEHE, M. (2004): Probleme der Überwachung des Gesetzes über forstliches Vermehrungsgut. *Berichte Freiburger Forstliche Forschung*, 54: 2-28.
- HAUSRATH, H. (1982): Geschichte des deutschen Waldbaus. Schriftenreihe des Instituts für Forstpolitik und Raumordnung der Universität Freiburg, Hochschulverlag: 416-418.
- HERTEL, H.; DEGEN, B. (1998): Stieleiche von Traubeneiche mit Hilfe von Isoenzymanalysen unterscheiden. AFZ/Der Wald (5): 246-247.
- HOSIUS, B., HENKEL, W., BERGMANN, F., HATTEMER, H.H. (1996): Erkennung von Verstößen gegen das Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut. AFZ/Der Wald (52): 1450-1451.
- HUSSENDÖRFER, E. (2005): ZüF - eine erste Bewertung aus Sicht der Zertifizierungsstelle. AFZ/Der Wald (5): 226- 227.
- KLEINSCHMIT, W. (2002): Herkunftsfrage aus Sicht der Betriebswirtschaft – Wertholz oder Brennholz. In Nordwestdeutscher Forstverein (Hrsg.): Jahrestagung 2002 in Hann. Münden: 28-33.
- KONNERT, M.; HUSSENDÖRFER, E.; FROMM, M. (2005): Referenzproben zur Identitätssicherung von forstlichem Vermehrungsgut. AFZ/Der Wald (5), 21-215.
- KONNERT, M. (2006): Erfolge beim Herkunftsnachweis mittels Isoenzym- und DNA-Analysen. AFZ/Der Wald (8): 430 – 432.
- ROHMEDER und SCHÖNBACH (1959): Genetik und Züchtung der Waldbäume. Verlag Paul Parey, Hamburg u. Berlin: 338 S.

Anschrift der Autoren:

Dr. MONIKA KONNERT
Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht
Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf, Deutschland

Dr. BERNHARD HOSIUS
Firma ISOGEN, Institut für Forstgenetik
Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland

Perspektiven einer verbesserten Herkunftskontrolle: Schlussfolgerungen aus der Forschungsarbeit

Karl Gebhardt

Zusammenfassung

Es werden die Anforderungen, Vorzüge und Beschränkungen genetischer Methoden sowie der Stabilisotopen-Methode zur Kontrolle von forstlichem Vermehrungsgut beschrieben. Um eine Einführung der Stabilisotopen-Methode in die Praxis der Herkunftskontrolle zu erreichen, wird vorgeschlagen, die Sammlung von Dokumenten, die Probenaufarbeitung und -haltung sowie die Auswertung der Analysendaten einer Prüfstelle zu übertragen, die spezialisierten Laboren Vorgaben für die Durchführung der Analysen macht und die Plausibilität der Werte kontrollieren kann. Diese Prüfstelle erarbeitet aus den Ergebnissen einen Prüfbericht für private Zertifizierer oder die amtliche Kontrolle. Da der grenzüberschreitende Verkehr von forstlichem Vermehrungsgut eine bedeutende Größe ist wird die Etablierung eines Netzwerkes von nationalen und europäischen Prüfstellen vorgeschlagen, deren wichtigste Aufgabe es wäre, Referenzproben und Analysendaten standardisierter Methoden verfügbar zu machen.

Schlagwörter: forstliches Vermehrungsgut, Herkunftskontrolle, Zertifizierung, Stabilisotopen, genetische Methoden

Prospects for an improved control of forest reproductive material: Conclusions from the research work

Abstract

The requirements, benefits and limitations of genetic methods and the stable-isotope-method for the control of forest reproductive material are described. In order to introduce the stable-isotope-method in the practice of control of forest reproductive material it is proposed to establish a control lab which collects documents, makes provisions for sample processing and analysis in specialised labs including control of plausibility of the analysed data. In addition this lab will be responsible for the evaluation of analytical data and will elaborate test results for private certifiers or the official control. Since the cross-border movement of forest reproductive material became a significant size the establishment of a network of national and European control labs would be beneficial. This network should provide and maintain reference samples and analytical data of standardised methods.

Key words: forest reproductive material, provenance control, certification, stable isotopes, genetic methods

Genetische Analysen oder Stabilisotope ?

Forstliches Vermehrungsgut wird in seiner Qualität entscheidend durch seine genetischen Eigenschaften und somit vom Erbgut der Samenerntern geprägt. Zusätzlich ergeben sich durch unterschiedliche Wachstums- und Standortbedingungen im Vermehrungsgut biochemische Unterschiede. Bei Pinaceen gut beschrieben und für die Unterscheidung von Herkünften bedingt geeignet sind u. a. die Terpene als Klasse der sekundären Inhaltsstoffe (BARADAT et al. 1992; ARRABAL et al. 2005).

Zu den biochemischen Merkmalen, die sich zur Bestimmung der geografischen Herkunft bei Lebensmitteln (Weinen) als tauglich erwiesen haben, zählen, wie von KLIMMEK (2003) gezeigt, neben den Stabilisotopen auch der Asche-, Zucker- und Säuregehalt, der Gehalt flüchtiger Verbindungen, der Gehalt von Sekundärstoffen und der Gehalt seltener Erden, die mit multivariaten statistischen Verfahren, also nicht einzeln sondern in ihrem Zusammenspiel, bewertet werden. Im Vergleich der einzelnen Parameter lieferte das Stabilisotopenpaar D/H₁ die höchsten F-Werte und damit die beste Erklärung für die Herkunft von Weinen aus Übersee.

Aspekte der Auswahl genetischer Marker für den Herkunftsnachweis wurden von KONNERT (2006) kritisch gewürdigt. Grundsätzlich stehen Isoenzymmarker und DNA-Marker zur Auswahl. Basiert eine Beweisführung auf dem Vergleich von Allelhäufigkeiten in einer fraglichen Probe mit den Allelhäufigkeiten von bekannten Populationen darf nicht außer acht gelassen werden, dass sich die Gene bei jeder Abblüte neu ordnen und zusätzlich auch Drift- und Selektionseffekte, etwa durch Pflanzensortierung, den Vergleich beeinflussen. Die Verfügbarkeit von Referenzproben, die nach den Grundsätzen des ZüF-Verfahrens gewonnen

werden und die Dokumentation aller Schritte des Produktionsprozesses samt der bewegten Saatgut- und Pflanzenmengen sind deshalb eine unabdingbare Voraussetzung für einen Vergleich der Allelhäufigkeiten und die Bewertung genetischer Abstände zwischen Untersuchungseinheiten.

Der Mindestumfang von Referenzproben orientiert sich an den Mengen, für die ein Stammzertifikat erteilt wurde, und an den Nachweisverfahren, die zur Überprüfung der Authentizität eingesetzt werden. GILLET (1999) berechnete an einem Genort mit drei verschiedenen Genotypen für eine qualifizierte Schätzung genotypischer Werte einer Buchenbestandesernte einen Mindeststichprobenumfang von 499 Samen. Stehen hochvariable Marker (z. B. Mikrosatelliten) zur Verfügung, kann sich der Mindeststichprobenumfang in den meisten Fällen reduzieren. Es bleibt aber zu beachten, dass die Wiederholbarkeit der Bestimmung privater und seltener Allele entscheidend vom Stichprobenumfang abhängt.

Um dies zu demonstrieren, wurden aus einer Grundgesamtheit (Z05) mit definierten Allelhäufigkeiten (für 7 Isoenzymgenorte) jeweils fünfmal je 50 und je 200 Individuen mit Zurücklegen gezogen. Im Ergebnis (Tab. 1) zeigte sich, dass bei allen Ziehungen der Anteil der privaten Allele der Grundgesamtheit in den Stichproben nicht mehr nachzuweisen war. Die geringfügiger veränderten übrigen Parameter (Number of observed alleles, N_a ; number of effective alleles, N_e) und die Heterozygotie (H_e) sind in Tabelle 1 kursiv dargestellt.

Nicht zuletzt aufgrund der statistischen Anforderungen von Vergleichen genetischer Häufigkeiten rücken DNA-basierte Abstammungsanalysen (DEGEN 2005) ins Blickfeld.

Tabelle 1: Verlust privater Allele und Änderung (*kursiv*) der Parameter Na, Ne und der Heterozygotie (He) durch zufällige Ziehung von 50 bzw. 200 Individuen aus 470 Bucheckern. Es wurden 7 Isoenzymloci pro Individuum analysiert (IDH, 6-PGDH, AAT, PGM, SKDH, MDH-A, MNR) und die genetischen Parameter mit Hilfe des Programms Gene-Alex Vers. 6 berechnet.

Table 1: Loss of private alleles and change (*in italics*) of the parameters Na and Ne as well as heterozygosity (He), by random drawing of 50 or 200 individuals out of 470 beech nuts. Seven isozyme loci per individual were analysed. Genetic parameter were calculated by use of the programme Gene-Alex Vers. 6.

Population	N	Na (7 Genorte)	Na Freq. ≥ 5%	Ne	Private Allele	He
Gesamtheit Z05	470	2,714	1,857	1,447	0,143	0,274
Ziehung 1	200	<i>2,571</i>	1,857	<i>1,428</i>	<i>0,000</i>	<i>0,268</i>
Ziehung 2	200	<i>2,571</i>	1,714	<i>1,453</i>	<i>0,000</i>	<i>0,272</i>
Ziehung 3	200	<i>2,571</i>	1,857	<i>1,463</i>	<i>0,000</i>	<i>0,276</i>
Ziehung 4	200	<i>2,429</i>	1,857	<i>1,440</i>	<i>0,000</i>	<i>0,275</i>
Ziehung 5	200	<i>2,571</i>	1,857	<i>1,443</i>	<i>0,000</i>	<i>0,276</i>
Ziehung 6	50	<i>2,429</i>	1,857	<i>1,415</i>	<i>0,000</i>	<i>0,262</i>
Ziehung 7	50	<i>2,429</i>	<i>1,571</i>	<i>1,450</i>	<i>0,000</i>	<i>0,267</i>
Ziehung 8	50	<i>2,429</i>	<i>1,714</i>	<i>1,424</i>	<i>0,000</i>	<i>0,252</i>
Ziehung 9	50	<i>2,429</i>	1,857	<i>1,452</i>	<i>0,000</i>	<i>0,281</i>
Ziehung 10	50	<i>2,571</i>	<i>2,000</i>	<i>1,453</i>	<i>0,000</i>	<i>0,282</i>

Sie basieren auf dem Vergleich genetischer Merkmale der potentiellen Eltern mit den Nachkommen. Da sich die genetische Abstammung nie ändert, sind solche Analysen auch dann anzuwenden, wenn Eltern und Nachkommen sich in unterschiedlichen ontogenetischen Phasen befinden. Bei Buche kann die Abstammung einer Saatgutpartie von einem Elternbaum widerlegt werden, wenn sich im Knospengewebe eines fraglichen Elternbaumes andere Allele finden als in den Schalen der Samen, da das Gewebe der Schale wie das Knospengewebe nur die genetische Information des Mutterbaumes enthält.

Soll die Abstammung einer Bestandesernte in dieser Form mit hochvariablen, kernkodierten Markern unzweifelhaft nachgewiesen werden, müssten (fast) alle beteiligten Mütter bekannt und die Genotypen den jeweiligen Beständen zuzuordnen sein. Dies wird in der Regel nur auf Samenplantagen oder in sehr kleinen

Beständen mit vertretbarem Aufwand zu beweisen sein.

Eine frequenzbasierte Zuordnung beliebiger Stichproben kann mithilfe des Programmes GeneClass Version 2.0.h (©INRA/CIRAD 2003) erfolgen (s. WYPUKOL et al. S. 67).

Maternale Marker (cp-DNA-Marker bei Laubbäumen) können insbesondere dann eingesetzt werden, wenn sich bei der Verteilung der Allele großräumige, natürliche oder menschengemachte, regionale Unterschiede, z. B. durch Pflanzung, ergeben. Wenn es sich um benachbarte autochthone Bestände handelt, sind Unterschiede viel weniger zu erwarten.

Während der genetische Nachweis der Authentizität von Einzelbaumernten mit hochvariablen Markern statistisch meistens gut abzusichern ist, muss für die Unterscheidung von Bestandesernten ein erheblich größerer Aufwand betrieben werden. Basie-

ren die Unterschiede zwischen Beständen auf der Existenz seltener und / oder privater Allele wird ggf. ein unverhältnismäßig großer Aufwand erforderlich.

Die Schwierigkeit des Nachweises genetischer Merkmale steigt zudem mit dem Grad der Auskreuzung, bei höherem Ploidiegrad und bei zu berücksichtigender interspezifischer Hybridisierung. Mit der Entwicklung und Erprobung neuer DNA-Marker als auch durch Kombination kerncodierter und extrachromosomaler Marker sind in Zukunft weitere Fortschritte beim Herkunftsnachweis zu erwarten.

Die Analytik von Stabilisotopen kann sich schon heute für Zwecke der Zertifizierung als sehr vorteilhaft erweisen. Zu berücksichtigen sind allerdings gleichfalls die bestehenden Unterschiede zwischen Reifejahren, d. h. es müssen Referenzproben jedes Reifejahres verfügbar sein.

Wie bei genetischen Analysen durch die Anwendung zahlreicher Marker ein Multi-locus-Genotyp definiert werden kann, bietet die Diskriminanzanalyse bei Stabilisotopen die Möglichkeit, die Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Elemente in einem multivariaten Test zu nutzen. Zudem ist es möglich, die Analysenwerte unbekannter Proben mit den Gruppenmerkmalen zu vergleichen, die an Referenzproben erhoben wurden, um dann eine Aussage über die Gruppenzugehörigkeit machen zu können.

Aufwendige Untersuchungen, die durch Kontrollstellen veranlasst werden, machen aber nur dann Sinn, wenn für eine repräsentative Probenahme, die auch bezeugt wurde (Vier-Augenprinzip), garantiert werden kann. Vor Gericht könnte sonst die Richtigkeit der Probenahme angezweifelt werden.

Um die Gruppenmerkmale eines Bestandes zu erfassen, sollten möglichst alle Einzelbaumernten (R2, nach ZüF) untersucht werden. Ist durch einen genetischen

Vergleich der Knospen von Einzelbäumen mit ihren Saatgutproben die Abstammung aus dem bezeichneten Bestand abgesichert, kann eine repräsentative Mischung der R2-Proben für den Vergleich der Stabilisotopen-Muster mit anderen Teilmengen der stammzertifizierten Bestandesmischung (R1-, R3-Proben oder Handelssaatgut) dienen.

Die Merkmale einer gut gemischten Bestandesabsaat waren in den geprüften Fällen (Buche, Erle; siehe GEBHARDT S. 51) schon mit fünf zufällig gezogenen Einzelproben hinreichend beschrieben. Auch bei Überprüfung der R1- und R3-Proben sollte eine mehrfache Ziehung von Einzelproben erfolgen. Jede Einzelprobe sollte möglichst homogen aufgearbeitet sein. Dabei ist zu berücksichtigen, dass großfrüchtige Samen aus sehr unterschiedlichen Geweben bestehen und deshalb eine Abtrennung des zu untersuchenden Gewebes (z. B. Embryo von Samenschale) notwendig ist.

Da sich Anzuchtflächen in Vermehrungsbetrieben im Stabilisotopen-Muster und -Gehalt unterscheiden können, besteht auch die Möglichkeit, die Abstammung von genetisch gleichem Material (Klonen) aus verschiedenen Anzuchten nachzuweisen. Wie in einer Gegenüberstellung der genetischen und der Stabilisotopen-Methodiken zusammengefasst, ist diese Möglichkeit bei Anwendung genetischer Methoden nicht gegeben (Tab. 2).

Stabilisotopen-Analytik kann Teil einer Kette der Zertifizierung werden (Abb. 1), wie sie durch die Zertifizierungssysteme ZüF und FfV beschrieben ist. Sie setzt die Gewinnung von Referenz- oder Kontrollproben nach den systemeigenen Modalitäten und Formalismen voraus. Aufgrund der gesetzlichen Vorgaben muss sowohl für eine Anmeldung und Freigabe der Ernte als auch für die Einrichtung einer Sammelstelle, die Ernteaufsicht und Erntekontrolle (Mindestbaumzahl, Artreinheit etc.) gesorgt sein. Referenz- und amtlich gewonnene Proben (Kontrollproben) können mit den verfü-

Tabelle 2: Methodenvergleich
Table 2: Comparison of methods

	Stabilisotopen-Methode	Genetische Methoden
Beschaffung repräsentativer Saatgutproben	5 x 30= 150 Samen/Partie	Probenumfang hängt von der Menge des Erntegutes ab. Untersucht werden zwischen 100-150 Samen je Partie oder 1 Knospenprobe je Einzelbaum
Dokumentation (Stammzertifikat)	gleicher Aufwand	gleicher Aufwand
Vergleichs-/Rückstellproben	für den Kontrollfall, ja	für den Kontrollfall, ja
Lagerung von Proben	keine Kühlung erforderlich, aber Lufttrocknung	Kühlung/Gefriertrocknung oder Lufttrocknung erforderlich
Aufarbeitung von Proben	Trocknen und Pulverisieren genügt im Regelfall	zusätzlich Extraktion erforderlich
Mindestaufwand	5 Mischproben zur Analyse je Probe	variabel, 10 bis 150
Zeitaufwand für Analysen (ohne Probenvorbereitung)	vergleichsweise gering, da weitestgehend automatisiert	hoch, da vor der Fragmentierung PCR-Reaktionen erforderlich sind
Methodenentwicklung und Methodenanpassung	vergleichsweise wenig aufwendig bzw. abgeschlossen	aufwendig, soweit keine serienmäßig verwendbaren Marker etabliert sind (bei vielen Baumarten aber gegeben)
Anzahl unterscheidbarer Saatgutpartien	sehr hoch schon mit ¹³ C und ¹⁵ N (siehe Beispiel Roterle S. 60)	abhängig von Art und Anzahl untersuchter Loci, meist aber hoch
Überprüfung der Identität bzw. Abstammung von Samen und Pflanzen bzw. Pflanzenteilen	bisher nicht möglich	in vielen Fällen im Ausschlussverfahren sehr gut möglich
Differenzierung der Baumarten und/oder Klone	nur in einigen Fällen (rel. unscharf) möglich	mit art-/klonspezifischen Markern sehr gut möglich
Charakterisierung des Anzuchtortes von vegetativem Vermehrungsgut	unter bestimmten Voraussetzungen möglich	unmöglich

baren Dokumenten und den von den Zertifizierungsstellen geforderten Angaben einer Prüfstelle zugeleitet werden. Eine GPS-gestützte Probennahme, wie sie von HÜLLER & GEBHARDT (s. S. 111) beschrieben wurde, wäre dabei vorteilhaft. Die ersten Stufen der Probenaufarbeitung bis zu einem fein pulverisierten, lagerfähigen, idealerweise gefriergetrockneten Material sollten, ebenso wie die Probenkennzeichnung von dieser Prüfstelle erster Kategorie vorgenommen werden, die sowohl die Probenhaltung als auch den Versand der anonymisierten Proben an ein oder mehrere spezialisierte Labore zweiter Kategorie

übernimmt. Aufgabe der Prüfstelle erster Kategorie wäre es dann, die Ergebnisse der spezialisierten Labore auf „gute Laborpraxis“, Plausibilität und Übereinstimmung zu prüfen und dem Auftraggeber (Zertifizierungsring, amtliche Kontrolle) einen Prüfbericht auszuhändigen, der eine statistische Auswertung der Ergebnisse beinhaltet. Mit der Gefriertrocknung des Probenmaterials bleiben die Optionen genetischer Untersuchungen offen, zudem ist eine Lagerung bei Zimmertemperatur ohne kostenintensive Kühlung möglich. Eine Überprüfung der guten Laborpraxis eines Stabilisotopen-Labors wird möglich, wenn

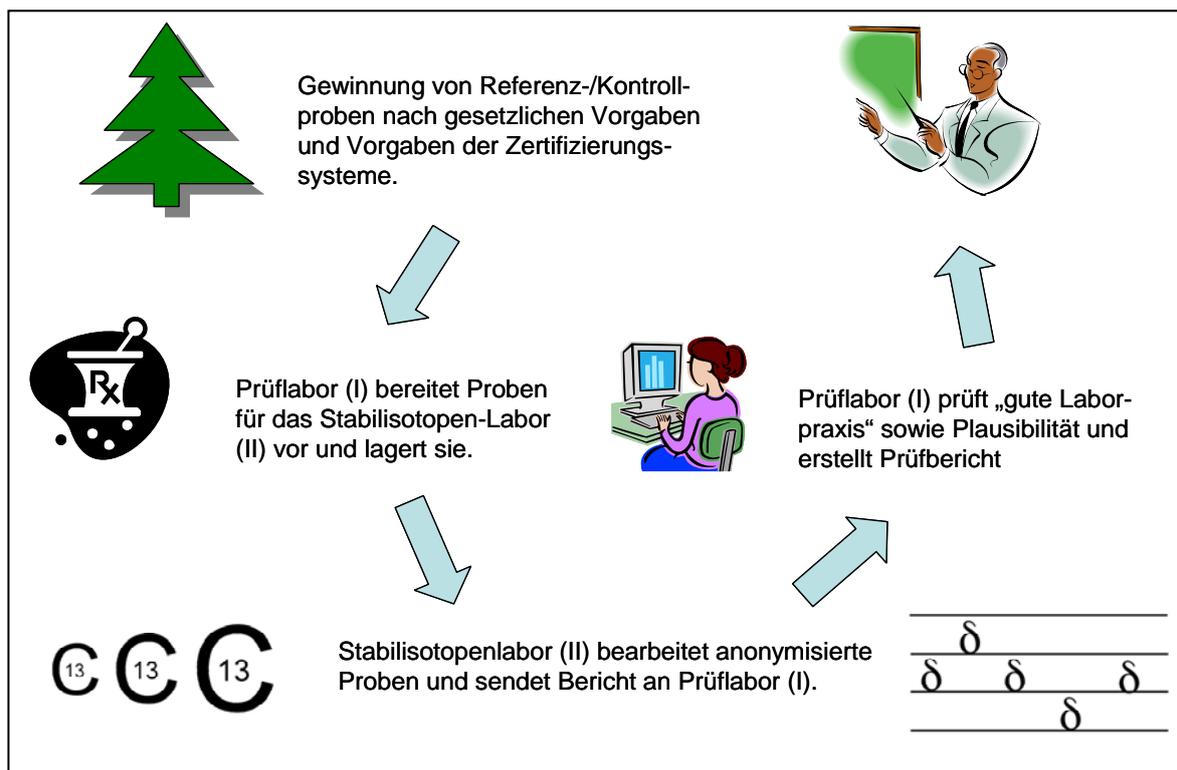


Abb. 1: Einführung der Stabilisotopen-Analytik in die Praxis der Zertifizierung / Kontrolle von forstlichem Vermehrungsgut

Fig. 1: Introduction of the analysis of stable isotopes in the practice of certification / Control of forest reproductive material

Protokolle erstellt werden, die zeitgenaue Analysendaten sowohl von anonymen Proben als auch von mehrfach wiederholten Festsubstanzen bekannter Zusammensetzung (nach jeder 10. Probe Leucin/Acetanilid) samt der analysierten Mengen, der Einwaagegenauigkeit und der angewendeten Rechenwege wiedergeben. Um sich die Option einer Überprüfung durch ein zweites Stabilisotopenlabor offenzuhalten und auch die im Fettkörper gespeicherte Information zu nutzen, sollte *per se* keine Fettextraktion der Proben vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgen. Eine Teilung der Proben in A- und B-Proben ist deshalb nach der Gefriertrocknung und Pulverisierung zu empfehlen.

In Fällen, in denen Gruppenmerkmale der R1- und R3-Proben nicht übereinstimmen oder von den (theoretischen) Mittelwerten der R2 abweichen müsste eine Bestätigung der Ergebnisse durch eine Zweitunter-

suchung veranlasst werden und somit auf eingelagertes Probenmaterial wiederholt zurückgegriffen werden. Gegebenenfalls müssten zusätzliche genetische Untersuchungen veranlasst werden.

Prädestiniert für die Arbeiten der Prüfstelle und damit eines Labors 1. Kategorie sind staatliche Einrichtungen, die für die Integrität und Kontinuität der notwendigen Bearbeitung, Proben- und Datenhaltung, garantieren können. Vorteilhaft wäre die Beherrschung eines großen Instrumentariums an Prüfmethode einschließlich Keimprüfung, genetischer Analysen und Bestimmung botanischer Merkmale (Altersbestimmung etc.). In Zusammenarbeit mit Kontrollbeamten, dem Zoll und der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung sollten Schulungen zur Probenahme und zum besseren Verständnis der Methoden als auch ein Austausch von Informationen, die den grenzüberschreitenden Verkehr betref-

fen, erfolgen. Ein bundesweit agierendes Netzwerk von Institutionen, die mit Herkunftskontrolle bei forstlichem Vermehrungsgut im weiteren Sinne befasst sind, könnte ggf. durch die Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht“ (www.genres.de/fgrdeu/blag/) weiter belebt und gepflegt werden. Zentrales Anliegen des Netzwerkes muss neben dem Austausch von Referenzproben die Standardisierung der anzuwendenden Methoden sein. In die Bemühungen zur Standardisierung der Methoden sollten auch private Zertifizierer eingeschlossen werden.

Sehr vorteilhaft wäre es, Saatgutprüfanstalten und andere mit Herkunftsfragen

befasste Institutionen in anderen europäischen Ländern in das o. g. Netzwerk miteinzubeziehen. Da bei grenzüberschreitendem Verkehr in dem erweiterten sog. „Schengen-Raum“ seit 21.12.2007 Grenzkontrollen üblicherweise wegfallen sind, wäre es wichtig, in Verdachtsfällen auf Referenzproben in diversen Ländern zurückgreifen zu können. Zudem könnte ein Abgleich von Analysendaten mit einer Datenbank von Proben aus diversen Ländern und aus verschiedenen Reifejahren in Verdachtsfällen eingehendere Untersuchungen begründbar machen und Verstöße gegen das FoVG aufdecken helfen.

Literatur

- ARRABAL, C.; CORTIJO, M.; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B.; VALLEJO, M.C.G.; CADAHÍA, E. (2005): Differentiation among five Spanish *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition. *Biochem. Systematics and Ecology* 33:1007-1016.
- BARADAT PH.; MARPEAU, A.; WALTER, J. (1992): Terpene markers. In G. MUELLER-STARCK, M. ZIEHE (eds.): *Genetic variation in European populations of forest trees*. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main, 40-66.
- DEGEN, B. (2007): Möglichkeiten und Grenzen der Herkunftssicherung von forstlichem Vermehrungsgut mit Hilfe von DNA-Markern, Vortrag anlässlich der DKV-Tagung 1.2.2007 in Kassel.
- GILLET, E.M. (1999): Minimum sampling size for sampling genetic marker distributions. In GILLET E.M. (Hrsg.): *Final compendium of the Research Project „Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees“ in the European Union DGXII*. (<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>)
- KLIMMEK, A. (2003): Bestimmung des geografischen Ursprungs von Weinen mittels Multi-komponentenanalyse und multivariater Statistik. Diss. TU Berlin.
- KONNERT, M. (2006): Erfolge (und Grenzen) bei dem Herkunftsnachweis mittels Isoenzym- und DNA-Analysen. In HESSEN-FORST (Hrsg.): *Forstliche Genressourcen als Produktionsfaktor*. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung vom 20. bis 22. Oktober 2005 in Fuldata. Hessen-Forst, Hann. Münden: S. 49-58.

Anschrift des Autors:

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



Ergebnisse des BMBF-Verbundprojektes FKZ 330587 und des
Symposiums »Herkunftskontrolle« vom 07. und 08.02.2008 in Kassel

ISBN 978-3-00-024808-5