

## **Unterscheidung von Saatgutpartien der Winterlinde mittels stabiler Isotopen ( $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ).**

**Karl Gebhardt und Helmut Grotehusmann**

### **Zusammenfassung**

Die Ernte, Abgabe und Vermarktung von Samenpartien der Winterlinde unterliegt in Deutschland dem Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG). Unsicherheiten beim Handel mit forstlichem Vermehrungsgut fordern oftmals eine Überprüfung der Authentizität von Saatgutpartien.

Um die Authentizität mit der Analytik stabiler Isotope überprüfen zu können, wurde Saatgut von drei hessischen Samenplantagen untersucht. Die Ergebnisse zeigten signifikante Differenzen der Verhältniszahlen (Delta-Werte) der Kohlenstoffisotope ( $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ) von Saatgutmischungen der verschiedenen Samenplantagen. Die Unterschiede zwischen den Orten waren auch signifikant, wenn nur je 10 Einzelklonabsaaten jeder Samenplantage verglichen wurden. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei Betrachtung der Delta-Werte der stabilen Isotope des Stickstoffs ( $^{15}\text{N}_2/^{14}\text{N}_2$ ) keine signifikanten Differenzen. Die Delta-Werte des Kohlenstoffs zeigten auch Unterschiede zwischen den Reifejahren 1998 und 2002. Innerhalb einer untersuchten Samenplantage zeigten sich keine Unterschiede zwischen zwei Gruppen von Einzelbaumabsaaten gleicher Klonzugehörigkeit mit hoher oder niedriger Baumnummer im Vergleich zur Samenplantagen-Mischung. Aus den vorliegenden Ergebnissen wird auf eine gute Anwendbarkeit der Analytik stabiler Isotope in Prüffällen geschlossen.

Schlagwörter: Winterlinde, stabile Isotope, Forstvermehrungsgutgesetz, Kontrollmethoden

### **Abstract**

#### **Differentiation of seedlots of lime tree by the analysis of stable isotopes ( $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ).**

The harvest, release and marketing of seedlots of lime trees in Germany undergoes the regulations of law on forest reproductive material. Uncertainties in the trade of forest reproductive material underline the necessity of examinations of the authenticity of seed lots. In order to proof the authenticity of seedlots by means of stable isotopes lime tree seeds from three seed orchards in Hesse was tested. The results exhibited significant differences in the proportions (delta values) of carbon isotopes ( $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ) from seed mixtures of the different seed orchards. The differences between stands were also significant if seedlots from only 10 clones of each seed orchard were compared. In contrast the delta values of nitrogen isotopes ( $^{15}\text{N}_2/^{14}\text{N}_2$ ) exhibited no significant differences. The delta values of carbon isotopes were also significantly different between the seedlots from the ripening seasons 1998 and 2002. Within a seed orchard no differences occurred between the mean values of two groups of ramets with high or low tree number in comparison to the seed mixture. From this results a good applicability of the analysis of stable isotopes in test cases with lime tree seed is concluded.

Key words: lime tree, stable isotopes, law on forest reproductive material, control methods

## Einleitung

Der Vertrieb von Winterlinden-Saatgut unterliegt den Bestimmungen des Forstvermehrungsgutrechtes. 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).

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).

## Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten Absaaten der hessischen Samenplantagen Groß-Gerau, Reinhardshagen und Wehretal, siehe Abb. 1, aus drei Reifejahren. Neben Einzelbaumabsaaten konnten Klonabsaaten und Mischungen der Reifejahre jeder Samenplantage verwendet werden, siehe Tab. 1. Das verwendete Saatgut war kühl (-10°C) und trocken gelagert.

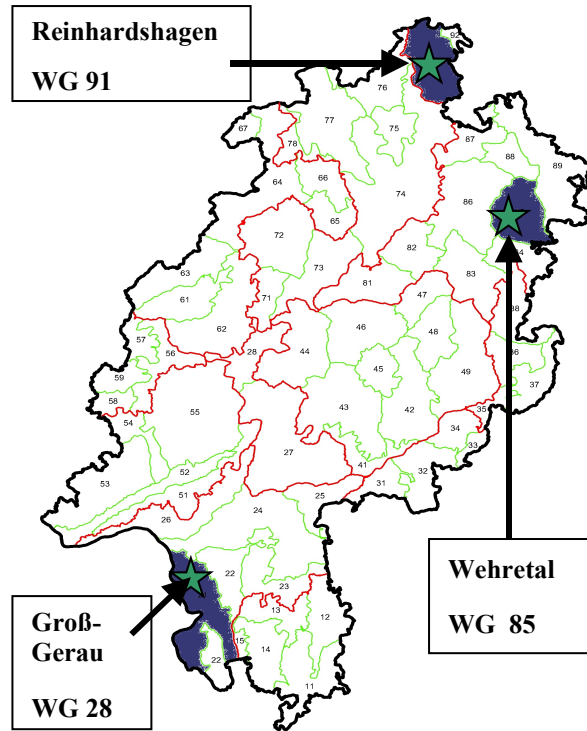


Abb. 1: Lage der 3 Samenplantagen in den Wuchsgebieten Hessens.  
Location of 3 seed orchards within growth areas of Hesse.

Das Tausendkorngewicht betrug 33 g. Die Mischungen der Samenplantagen wurden so erstellt, daß je nach Saatgutertrag (niedrig, mittel, hoch) einer Plantage zwar jeder beerntete Klon repräsentiert, der maximale Beitrag eines Klones jedoch entsprechend begrenzt (3, 5 oder 10 g) war. Aus jeder Samenplantagen-Mischung wurden fünf Stichproben á 1 g (ca. 30 Samenkörner) gezogen und staubfein vermahlen.

Tab. 1: Untersuchungsmaterial von den drei Winterlinden-Samenplantagen  
Sample size of the three lime tree seed orchards

Samenplantage	SPL-Nr.	Anzahl Klone	Untersuchungsmaterial		
			Spl-Mischung/ Reifejahr	Klone	Einzelbäume
Reinhardshagen	55	17	1998	10	-
Wehretal	58	50	1998	10	-
Wehretal	58	53	2002	18	30
Groß-Gerau	59	45	1999	10	-

Von Klon- und Einzelbaumabsaaten wurde ebenfalls jeweils 1g vermahlen. Danach erfolgte die Trocknung der Proben bei 60°C über Nacht. Zur massenspektrometrischen Analyse 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 CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> wurden über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor analysiert, ionisiert und einem Massenspektrometer zugeführt.

Dies führt im Massenspektrometer zu Signalen auf den Massen 44 (<sup>12</sup>C, <sup>16</sup>O, <sup>16</sup>O), 45 (<sup>13</sup>C, <sup>16</sup>O, <sup>16</sup>O) und 46 (<sup>12</sup>C, <sup>16</sup>O, <sup>18</sup>O). Aus den Ratios 45/44 für die Probe und dem Arbeitsstandard (CO<sub>2</sub>-Gas) werden Delta-Werte berechnet, die auf einen internationalen Standard bezogen sind.

Die Deltawerte (DE=δ) in Promille geben somit das Verhältnis des schweren (X=<sup>13</sup>C; X=<sup>15</sup>N) zum leichten (Y=<sup>12</sup>C; Y=<sup>14</sup>N) Isotop in der Probe in Relation zum Verhältnis in einem internationalen Standard (R<sub>reference</sub>) wieder:

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

Für Kohlenstoff (X=<sup>13</sup>C) beträgt der Wert des Referenzmaterials (Vienna-Pee Dee belemnite; PDB) 0,0112372. Für Stickstoff gilt das Isotopenverhältnis von Luft (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N = 0,0036765) als Standard. Zusätzlich wurde der <sup>13</sup>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.

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

## Ergebnisse

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

Es zeigten sich hochsignifikante Unterschiede der Kohlenstoffisotope zwischen den Orten bei Samenplantagen-Mischungen (Abb. 2) und Klonabsaaten (Abb. 3), jedoch keine signifikanten Unterschiede der Stickstoffisotope zwischen den Samenplantagen Groß-Gerau und Wehretal.

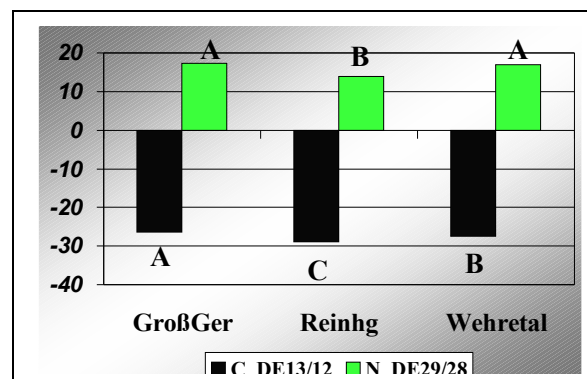


Abb. 2: C/N-Isotopen-Mittel der Saatgut-Mischungen von 3 Samenplantagen

Means of the C/N-isotope values of seed mixtures from 3 orchards.

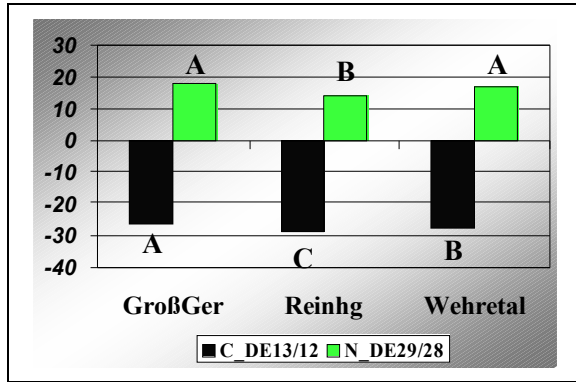


Abb. 3: C/N-Isotopen-Mittel von 10 unterschiedlichen Klonabsaaten aus 3 Samenplantagen (Orten).

Means of the C/N-isotope values of the seed harvest of 10 different clones from 3 orchards/stands.

Wie in Abb. 4 dargestellt, ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede der Kohlenstoffisotope zwischen zwei Reifejahren, jedoch keine signifikanten Unterschiede der Stickstoffisotope auf der einzig untersuchten Samenplantage Wehretal.

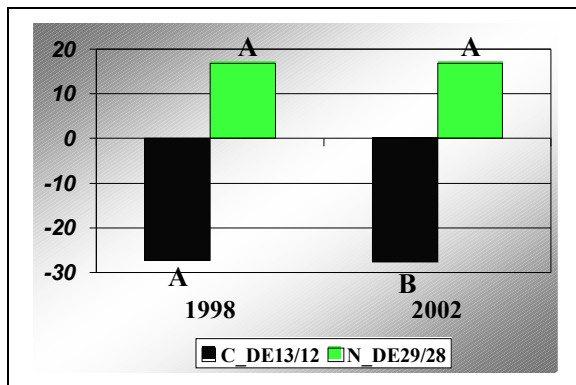


Abb. 4: C/N-Isotopen-Mittel der Saatgut-Mischungen aus zwei Reifejahren der Samenplantage Wehretal.

Means of the C/N-isotope values of seed mixtures from two seasons of the seed orchard „Wehretal“.

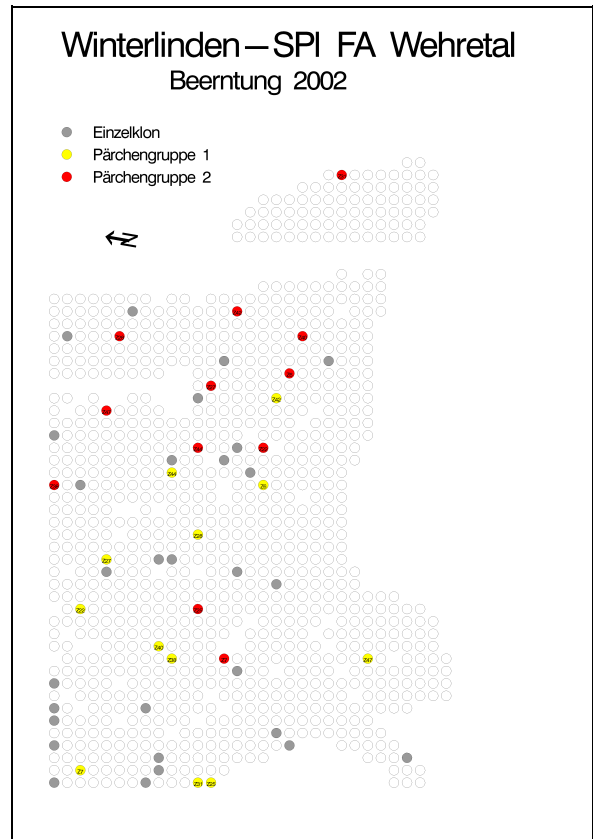


Abb. 5: Standorte der beernteten Einzelbäume (alle Farben) einschließlich der 12 Einzelbaumpaare identischer Klonzugehörigkeit (Pärchengruppen 1 u. 2).

Position of harvested single trees (all colors) inclusively 12 pairs of ramets (group 1, low tree No.; group 2, high tree No.)

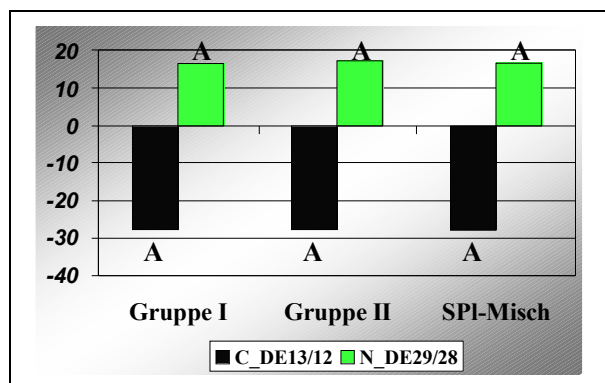


Abb. 6: C/N Isotopen-Mittel der Absaaten von Einzelbäumen gleicher Klonzugehörigkeit aber unterschiedlicher Position innerhalb einer SPI (Abb. 5).

Means of the C/N-isotope values of seedlots of ramets of different position in the seed orchard (Fig. 5)

Um den Einfluss des Standortes innerhalb einer Samenplantage auf die Isotopen-Werte zu überprüfen wurden Einzelbaumabsaaten von Bäumen gleicher Klonzugehörigkeit (Ramets), jedoch unterschiedlicher Baumnummer verglichen. Dazu wurden Pärchen mit niedriger und hoher Baumnummer gebildet und einer Gruppe zugeordnet. Der Standort der beernteten Einzelbäume ist der Abb. 5 zu entnehmen.

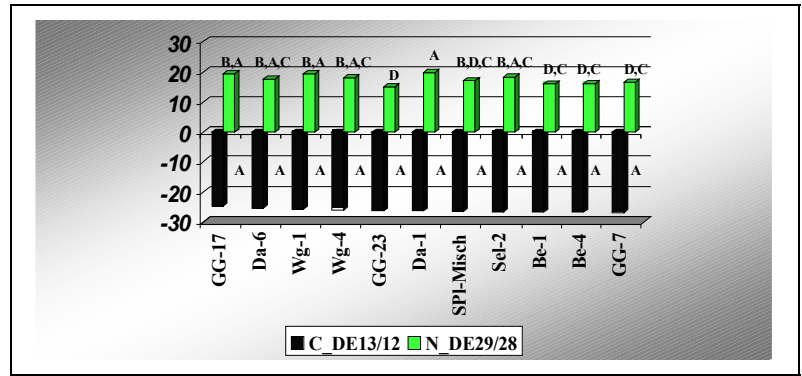


Abb. 7: C/N-Isotopen-Mittel der Einzelklonabsaaten der SPI Groß-Gerau.

Means of the C/N-isotope values of the single clone harvests from seed orchard Groß-Gerau.

Wie in Abb. 6 dargestellt, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen der Einzelbäume identischer Klonzugehörigkeit, jedoch unterschiedlichen Standorts (Ramets in Gruppe 1 und 2) auf der einzig untersuchten SPI Wehretal.

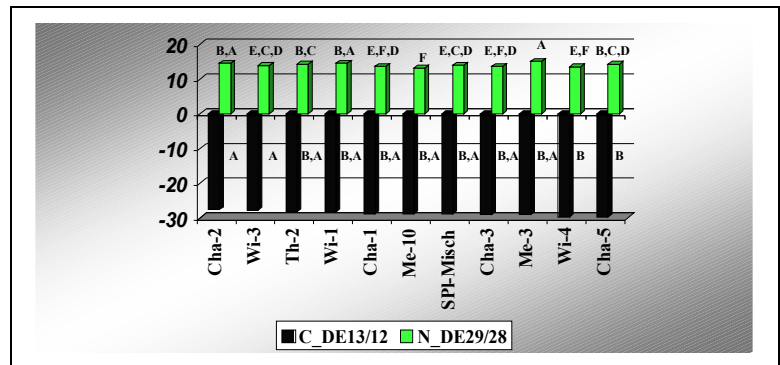


Abb. 8: C/N-Isotopen-Mittel der Einzelklonabsaaten der SPI Reinhardshagen.

Means of the C/N-isotope values of the single clone harvests from seed orchard Reinhardshagen.

Zwischen den Stickstoffisotopenwerten von Klonabsaaten ergaben sich auf allen Samenplantagen gesicherte Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Mischung. Keine signifikanten Unterschiede zeigten die Kohlenstoffisotope der Klonabsaaten der Samenplantage Groß-Gerau, siehe Abb. 7.

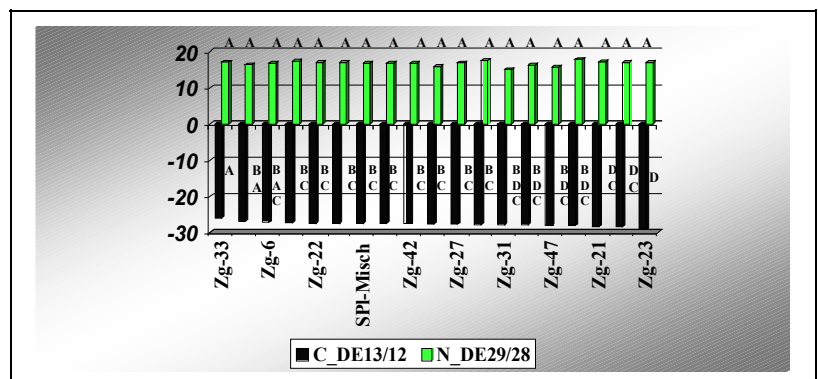


Abb. 9: C/N-Isotopen-Mittel der Einzelklonabsaaten zweier Reifejahrgänge (1998 und 2002) von der SPI Wehretal.

Means of the C/N-isotope values of the single clone harvests of two seasons (1998 and 2002) from seed orchard Reinhardshagen.

Auch auf der Samenplantage Reinhardshagen unterschieden sich bei den Deltawerten der Kohlenstoffisotope nur zwei von zehn Klonabsaaten, jedoch keine von der Samenplantagenmischung, siehe Abb. 8:



Wurden die Deltawerte der Klonabsaaten von zwei Reifejahrgängen zusammen verrechnet, zeigte sich eine Nivellierung der Stickstoffwerte, siehe Abb. 9. Die Deltawerte des Kohlenstoffs unterschieden sich nur in zwei Fällen signifikant vom Mittelwert der Saatgutmischung.

## Zusammenfassende Diskussion

Mit den vorliegenden Daten kann bewiesen werden, dass sich anhand der Deltawerte der Stabilisotopen von Kohlenstoff Saatgut der Winterlinde aus drei hessischen Samenplantagen sicher unterscheiden lässt. Auch die Deltawerte der Stabilisotopen des Stickstoffs zeigen ortsabhängige Unterschiede, die jedoch bei den geprüften Mischungen und Klonabsaaten stärker variierten als die Kohlenstoffwerte. Die Delta-Werte der Kohlenstoffisotope zeigten auch eine geringere Klonabhängigkeit als die der Stickstoffisotope und waren zur Unterscheidung von Reifejahren bei den Erntejahrgängen 1998 und 2002 der Samenplantage Wehretal geeignet.

In der beschriebenen Weise gelang es mit geringen Probenmengen und mit einer kleinen Anzahl von Klonabsaaten (10) Ortsunterschiede gesichert nachzuweisen. Innerhalb der einzig untersuchten Samenplantage Wehretal gab es zwischen Einzelbaumabsaaten gleicher Klonzugehörigkeit aber unterschiedlichen Standortes bei 12 geprüften Fällen keine signifikanten Abweichungen vom Mittelwert der Samenplantagenmischung. An den verschiedenen Orten gab es zwischen den Kohlenstoff-Deltawerten der geprüften Klonabsaaten nur dann in zwei von zehn Fällen gesicherte Unterschiede zum Mittelwert der Saatgutmischung, wenn zwei Reifejahrgänge rechnerisch vereinigt wurden. Der Methodik kann somit auch Robustheit attestiert werden.

Die Anwendbarkeit des Nachweises stabiler Isotopen für Kontrollfälle ist gegeben. Bei Betrachtung der Deltawerte des Kohlenstoffs

muss die Abhängigkeit vom Reifejahrgang berücksichtigt werden. Bei multivariater Betrachtung unter Einbeziehung der Gehalte und Deltawerte mehrerer Stabilisotopen wäre es vermutlich möglich, die Ortsnatur von Saatgutproben noch besser zu differenzieren.

Der Gehalt stabiler Isotope steht in keinem direkten Zusammenhang zu der genetischen Qualität des geernteten Saatgutes. Soll eine Saatgutpartie gewissen Vorgaben hinsichtlich alleler und genotypischer Vielfalt sowie genetischer Differenzierung und Diversität entsprechen, ist die Erntepraxis im Bestand demgemäß anzupassen. Eine Kontrolle der genetischen Qualität muss mit genetischen Methoden (Isoenzym-, DNA-Analytik) erfolgen.

## Danksagung

Die Autoren danken dem Kompetenzzentrum für stabile Isotope der Univ. Göttingen für die Durchführung der Analysen. Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des BMBF unter dem FKZ 0330587A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt liegt beim Autor.

## 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
- FÖRSTEL, H. (2002): Mit isotopem Fingerabdruck den Lebensmitteln auf der Spur. *BioWorld* Heft 1, 26-27
- FÖRSTEL, H. (2003): Kontrolle der Herkunft mittels Stabilisotopen. *BfN-Skripten* 96:82-91
- GESSLER, A.; RENNENBERG, H.; ALDINGER, E.; DOUNAVI, A., 2005: Herkunftsbestimmung mit Hilfe von DNA- und Isotopenanalytik., unveröffentlicht.
- KONNERT, M.; BEHM, A., 1999: Genetische Strukturen einer Saatgutpartie – Einflussfaktoren und -möglichkeiten. *Beitr. Forstw. u. Landschaftsökol.* 4:152-157

**Anschrift der Autoren:**

Dr. Karl Gebhardt,  
Dr. Helmut Grotehusmann  
Nordwestdeutsche Forstl. Versuchsanstalt  
Abt. Waldgenressourcen,  
Prof.-Oelkers-Str. 6  
34346 Hann. Münden