

Erfolge (und Grenzen) bei dem Herkunftsnachweis mittels Isoenzym- und DNA-Analysen

Monika Konnert

Zusammenfassung

Im Rahmen einer standortgemäßen Baumartenwahl entscheidet bei der künstlichen Waldverjüngung die Wahl der richtigen Herkunft über den Erfolg der Maßnahme. Die Verwendung der unpassenden Herkunft kann zu instabilen Beständen und damit zu nicht unerheblichen Verlusten für den Waldbesitzer führen. Das geltende Saatgutrecht bietet eine wichtige Grundlage zur Herkunftssicherung von forstlichem Vermehrungsgut. Eine absolute Identitätssicherung kann es aber nur bei unverhältnismäßig hohem Kontrollaufwand gewährleisten. Die raschen Entwicklungen der letzten beiden Jahrzehnte bei den genetischen Untersuchungen an Waldbaumarten eröffneten neue Kontrollmöglichkeiten.

Derzeitige Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes von Isoenzym- und DNA-Markern zur Herkunftssicherung werden für einige Baumarten, die dem Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) unterliegen (darunter Lärche, Bergahorn, Weißtanne, Vogelkirsche, Hainbuche), angesprochen. Kontrollfälle, die in letzter Zeit am ASP Teisendorf bearbeitet wurden, werden kurz dargestellt. Auch werden Perspektiven zur Weiterentwicklung des Verfahrens bzw. der Kontrollmöglichkeiten angesprochen.

Achievements (and limits) for the application of isozyme and DNA markers for proof of identity

Abstract

When artificial regeneration is performed the selection of the proper provenance is of greatest importance. Forest reproductive material (FRM) of unsuitable provenance leaves the forest owner with high risks and low revenues. The existing legal regulations on FRM moved in trade can, however, only provide for an absolute proof of identity at an unproportionally intense level of controlling. The rapid development in the field of genetic investigations on forest tree species during the last two decades opened new control possibilities.

The paper presents possibilities and limits for the application of isozyme and DNA markers for proof of identity in case of species governed by the German Law on FRM. This is exemplified by recent control cases. Perspectives for further development of the procedure in this field are also presented.

Einführung

Im Rahmen einer standortgemäßen Baumartenwahl entscheidet bei der künstlichen Waldverjüngung die Wahl der richtigen Herkunft über den Erfolg der Maßnahme. Die Verwendung unpassender Herkunft kann zu instabilen Beständen und damit zu nicht unerheblichen Verlusten für den Waldbesitzer führen. Das geltende Saatgut-

recht bietet eine wichtige Grundlage zur Herkunftssicherung von forstlichem Vermehrungsgut. Eine absolute Identitätssicherung kann es aber nur bei unverhältnismäßig hohem Kontrollaufwand und damit verbundenen sehr hohen Kosten gewährleisten. Neue Wege und Möglichkeiten für die Herkunftsüberprüfung wurden durch die serienmäßige Bestimmung der Erbanlagen bei Waldbäumen mittels Genmarkern möglich.

Erste Kontrolluntersuchungen mittels Isoenzymanalysen

Nachdem Isoenzymanalysen als Genmarker für immer mehr Baumarten etabliert waren, wurden zunehmend Kontrollfälle im Rahmen des Vertriebs von forstlichem Vermehrungsgut nach dem Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut (FSaatG) an genetische Labore herangetragen. Die Möglichkeiten und Grenzen der Methode wurden in mehreren Veröffentlichungen erörtert (z. B. BERGMANN 1975, GREGORIUS et al. 1984, GEBUREK u. MUHS 1986, HERTEL u. DEGEN 1998). In einer Verwaltungsvorschrift zum FSaatG (ANONYMUS 1993) wurden Prüfmöglichkeiten, allerdings in sehr allgemeiner Form, festgelegt. Dazu gehörten u. a. die Prüfung der Zugehörigkeit zu großräumigen Ursprungsgebieten (nicht zu Herkunftsgebieten), die Prüfung der Abstammung aus einem bestimmten Bestand oder aus einer bestimmten Saatgutpartie bei generativem und vegetativem Vermehrungsgut sowie die Prüfung der Getrennthaltung von Samen- oder Pflanzenpartien.

So sollte z. B. in einer Untersuchung der Firma Isogen (HOSIUS et al. 1996) die Herkunft einer Weißtannenkultur aus Thüringen überprüft werden. Die Kultur war fast vollständig ausgefallen. Laut Begleitpapieren sollte das Pflanzmaterial aus den ostbayerischen Mittelgebirgen stammen. Der Erntebestand war nicht bekannt, auch andere Proben für einen unmittelbaren Vergleich (z. B. Pflanzen aus derselben Lieferung) lagen nicht vor. Die Beweisführung basierte deshalb auf dem Vergleich der Allelhäufigkeiten in der fraglichen Kultur mit den mittleren Häufigkeiten von Populationen aus mehreren europäischen Regionen, die zum Zeitpunkt der Analyse bereits vorlagen. Man kam zu dem Schluss, dass der Ursprung des Pflanzgutes im Schwarzwald und nicht in Ostbayern liegt. Allerdings wurde auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass der Erntebestand tatsächlich im Bayerischen Wald steht, aber dort mit Saatgut aus dem südwestlichen Tannenareal begründet worden war. In diesem Fall wäre die Lieferung

keine Falschdeklaration und somit kein Verstoß gegen das FSaatG gewesen. Bei dieser Beweisführung wurde außer Acht gelassen, dass die genetische Zusammensetzung der Kultur zum Zeitpunkt der Probenahme auch durch Selektions- oder Drifteffekte stark beeinflusst gewesen sein kann.

Zwischen 1992 und 1999 wurden an das ASP Teisendorf ca. 50 Kontrollfälle herangetragen. Meist waren es Forstämter, die Zweifel an der Herkunft des angekauften Pflanzmaterials hatten. Die genetischen Untersuchungen führten in den meisten Fällen nur zu Wahrscheinlichkeitsaussagen (Verdachterhärtung), da bis auf wenige Ausnahmen kein geeignetes Vergleichs- (Referenz)material zur Verfügung stand. Für die Praxis war dies nicht befriedigend, für erfolgreiche rechtliche Schritte war es unzureichend. Da es bei der Samenbildung zur Neuordnung der Erbanlagen kommt und diese Neuordnung von zahlreichen, ständig wechselnden Faktoren beeinflusst wird (z.B. Paarungssystem, Blüh- und Befruchtungsverhältnisse, Bestandesdichte und -zusammensetzung, Witterungsbedingungen etc.), ist die genetische Struktur der Samenpopulation desselben Bestandes von Jahr zu Jahr unterschiedlich und kann sich auch von der des Erntebestandes stark unterscheiden. Dies haben Untersuchungen an verschiedenen Baumarten deutlich gezeigt (MÜLLER-STARCK 1985, GREGORIUS et al. 1986, KONNERT u. BEHM 1999). Ein Vergleich der genetischen Struktur einer Saatgutpartie mit der genetischen Struktur des potentiellen Erntebestandes, mit der Naturverjüngung aus dem potentiellen Erntebestand oder mit Pflanzen aus einer weiteren Ernte in diesem Bestand kann daher nicht als Identitätsnachweis dienen. Die unbefriedigenden Wahrscheinlichkeitsaussagen der Untersuchungen führten zunehmend dazu, dass die Zahl der durchgeführten Prüfungen mit biochemisch-genetischen Methoden zur Kontrolle beim Vertrieb nach dem Forstsaatgutgesetz (heute FoVG) stark zurückging und dass in einem Schreiben des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten von 1998 vermerkt wurde: „Das Fehlen passen-

der Vergleichsproben führt dazu, dass die Ergebnisse der Prüffälle für die Praxis unbefriedigend sind. Es ist unumgänglich, geeignete Referenzproben ab dem Zeitpunkt der Ernte sicherzustellen, wenn die biochemisch-genetischen Untersuchungen als Kontrollinstrument weiter genutzt werden sollen“.

Referenzproben zur Herkunftssicherung

In der Folge ist ein auf Referenzproben basierendes System zur Herkunftssicherung entwickelt und in die Praxis umgesetzt worden. Vor allem in Süddeutschland werden nach genau festgelegten Regeln an verschiedenen Stellen des Produktionsprozesses repräsentative Stichproben gezogen und langfristig eingelagert. Sie dienen sowohl der Bestimmung der maximal möglichen Anzahl von Pflanzen je Erntepartie und Erntejahr als auch dem genetischen Vergleich mit den später daraus angezogenen Pflanzen. Alle Verfahrensschritte und die dabei bewegten Mengen an Saat- und Pflanzgut werden in einer Internetdatenbank genau dokumentiert. Änderungen in dieser Datenbank können nur im Einvernehmen mit einem neutralen Zertifizierer vorgenommen werden. Das Ergebnis ist ein privatrechtlich geregeltes Produktionsverfahren, das die Herkunftssicherheit bei Forstpflanzen entscheidend verbessert (KONNERT u. HUSSENDÖRFER 2002, KONNERT et al. 2002, KONNERT and BEHM 2005). Im folgenden werden Kontrollfälle vorgestellt, bei denen Referenzproben vorlagen. Die realen Verschlussnummern und Identitätsnummern aus dem ZüF-System (ID-Nummern) wurden durch fiktive Zahlen ersetzt.

Überprüfung der Identität von Lärchenpflanzen für die Schutzwaldsanierung

Die Firma X hatte für die Schutzwaldsanierung in den Bayerischen Alpen Lärchen (Hochlagenherkunft) in Lohnanzucht angezogen. Von dem Saatgut war bei der Ernte und nach der Aufbereitung eine Referenzprobe zurückgelegt worden. Von den zu-

rückgelieferten Pflanzen wurden Knospenproben entnommen. Für die Embryonen von 150 Samen und für 150 Pflanzen wurden die genetischen Strukturen an 13 Isoenzym-Genorten bestimmt und verglichen. Die hohen mittleren genetischen Abstände sowie extrem hohe Abstände an einzelnen Genorten (vgl. Tab.1) zeigten, dass sich Pflanzen und Samen in ihren genetischen Strukturen deutlich unterscheiden.

Tab. 1: Genetischer Abstand zwischen Samen- und Pflanzenpartie der Lärche. Signifikanzniveau $\alpha=0,01$ (**), $\alpha=0,001$ (***)
Genetic distance between seed and seedlings from larch. Level of significance $\alpha=0,01$ (**), $\alpha=0,001$ (***)

Genort	Genetischer Abstand	
	Allele	Genotypen
FEST-B	8,9***	21,7***
6PGDH-B	20,8***	36,8***
MDH-A	8,9***	16,9***
PGM-A	57,7***	66,9***
SDH-B	37,4***	57,6***
Genpool	11,3**	17,4**

Zur Lohnanzucht waren 600 g Saatgut an die Firma X geschickt worden. Die vorab im Labor bestimmte Keimfähigkeit betrug 15 %, die maximale Anzahl lebender Keime pro kg ca. 20.000. Für 600 g Saatgut bedeutete dies maximal 12.000 lebende Keime. Rückgeliefert wurden 8.000 verschulte (1+1) Pflanzen. Da eine optimale Keimung wie bei der Saatgutprüfung im Pflanzgarten kaum möglich ist und auch beim Verschulen Pflanzen ausfallen, bedeutet dies eine extrem hohe Pflanzenausbeute. Selektion kann somit nicht ursächlich für die großen genetischen Unterschiede zwischen Samen und Pflanzen sein, sondern es muss davon ausgegangen werden, dass die untersuchte Pflanzenpartie nicht oder nicht ausschließlich aus der zur Lohnanzucht geschickten Saatgutpartie stammt.

Überprüfung der Identität von Pflanzenpartien im Rahmen des Zertifizierungssystems „ZüF“

Bei der Auslieferung von Pflanzen an das Forstamt X wurden von ca. 150 Buchenpflanzen Knospenproben entnommen und in einer versiegelten Proben tasche mit Verschlussnummer 01605588/04 an den Dienstleister geschickt. Auf Veranlassung des Zertifizierers wurde die genetische Zusammensetzung dieser Pflanzenpartie mit der genetischen Struktur der bei der Ernte gezogenen Referenzprobe R1 verglichen, die unter der ID-Nummer 12345678000012 eingelagert war. Aus der Ernte mit dieser ID-Nummer sollten die gelieferten Pflanzen stammen. Durch Isoenzymuntersuchungen an 12 Genorten wurde der mittlere genetische Abstand mit 2,7 % für Allele und 5,8 % für Genotypen berechnet. Weder an einzelnen Genorten noch im Mittel unterschieden sich Samenprobe und Pflanzenprobe in ihrer Allelzusammensetzung statistisch signifikant. Das Ergebnis der Identitätsprüfung im Sinne des ZüF-Verfahrens war somit für diese Pflanzenpartie positiv.

Zu einem anderen Ergebnis führte der Vergleich zwischen einer Bergahornpflanzenpartie und den entsprechenden Samen-Referenzproben R1 (gezogen bei der Ernte) und R3 (gezogen nach der Reinigung des Saatgutes). Hohe genetische Abstände zwischen Samen- und Pflanzenpartien und hochsignifikante Unterschiede in den Allelverteilungen führten zu dem Schluss, dass die Pflanzenprobe nicht aus der angegebenen Erntepartie stammen konnte. Auf diesen Fall wird unter Punkt 4 noch näher eingegangen.

Genetischer Vergleich von Pflanzenpartien, die aus derselben Saatgutpartie stammen sollen

Aufgrund der genauen Dokumentation in der Internetdatenbank im Rahmen des ZüF-Systems sind die Bewegungen an Saat- und Pflanzgut aus einer Ernte (einer ID-Nummer) genauestens nachvollziehbar. Zur Kontrolle kann somit auch ein genetischer Vergleich von Pflanzenpartien angestellt werden, die von unterschiedlichen Firmen an unterschiedliche Abnehmer geliefert wurden, aber alle aus derselben Erntepartie stammen sollen (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Im Rahmen eines Kontrollfalls verglichene Pflanzenpartien der Traubeneiche *Quercus petraea* seedling populations compared for control of identity

Pflanzenpartie Verschlußnr.	Baumart	Lieferant	Abnehmer	ID-Nummer Saatgutpartie
123456	TrEi	Firma A	Forstamt X	22222333334444
111222	TrEi	Firma B	Forstamt Y	22222333334444
233678	TrEi	Firma C	Forstamt Z	22222333334444

Von jeder Pflanzenpartie wurden ca. 120 Individuen an 10 Isoenzym-Genorten untersucht. Die genetischen Unterschiede waren gering und lagen im Zufallsbereich. Die mittleren genetischen Abstandswerte waren mit ca. 3 % bei Allelen und 6,5 % bei

Genotypen gering. Die Gesamtdifferenzierung der drei Populationen betrug nur 2,7 %. Auch die genetische Variation innerhalb der drei Populationen war sehr ähnlich (vgl. Tab. 3).

Tab. 3: Genetische Variation innerhalb der drei untersuchten Traubeneichenpartien
Genetic variation within the three examined seedling populations of *Quercus petraea*

Pflanzenpartie Verschlußnr.	Vielfalt (A/L)	Diversität v_{gam}	Diversität n_e n_e	Heterozygotie (%)	ID-Nummer
123456	3,5	29,5	1,37	28,0	22222333334444
111222	3,5	30,2	1,37	27,5	22222333334444
233678	3,5	29,7	1,36	28,0	22222333334444

Einsatz von DNA-Markern bei der Kontrolle von forstlichem Vermehrungsgut

Zum genetischen Vergleich der Referenzproben wurden bisher vor allem Isoenzym-Genmarker verwendet. Die teilweise nur geringe isoenzymatische Variation (z. B. bei Esche, Tanne, Vogelkirsche, Spitzahorn), Schwierigkeiten bei der langfristigen Lagerung des Probenmaterials (z. B. bei Eiche, Esche), Schwierigkeiten bei der Enzymextraktion aus bestimmten Gewebearten (z. B. bei Eiche, Esche, Hainbuche), Polyploidie (z. B. bei Bergahorn) bereiten Probleme bei der Isoenzymanalyse mancher Baumarten. Inzwischen können mit vertretbarem Kostenaufwand DNA-Polymorphismen bei Waldbäumen sichtbar gemacht und so die genetischen Unterschiede in einem weitaus größeren Umfang nachgewiesen werden, als dies nur mit Isoenzymanalysen möglich ist. Von den molekularen Genmarkern bieten sich für eine Identitätsüberprüfung im Rahmen der Herkunftssicherung von forstlichem Vermehrungsgut besonders Kern- und Chloroplasten-Mikrosatelliten an. Entsprechende Primer sind bereits für zahlreiche Baumarten entwickelt, wie z. B. für Eiche (STEINKELLNER et al. 1997, DEGUILLOUX et al. 2003), Esche (LEFORT et al. 1999), Vogelkirsche (SCHUELER et al. 2003), Bergahorn (PANDEY et al. 2004), Tanne (ZIEGENHAGEN et al. 1998, VENDRAMIN et al. 1999), Kiefernarten (KOSTIA et al. 1995, VENDRAMIN et al. 1996), Fichte (PFEIFFER et al. 1997). Hypervariable Marker wie AFLP's sind nur bedingt für die Unterscheidung von Her-

künften geeignet, da jedes Individuum ein eigenes Variationsmuster besitzt und daher zwar zwischen einzelnen Individuen, aber nicht notwendigerweise zwischen Kollektiven unterschieden werden kann. PCR-RFLP haben meist eine zu geringe Variation und sind deshalb nur bedingt zur Herkunftssicherung geeignet (GILLET 2000, ZIEGENHAGEN pers. Mitteilung).

Herkunftskontrolle bei Bergahorn durch die Analyse von Mikrosatelliten der cpDNA und Kern-DNA

Unter Punkt 3.2 wurde von einer Bergahornüberprüfung berichtet, wo mittels Isoenzymanalysen zwischen Saat- und Pflanzgut große genetische Unterschiede festgestellt worden sind. Die Saatgutpartie stammte laut Eintragungen in der Datenbank aus einer Plantagenernte. Die beernteten Klone und Ramets waren bei der Ernte markiert worden. Die genetische Struktur aller Plantagenklone an sieben nuklearen Mikrosatelliten-Genorten und der Haplotyp an sechs cpDNA-Mikrosatelliten-Genorten war aus vorherigen Untersuchungen bekannt. Ebenso war bereits bekannt (KONNERT 2004), dass der Chloroplastenprimer „ccmp10“ bei Bergahorn eine regionale Zuordnung erlaubt. In Vorkommen aus Südbayern (bis in den Bereich des Inntals) dominiert die Variante 105, in allen anderen Regionen Bayerns findet sich nur die Variante 102 (vgl. Abb. 1). Die Variante 105 findet sich auch in der beernteten Plantage bei Klonen aus den Südbayerischen Alpen und wurde auch bei einigen Pflanzen der fraglichen Partie gefunden.

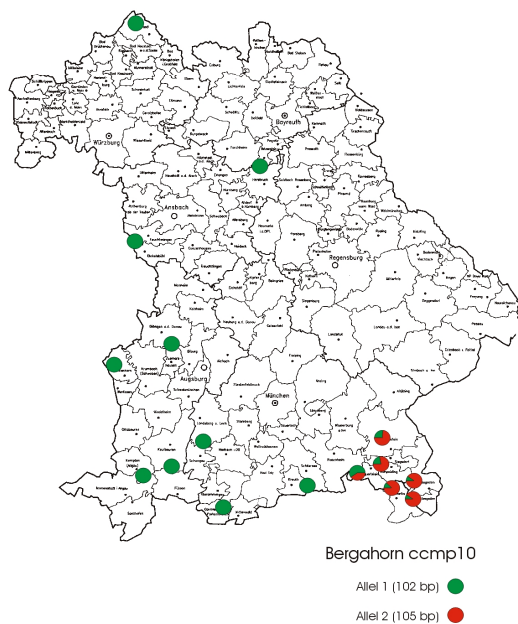


Abb.1: Verteilung der Längenvarianten der ccmp10 cpDNA-Mikrosatelliten bei Bergahornpopulationen in Bayern

Fig. 1: Distribution of alleles at cp-DNA-microsatellite-locus ccmp10 in populations of *Acer pseudoplatanus* from Bavaria

Aus der Kern-DNA wurden sieben Genabschnitte mit den Primern MAP2, MAP9, MAP10, MAP12, MAP33, MAP40 und MAP46 (PANDEY et al. 2004) sowohl bei den beernteten Bäumen als auch bei Pflanzen der fraglichen Partie untersucht.

Für die Zuordnung von Pflanzen zu Altbäumen (potentielle Mutterbäume = Erntebäume) gibt es, unter der Berücksichtigung der Tetraploidie und Autopolyploidie des Bergahorns, grundsätzlich zwei Ausgangssituationen:

1. An einem Genabschnitt A trägt der Samen gleiche Ausprägungen A1/A1/A1/A1 (er ist homozygot) – d.h. die Mutter muss das Allel A1 tragen, möglicherweise in Kombination mit anderen Varianten.
2. An einem Genabschnitt A trägt der Samen verschiedene Ausprägungen A1/A1/A2/A2 (er ist heterozygot) – d.h. die Mutter muss das Allel A1 oder A2 tragen, möglicherweise in Kombination mit anderen Varianten.

Die jeweils nicht vom Mutterbaum stammenden Allele müssen über den Vaterbaum (Pollen) vererbt worden sein. Am Analyseergebnis selbst ist nicht zu erkennen, welcher Teil der mütterliche bzw. väterliche ist.

Die Zuordnung ist nur im Vergleich der potentiellen Eltern mit den Nachkommen möglich.

Auf diese Weise ist es gelungen eindeutig nachzuweisen, dass einige der Pflanzen aus der Partie nicht von den 25 im Jahr xxxx beernteten Bäumen stammen können. Eine Pflanze z. B. war homozygot auf dem Allel „172“ bei Primer MAP33. Dieses Allel trug keiner der beernteten Bäume. Die Pflanze muss aber von einem Baum stammen, der das Allel „172“ trägt. Demnach kann sie nicht aus der Plantagenernte stammen. Das Allel „172“ wurde auch nicht in den Saatgutproben R1 und R3 gefunden.

Drei weitere Pflanzen waren am Genort MAP33 homozygot auf dem Allel „152“. Dieses Allel trugen drei beerntete Bäume. Aufgrund der Mehrlocus-Genotypen (Strukturen bei MAP2 und MAP12) scheidet alle drei Bäume als Mutterbäume für zwei der drei Pflanzen aus. Die dritte Pflanze allerdings kann von einem der drei Bäume stammen; sie trägt auch bei ccmp10 die für Südostbayern spezifische Variante „105“, die auch einige der beernteten Bäume haben. Ähnlich wurde für weitere Pflanzen und Genorte verfahren. Das Ergebnis spricht dafür, dass ein Teil der Pflanzen aus der Plantagenernte, ein Teil aber aus einer anderen Ernte stammt.

Herkunftskontrolle bei Vogelkirsche mittels nuklearer Mikrosatelliten

Bei einer Vogelkirschen-Ernte in einem Bestand, der 2005 nur wenig fruktifiziert hat, sind dem Kontrollbeamten Unregelmäßigkeiten aufgefallen. Am 19.07. lagen auf den Netzen nur kleine Samen von sehr schlechter Qualität (ca. 70 % hohl, TKG = 140). Am 25.07., kurz vor Einsammeln der Ernte, lagen auf den Netzen viel mehr Samen als eine Woche zuvor. Diese Samen waren deutlich größer (TKG = 253) und hatten nur 30 % Hohlkornanteil. Für genetische Kontrolluntersuchungen wurde folgendes Probenmaterial herangezogen:

- Samen, die am 19.07. bzw. am 25.07. auf den Netzen lagen. Es wurde vermerkt, unter welchen Bäumen die Samen entnommen worden sind.
- Eine Stichprobe aus der stratifizierten Saatgut-Partie, entnommen bei der Erntefirma. Kleine und große Samen der Partie wurden getrennt untersucht.
- Alle Vogelkirschen (Altbäume), die in dem Bestand stehen. Die Altbäume wurden nummeriert.

Untersucht wurden sieben Kern-Mikrosatelliten-Genorte unter Einsatz folgender Primer: UDP96-001, UDP96-005, UDP98-021, UDP97-403, UDP98-410, UDP98-411, UDP98-412 (SCHUELER et al. 2003).

Bei den Genabschnitten, die mit diesen Primern vervielfältigt werden, handelt es sich um Bestandteile der genetischen Information aus dem Zellkern. Sie werden immer von beiden Eltern vererbt. Für die Zuordnung von Samen zu Altbäumen wurde ähnlich wie bei Bergahorn (vgl. 4.1) verfahren, allerdings unter Berücksichtigung der Diploidie der Kirsche.

Der Vergleich der Multilocus-Genotypen der verschiedenen Samenproben mit den Multilocus-Genotypen der Vogelkirschen aus dem Bestand führte zu folgenden Ergebnissen:

- a) Die am 19.07 von den Netzen gesammelten Kerne können alle von Bäumen aus dem Bestand stammen. Der überwiegende Teil (ca. 85 %) können von den Bäumen stammen, unter denen sie eingesammelt worden sind.
- b) ca. 88 % der am 25.07. eingesammelten Kerne können mit Sicherheit nicht von den Bäumen stammen, unter denen sie gesammelt wurden. Für denselben Baum unterscheiden sich die Samen, die am 19.07.05 eingesammelt wurden, deutlich von den am 25.07.05 eingesammelten (vgl. Tab. 4).

Tab. 4: Vergleich der Genotypen an zwei Mikrosatelliten-Genorten von Samen und potentiellen Erntebäumen der Vogelkirsche. Die Samen vom 27. Juli können nicht von Baum Nr. 16 stammen, weil sie an mindestens einem Genort nicht eine der Genvarianten besitzen, die der Erntebaum trägt.

Comparison of genotypes of seeds and putative mother trees at three microsatellite loci. Seeds collected on 27th of July obviously do not originate from tree Nr. 16 because they do not share the alleles with this tree at least at one locus.

Datum Probenahme	Untersuchtes Material	Proben- nummer	Genotyp	
			UDP98-005	UDP98-410
19. Jul	Same - B. 16	1	106-126	134
19. Jul	Same - B. 16	2	106-126	134
19. Jul	Same - B. 16	1	106-126	124-132
19. Jul	Same - B. 16	2	106-118	130-132
19. Jul	Same - B. 16	3	106	134
27. Jul	Same - B. 16	1	126	130-132
27. Jul	Same - B. 16	2	110-126	132
27. Jul	Same - B. 16	3	110	130-132
Einzelbaum	Knospe	16	106-126	124-134

c) Viele der am 25.07.05 eingesammelten Samen und der großen Samen aus der bei der Firma gezogenen und dort bereits stratifizierten Partie stammen mit Sicherheit nicht von einem der 103 Altbäume des Erntebestandes. So stammen z. B. von 47 Samen, die am Genort UDP97-403 das Allel „144“ in homozygoter oder heterozygoter Form tragen, 24 nachweislich nicht aus dem Bestand. Dies ergab der Vergleich mit den zwei Bäumen des Bestandes, die dieses Allel tragen und die somit als Mutterbäume oder als Pollenspender in Frage kommen könnten.

d) Die großen Kerne können theoretisch alle von einem Baum abstammen. An jedem der sieben untersuchten Genorte gibt es zwei Allele, von denen mindestens eines in allen Samen vorkommt. Zudem treten beide Allele in manchen Samen auch in homozygoter Form auf, was einer Mendelspaltung, wie sie bei Nachkommen heterozygoter Bäume zu beobachten ist, entspricht. Dieser „hypothetische“ Erntebaum hat folgenden Multilocus-Genotyp:

UDP96-001, UDP96-005, UDP98-021,
UDP97-403, UDP98-410, UDP98-411,
UDP98-412,130/132; 110/126;
100/110; 126/144; 130/132; 164/174;
122/124.

Ein Baum mit diesem Genotyp steht nicht in dem untersuchten Erntebestand.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die großen Samen, die am 25.07.05 auf den Netzen lagen, zum überwiegenden Teil nicht aus dem angegebenen Erntebestand stammen, sondern von außen in den Bestand gebracht und auf die dort ausgebreiteten Netze verteilt wurden. Die Untersuchungen mit Mikrosatelliten bestätigen somit den dringenden Verdacht des Kontrollbeamten auf Unregelmäßigkeiten nach dem FoVG bei dieser Ernte.

Fazit

Durch die Sicherstellung repräsentativer Vergleichsproben und die schnellen Ent-

wicklungen im Bereich der DNA-Analyse bei Waldbäumen nehmen die Möglichkeiten zur Herkunftsüberprüfung und zur Aufdeckung von Fehlern beim Handel mit forstlichem Vermehrungsgut sowie die Sicherheit der Kontrollen schnell zu.

Zwar sind zurzeit die auf die Einzelprobe bezogenen Kosten bei den molekulargenetischen Untersuchungen an der DNA noch höher als bei den Isoenzymanalysen, doch kann fallweise die geringere Probenanzahl solche Kosten wieder wettmachen oder sogar zu einer Kostenersparnis führen. Auch können durch die Kombination von Isoenzymanalysen und DNA-Untersuchungen die Kosten in manchen Fällen reduziert werden.

Bei kleinen und klar abgegrenzten Ernteeinheiten (z. B. Samenplantagen) und nur bei diesen kann nach einer Komplettinventur eventuell auf die Sicherstellung von Referenzproben bei jeder Ernte verzichtet werden, wenn Genmarker mit entsprechender Variabilität gefunden werden. Auch dies würde sich kostenmindernd auswirken. Für größere Ernteeinheiten, wie sie bei den Hauptbaumarten die Regel sind, ist dies aber auch in absehbarer Zukunft kein gangbarer Weg.

Da bei jedem Verfahren nur die Nichtübereinstimmung festgestellt werden kann, ist neben den genetischen Kontrollen immer eine sichere Dokumentation aller Schritte, wie sie z.B. über die Internetdatenbank von ZüF stattfindet, unumgänglich.

Literatur:

ANONYMUS (1993): Verwaltungsvorschriften zum Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut: Prüfung mit biochemisch-genetischen Methoden. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

BERGMANN, F. (1975): Herkunfts-Identifizierung von Forstsaatgut auf der Basis von Isoenzym-Genhäufigkeiten. *Allg. Forst- u. Jagd-Ztg.* 146: 191-195.

DEGUILLOUX, M.-F., DUMOLIN-LAPÈGUE, GIELLY, L., GRIVET, D., PETIT, R.J. (2003): A set of Primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* 3: 24-27.

- GEBUREK, TH., MUHS, H.-J. (1986): Über die Identifikation von forstlichem Vermehrungsgut. *AFZ* 41: 1309-1312.
- GILLET, E. (2000): Which DNA marker for which purpose? EU-Compendium: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/wichmarker/m02/Chap2.htm>.
- GREGORIUS, H.-R., KRAUHAUSEN, J., MÜLLER-STARCK, G. (1986): Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* L. *Heredity* 37: 255-262.
- 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.
- HERTEL, H., DEGEN, B. (1998): Stieleiche von Traubeneiche mit Hilfe von Isoenzymanalysen unterscheiden. *AFZ/Der Wald* 53: 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* 51:1450-1451.
- KONNERT, M., BEHM, A. (1999): Genetische Strukturen einer Saatgutpartie. Einflussfaktoren und Einflussmöglichkeiten. *Beitr. Forstwirtschaft u. Landschaftsökologie* 4: 152-157.
- KONNERT, M., FROMM, M., HUSSENDÖRFER, E. (2002): Referenzproben zur Identitätssicherung von forstlichem Vermehrungsgut. *AFZ/Der Wald* 57: 214.
- KONNERT, M., HUSSENDÖRFER, E. (2002): Herkunftssicherung bei forstlichem Vermehrungsgut durch Referenzproben. *Allg. Forst- u. Jagd-Ztg.* 173: 97-104.
- KONNERT, M. (2004): Prüfung der Möglichkeiten zum Einsatz molekulargenetischer Marker im Rahmen eines Systems zur Herkunftssicherung von forstlichem Vermehrungsgut. Abschlußbericht des Kuratoriumsprojektes P28/2004. LWF Freising.
- KONNERT, M., BEHM, A. (2005): Proof of identity of forest reproductive material based on reference samples (in print).
- KOSTIA, S., VARVIO, S.L., VAKKARI, P., PULKKINEN, P. (1995): Microsatellite sequences in *Pinus sylvestris*. *Genome* 38: 1244-1248.
- LEFORT, F., BRACHET, S., FRASCARIA-LACOSTE, N., EDWARDS, K.J., DOUGLAS, G.C. (1999): Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). *Molecular Ecology* 8: 1075-1092.
- MÜLLER-STARCK, G. (1985): Reproductive success of genotypes of *Pinus sylvestris* L. in different environments. pp 118-133 in: GREGORIUS, H.-R. (ed.): Populations Genetics in Forestry. Lecture Notes in Biomathematics, 60: Springer-Verlag.
- PANDEY, M., GAILING, O., FISCHER, D., HATTEMER, H.H., FINKELDEY, R. (2004): Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Molecular Ecology Notes*, 4(2): 253-255.
- PFEIFFER, A., OLIVIERI, A.M., MORGANTE, M. (1997): Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 40: 411-419.
- SCHUELER, S., TUSCH, A., SCHUSTER, M., ZIEGENHAGEN, B. (2003): Characterization of microsatellites in wild cherry (*Prunus avium* L.) -markers for individual identification and reproductive processes. *Genome* 46: 95-102.
- STEINKELLNER, H., FLUCH, S., TURETSCHKE, E. (1997): Identification and characterization of (GC/CT) microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology* 33: 1093-1096.
- VENDRAMIN, G.G., LELLI, L., ROSSI, P., MORGANTE, M. (1996): A set of Primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* 5: 595-598.
- 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.
- ZIEGENHAGEN, B., SCHOLZ, F., MADAGHIELE, A., VENDRAMIN, G.G. (1998): Chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. *Can. J. For. Res.* 28: 317-321.

Anschrift der Autorin:

Dr. Monika Konnert
 Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP)
 Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf
 E-mail: monika.konnert@asp.bayern.de