

Beeinflussung einer Erhaltungssamenplantage des Speierlings (*Sorbus domestica* L.) durch Genfluss aus der Umgebung

Aus der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt,
Abteilung Waldgenressourcen, Prof.-Oelkers-Str. 6, D-34346 Hann. Münden

(Mit 4 Abbildungen und 3 Tabellen)

H. CZERNIKARZ, E. SCHÖNFELDER und J. R. G. KLEINSCHMIT

(Angenommen Mai 2016)

SCHLAGWÖRTER – KEY WORDS

Sorbus domestica L.; DNA Mikrosatelliten-Marker; Generhaltung; Erhaltungssamenplantage; Genfluss; Vaterschaftsanalyse; Pollenwolken.

Sorbus domestica L.; DNA mikrosatellite marker; gen conservation; conservation seed orchard; gen flow; paternity test; pollen cloud.

1. EINLEITUNG

Der Speierling (*Sorbus domestica* L.) gehört zu den seltenen einheimischen Baumarten in Deutschland. Die Anzahl der noch vorhandenen Altbäume wird auf ca. 5000 geschätzt. Gefährdet ist die Art vor allem am Nordrand ihres Verbreitungsgebietes in Hessen und Sachsen-Anhalt (BLE, 2014). Die wenigen Populationen stehen meist isoliert voneinander. Darüber hinaus befinden sich viele Altbäume in einer solitären Lage. Durch die intensive Landwirtschaft fehlen weit verbreitet die natürlichen Brücken, über die sich Pflanzen neue Areale erschließen können. Die Hochwaldwirtschaft verhindert gleichermaßen eine natürliche Ausdehnung des Verbreitungsgebietes. Außerdem wird die früher übliche Verpflanzung von Speierlingen aus dem Wald in die Nähe der Ortschaften heute nicht mehr durchgeführt (KAUSCH-BLECKEN VON SCHMELING, 1992). Eine natürliche Verjüngung durch Samen wird nur sehr selten beobachtet (RUDOW, 2001). Mögliche Selbstinkompatibilitätsmechanismen bzw. Inzuchtdepression können hier nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen scheinen zur Erhaltung der genetischen Variation beim Speierling Erhaltungssamenplantagen besonders geeignet. Sie stellen künstliche Fortpflanzungsgemeinschaften von bis dahin z.T. reproduktiv isolierten Genotypen dar, durch die aufgrund ihres ungehinderten Genaustausches die gefährdeten Genressourcen gesichert werden können. Ein weiterer Grund für die Erhaltung des Speierlings ist ihr hohes wirtschaftliches Potenzial: Spitzenerlöse für wertvolles Stammholz und für die Fruchtnutzung zur Herstellung von Destillaten (MÜLLER-STARCK, 2000).

In der folgenden Untersuchung findet die molekular-genetische Methode der Mikrosatelliten-Marker, oder

auch SSR („simple sequence repeats“) genannt, Verwendung. Hierbei handelt es sich um vermutlich neutrale, kodominante Zellkern-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 mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifizierten DNA-Fragmente dokumentiert werden kann. Mit dieser Methode soll der Genfluss durch Pollen von einer nahegelegenen Allee zur Plantage untersucht werden. Hierzu werden die Anteile der Pollenelter aus der Allee mit denen der Plantage verglichen. Weiterhin werden die Pollenwolken in Abhängigkeit von dem Pflanzplatz der Samenelter für verschiedene Genotypen charakterisiert. Zudem werden Aussagen über die Repräsentativität der Samen der Erhaltungssamenplantage getroffen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsgebiet und -material

Die Untersuchung beschäftigt sich mit der in Südhessen 1997 mit Pfröpflingen (Speierling auf Speierling) angelegten Erhaltungssamenplantage im Forstamt Groß-Gerau, Gemeinde Hattersheim und der in der unmittelbaren Nähe gepflanzten Speierlings-Allee. Auf der Plantage befinden sich 49 unterschiedliche Klone mit einer Anzahl von eins bis sechs zufällig auf der Fläche verteilten Ramets. Insgesamt wachsen dort 224 Bäume mit einem Abstand von acht Metern. Alle Klone stammen aus den ehemaligen Forstämtern in Hessen: Rüdesheim, Usingen, Chausseehaus, Gießen, Bad Nauheim, Langen, Nidderau, Hofheim, Bad Homburg, Königstein, Büdingen, Butzbach, Michelstadt, Beerfelden und Gelnhausen. Die Allee beinhaltet 83 Bäume unbekanntes Ursprungs. Im Sommer 2007 wurden Früchte direkt von den Bäumen der Plantage geerntet als auch zum Teil unter ihnen aufgesammelt. Dabei gingen jeweils 50 Samen von sieben Bäumen, die fünf Klone repräsentieren, mit einer relativ gleichmäßigen Verteilung auf der Plantage in die Untersuchung mit ein. Bei der Samenernte konnte eine unregelmäßige Fruktifikation der Altbäume festgestellt werden. Weiterhin wurden im April 2008 allen Bäumen der Plantage und der Allee Knospen abgenommen, die dann zusammen mit den Embryonen genetisch mit Hilfe der Mikrosatelliten-Marker untersucht wurden.

*) Korrespondierende Autorin: HANNA CZERNIKARZ. James-Franck-Ring 61a, D-37077 Göttingen. E-Mail: hania.wypukol@gmx.net

2.2 Molekulargenetische Untersuchung

2.2.1 Extraktion der DNA und die Mikrosatelliten-Analyse

Die DNA wurde zum einen aus Knospen und zum anderen aus den Embryonen gewonnen. Für die Extraktion der DNA kam der Qiagen DNeasy® Plant Kit zum Einsatz. Dazu wurden die äußeren Knospenschuppen bzw. die Samenschale entfernt. Eine halbe Knospe bzw. ein halber Same wurden für die Untersuchung verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Spektralphotometers (peQLab ND-1000) bestimmt und auf 4 ng/µl DNA verdünnt.

Die verwendeten nuklearen Mikrosatelliten-Marker wurden an verwandten Arten wie *Malus x domestica*, *Pyrus* oder *Sorbus torminalis* entwickelt und bereits am Speierling für Elternschaftsanalysen getestet (KAMM et al., 2009). Die Optimierung dieser PCR-Programme als auch die spätere Amplifizierung erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers (Primus 96 advanced von peQLab). Die Fragmentgröße der amplifizierten DNA-Sequenzen wurde mittels eines DNA-Analysers 4300 festgestellt (LI-COR, Bad Homburg, Automated Microsatellite Software Saga™).

Insgesamt wurden acht Primerpaare (CH02c09, CH01h10, MS14H03, CH01h01, MSS5, MSS16, BGT23b, CH02d08) mit den PCR-Programmen und Zusammensetzungen nach KAMM et al. 2009 getestet und für den verwendeten Thermocycler optimiert. Für die weitere Analyse wurden vier Primerpaare (CH01h01, CH01h10, CH02c09, MS14H03) aufgrund ihrer höheren Variation und einer qualitativ guten Auswertung ausgewählt.

2.2.2 Auswertungsmethoden

Da die Früchte teilweise auch unter den Bäumen gesammelt wurden, lag es nahe zunächst die Samen auf „mismatches“ mit dem jeweiligen Samenelter zu testen. Nach den Mendel'schen Vererbungsregeln diploider Organismen sollten die Samen mindestens ein Allel des Samenelter enthalten. Ein „mismatch“ ist gegeben, wenn kein Allel des Samens dem Samenelter zugeordnet werden kann. Dieser direkte Vergleich (Mendel-Check) ermöglicht es außerdem, Nullallele zu detektieren. Trägt der Samenelter ein Nullallel, erscheinen einige Samen homozygot für ein Allel, welches der Samenelter nicht trägt, jedoch der zugehörige Pollenelter. Da vor allem bei Vaterschaftsanalysen mit Hilfe des Ausschlussprinzips Genotypisierungsfehler durch falsche Identifikation enorme Auswirkungen auf die Ergebnisse haben können, ist eine Qualitätssicherung der Daten von großem Vorteil (DAKIN und AVISE, 2004; HOFFMAN und AMOS, 2005). Der Mendel-Check wurde mit dem Programm CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007) durchgeführt.

Die statistische Aussagekraft der Markerkombination im Hinblick auf eindeutige Individualerkennung wurde durch den P_{ID} -Wert (Probability of Identity, WAITS et al., 2001) geprüft. Dieser Wert vermittelt, wie gut die Speierlings-Klone mit den verwendeten Markern voneinander unterschieden werden können. Der Wertebereich dieser Wahrscheinlichkeit ist abhängig von der

Variation der Marker und der Anzahl der verwendeten Marker-Loci. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm GenAlEx Version 6 (PEAKALL und SMOUSE, 2006) mit einer zufälligen Reihenfolge der hinzugefügten Marker.

Für einen Überblick der an den Genorten vorhandenen Variation und deren Verteilung in den Untersuchungseinheiten (Plantage, Nachkommen, Allee) wurden jeweils die Allelanzahlen und die Allelfrequenzen mit GenAlEx Version 6 (PEAKALL und SMOUSE, 2006) berechnet. Der Vergleich von Allelfrequenzen der Samen der drei Ramets des Klons 451 einerseits und der beiden untersuchten Samenelter (609-171; 674-207) mit dem geringsten Abstand zueinander andererseits ermöglichte eine Charakterisierung der Pollenwolken. Um den Vergleich der Ergebnisse durch den unterschiedlichen genetischen Beitrag der beiden Klone an ihre Nachkommen nicht zu verfälschen, wurde zunächst der mütterliche allelische Beitrag vom Multilocus-Genotyp des Embryos entfernt. Das Ergebnis ist der genetische Beitrag des Pollens, bezeichnet als der männliche Haplotyp (vgl. GILLET und GREGORIUS, 2000). Einige Embryonen stellten sich jedoch mit dem Samenelter als heterozygot bezüglich der gleichen Allele heraus. An dieser Stelle wurde der Pollenbeitrag unter der Annahme der Mendel'schen Segregation geschätzt: der Hälfte der Samen, die dieselben heterozygoten Allele trugen wie ihr Samenelter, wurde das eine Allel zugewiesen und der anderen Hälfte das andere. Im Anschluss wurde ein χ^2 -Homogenitätstest getrennt für die vier untersuchten Genorte durchgeführt (Microsoft Office Excel, 2007). Die Nullhypothese besagt, dass die Verteilung der Allelfrequenzen über die Samen der drei Bäume homogen ist. In diesem Fall wäre für jeden Samenelter eine homogene Pollenwolke gegeben und zwar unabhängig vom Standort. Als Signifikanzniveau wurde generell $\alpha = 0.05$ verwendet.

Zusätzlich wurde die genetische Variation zum Vergleich der drei Untersuchungseinheiten durch die allelische Diversität (Diversitätsindex) und die Heterozygotie bestimmt (GREGORIUS, 1978). Dabei bezieht sich der Diversitätsindex auf die Anzahl der effektiven Allele an einem bestimmten Genlocus, d.h. auf die Anzahl der Allele bei Gewichtung mit deren relativen Häufigkeiten. Der minimale Wert ist gleich eins, wenn der betreffende Genlocus monomorph ist. Der maximale Wert ist gleich der Anzahl der am betrachteten Genlocus beobachteten Allele im Fall der Gleichverteilung. Die Genpool-Diversität einer Population oder eines Kollektivs ergibt sich aus dem harmonischen Mittel der Einzellocusdiversitäten. Berechnet wurde der Index mit dem Programm GSED 2.1 (GILLET, 1998). Der Heterozygotieanteil eines Genlocus eines Kollektivs bezieht sich auf den darin enthaltenen Anteil heterozygoter Individuen. Das arithmetische Mittel der Heterozygotenanteile über die untersuchten Genloci wird als der mittlere Heterozygotiegrad des Kollektivs bezeichnet. Berechnet wurde dieser mit dem Programm CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Auf den Vergleich der beobachteten und der erwarteten Heterozygotieanteile wurde verzichtet, da die angelegte Plantage mehrere Voraussetzungen für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht erfüllt.

Im Sommer 2007 wurden Früchte der Plantage geerntet. Da hier auf einen guten Fruchtansatz geachtet wurde, könnte es sein, dass weitere Bäume in geringem Maße fruktifiziert hatten, jedoch nicht in die Beerntung mit einbezogen wurden. Blühbeobachtungen aus dem Reifejahr liegen nicht vor. Die Vaterschaftsanalyse durch das Ausschlussprinzip wurde mit Hilfe eines selbsterstellten Programms R 2.6.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2007) durchgeführt. Zunächst wurde der potentielle Gametenbeitrag des Pollenelters durch einen Vergleich zwischen Genotyp des Samens und Genotyp des Samenelters ermittelt. Im Anschluss daran wurde analysiert, welcher der Altbäume als Pollenspender in Frage kam. Im Idealfall ergab das Ausschlussprinzip nur einen möglichen Pollenspender. Stellte sich jedoch der Mutterbaum und der Embryo als heterozygot bezüglich der gleichen Allele heraus, so gab es zwei potentielle Gamentenbeiträge des Pollenspenders. Mit der zunehmenden Anzahl solcher heterozygoten Genorte steigt auch die Anzahl der potentiellen Gametenbeiträge der Pollenspender (vgl. JONES und ARDREN, 2003). Im Fall mehrerer potentieller Pollenspender wurde unter der Annahme einer geringen effektiven Pollenausbreitungsdistanz über Insekten als Vektoren der räumlich nächstliegende als Pollenspender angenommen. Dies betraf auch die einzelnen Ramets eines Klons.

Alle Altbäume mit ihren jeweiligen räumlichen Abständen zueinander wurden mit Hilfe des R-Programms in ein zweidimensionales Koordinatensystem übertragen. Auf diese Weise konnten die Entfernungen zwischen den Mutterbäumen und den potentiellen Pollenspendern bestimmt werden. Für den Vergleich der Pollenausbreitungsdistanzen wurden in den Graphiken Kreise um die Samenelter gezogen, deren Radius dem Median der minimalen Pollenausbreitungsdistanzen einer Einzelbaumnachkommenschaft entspricht. Dieser wurde an dieser Stelle dem Mittelwert vorgezogen, da er sich für nicht normalverteilte Werte besser eignet.

Es wurden Berechnungen für zwei Szenarien durchgeführt: Erstens wurden alle Altbäume auf der Plantage und der Allee als potentielle Pollenspender angesehen. Zweitens wurde diese Berechnung mit nur den im Sommer 2007 beernteten Altbäumen der Plantage und allen Altbäumen der Allee durchgeführt. Die Möglichkeit

Tab. 1
Wahrscheinlichkeiten (P_{ID}) für zufällig übereinstimmende Genotypen bei nicht verwandten Individuen mit zunehmender Locusanzahl.
Probability (P_{ID}) of random conformable genotypes with non-related individuals and an increasing locus number.

Genort (gene locus)	PID
CH02C09	0,159
CH02C09 + CH01h10	0,015
CH02C09 + CH01h10 + MS14H03	0,001
CH02C09 + CH01h10 + MS14H03 + CH01h01	0,00024275

einer Selbstbefruchtung bzw. der Befruchtung durch die Ramets der Mutterbäume wurde bei diesen Berechnungen ausgeschlossen. Das zweite Szenario geht davon aus, dass nur die Bäume, welche auch fruktifiziert haben, auch geblüht und damit Pollen produziert haben. Die Ergebnisse beider Berechnungen wurden miteinander verglichen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Qualitätssicherungen der Methode

Der Mendel-Check ergab keine Hinweise auf das Vorhandensein von Nullallelen. Zwei der Samenelter wiesen jedoch „mismatches“ mit einem bzw. mit drei der Samen auf. Diese Embryonen tragen jedoch jeweils Allele eines Nachbarbaumes. Der Speierling wird endozoochor verbreitet, das bedeutet die Diasporen werden zunächst gefressen und dann wieder ausgeschieden. Die Früchte locken Vögel, Nager, Rehe, Wildschweine, Füchse und Marder an (RUDOW, 2001). Da ein Teil der Früchte auch unter den jeweiligen Bäumen gesammelt wurde, würde somit eine Verschleppung der Diasporen durch Tiere eine mögliche Erklärung bieten. Deshalb wurden diese vier Samen von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Tab. 2
Beobachtete Allelanzahlen und Allellängen je nach Mikrosatelliten-Locus.
Observed allele number and size according to the microsatellite locus.

Primer primer	Allellänge (bp) Allele size (bp)	Allelzahl insgesamt Allel number overall	Allelzahl Plantage Allel number seed orchard	Allelzahl Nachkommen Allele number offspring	Allelzahl Allee Allele number alley
CH01h01	93-145	7	4	4	7
CH02C09	224-242	5	4	5	5
CH01h10	106-138	14	7	10	14
MS14H03	164-190	12	7	9	11

Es zeigte sich, dass die eindeutige Individualerkennung mit steigender Anzahl der untersuchten Genloci immer wahrscheinlicher wurde, was anhand der PID-Werte in *Tab. 1* gut zu erkennen ist. Durch die vier untersuchten Genloci können in erwarteter Weise 24 von 100 000 Fällen zwei Individuen nicht voneinander unterschieden werden. Somit ist die Variation der ausgewählten Marker für die Unterscheidung der Klone auf der Plantage und in der Allee ausreichend.

3.2 Allele und Allelfrequenzen

Die Untersuchungen zeigen eine geringe bis mittelgroße genetische Variabilität der vier Genloci mit fünf bis 14 Allelen (*Tab. 2*). Insgesamt wurden über alle vier Loci 38 Allele detektiert. Das Häufigste weist eine Fre-

quenz von 0,54 auf. Die Hälfte der gefundenen Allele kommt mit einer geringeren Frequenz als 0,05 vor. Dieses seltene Vorkommen wird für das Ausschlussprinzip bei der Vaterschaftsanalyse genutzt (Dow und ASHLEY, 1998). Außerdem wurde bei einem Nachkommen ein Allel (174 bp) mit Einzelvorkommen am Genort MS14H03 dokumentiert. Die Allelanzahlen (*Tab. 2*) differenziert nach Plantage und Allee zeigen eine höhere genetische Variabilität der Allee an. Bei drei der vier untersuchten Loci übersteigt die Allelanzahl der Nachkommen die Allelanzahl der Plantage, was einen deutlichen Hinweis auf Genfluss von außerhalb der Plantage, vermutlich von der nahegelegenen Allee, darstellt.

Abbildung 1 zeigt die Verteilung und die Häufigkeiten der Allele aller Genorte in den drei Untersuchungseinheiten

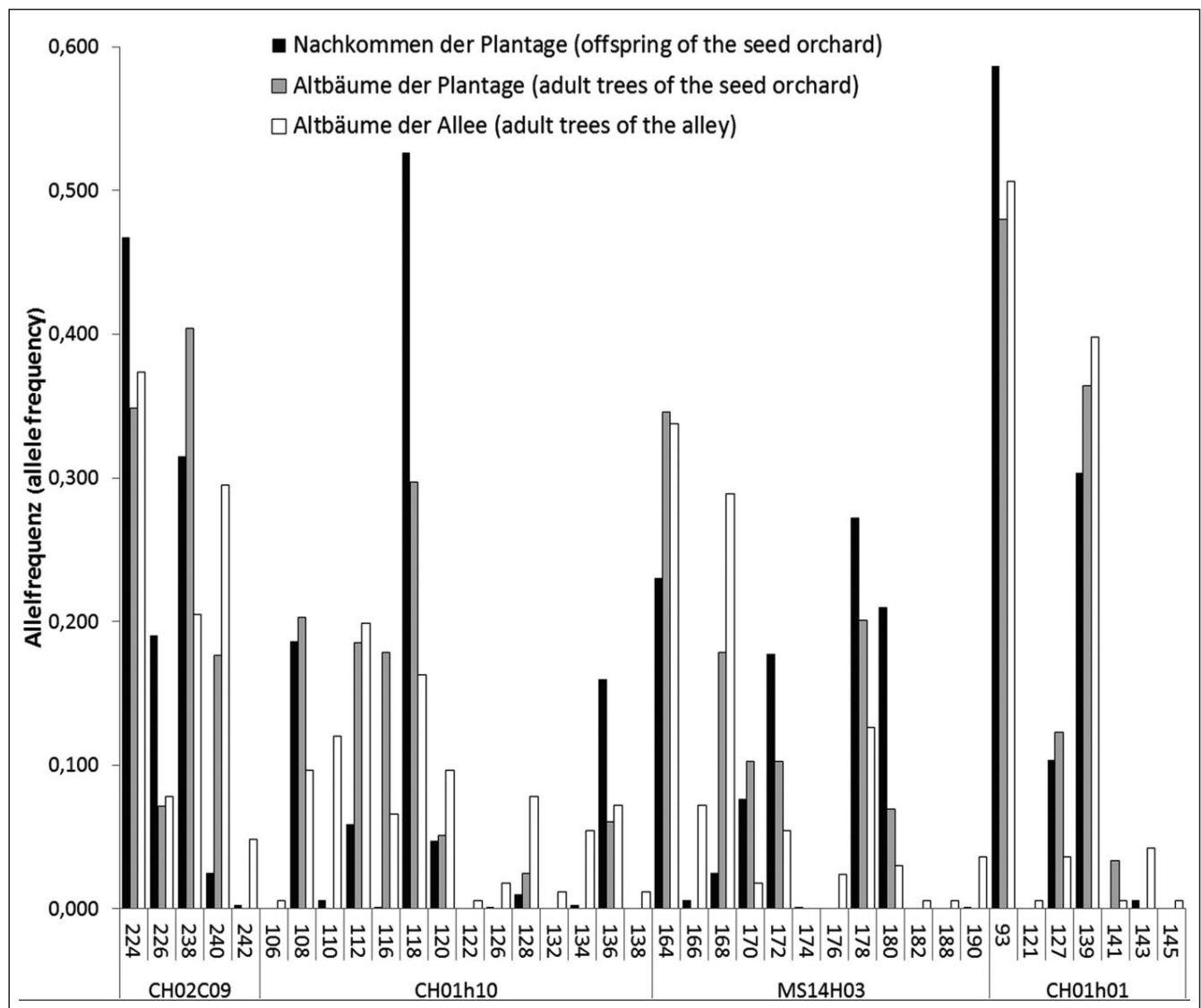


Abb. 1

Allelfrequenzen der vier untersuchten Genloci innerhalb der Untersuchungseinheiten: Altbäume der Allee, Altbäume der Plantage und Nachkommen der Plantage. Die X-Achse beinhaltet die Alleltypen in bp.
 Allele frequency of the four reviewed gen loci within the investigation units: adult trees of the alley, adult trees of the seed orchard and the offspring of the seed orchard. The x-axis shows the allele type in bp.

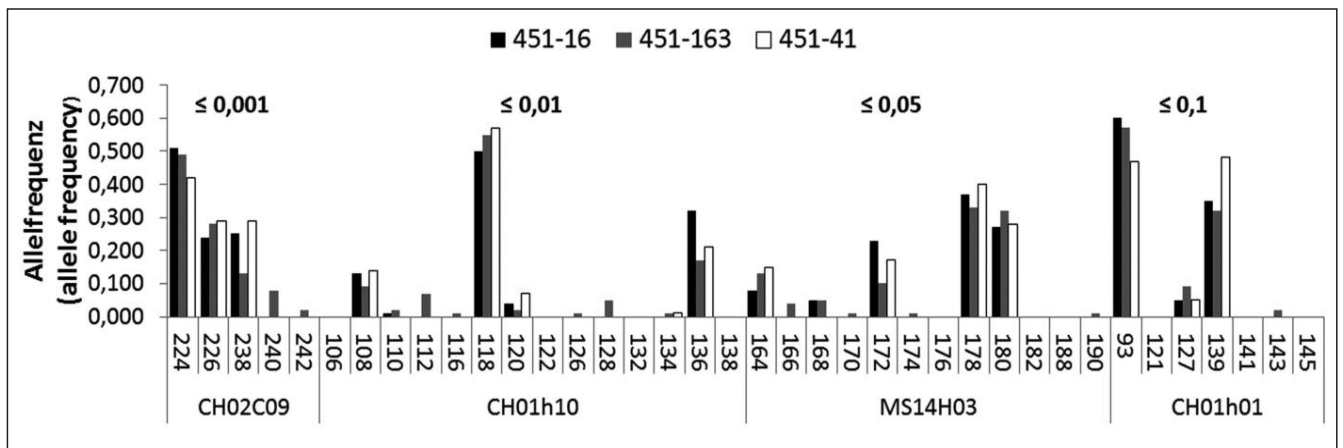


Abb. 2

Allelfrequenzen der Nachkommen des Klons 451 auf drei unterschiedlichen Pflanzplätzen der Plantage 16, 163 und 41. Die X-Achse beinhaltet die Alleltypen in bp. Zusätzlich sind die Signifikanzwerte des χ^2 -Homogenitätstests einzeln für jeden Genlocus eingetragen.

Offspring allele frequencies of the ramets of the clone 451 at three different plant positions 16, 163 and 41. The x-axis shows the allele type in bp. Additionally there are significance data of the χ^2 -homogeneity test given for every single locus.

einheiten. Die schon oben erwähnten Unterschiede in den Frequenzen sind deutlich zu sehen. Die Allele weist mehr eigene Allele mit geringer Frequenz auf als die Plantage. Die Nachkommen haben mit den Altbäumen der Plantage 20 von den insgesamt 38 gefundenen Allelen gemeinsam. Da die wenigen Sameneltern mit ihrer Allelausstattung nicht repräsentativ für die Plantage sind, ist bei 8 Allelen der Nachkommen eine Überrepräsentation zu sehen (Abb. 1). Weiterhin weisen 11 der 20 gemeinsamen Allele bei den Nachkommen eine geringere Frequenz im Vergleich zu den Altbäumen der Plantage auf. Diese Veränderungen in den Genhäufigkeiten in aufeinander folgenden Generationen zeigen, dass die effektive Fortpflanzungsgemeinschaft sich nicht nur aus allen Altbäumen der Plantage zusammensetzt (PRIMACK, 1995). Dies ist ein direkter Hinweis darauf, dass im Jahr 2007 die Bäume zur unterschiedlichen Zeiten geblüht haben. Zusammen mit der beobachteten Tatsache der unregelmäßig starken Fruktifikation der Altbäume wird deutlich, dass die genetische Struktur der untersuchten Samen lediglich repräsentativ für das Reifejahr 2007 und nicht für die genetische Struktur der Erhaltungssamenplantage sind.

3.3 Homogenität der Pollenwolken

Einen Vergleich der Allelverteilung der Samen desselben Klons 451 vertreten mit drei Ramets zeigt Abbildung 2. Die Ramets sind auf unterschiedlichen Pflanzplätzen zu finden -16, -41 und -163. Der Abstand zwischen -16 und -41 beträgt 32,98 m, zwischen -16 und -163 62,48 m und zwischen -41 und -163 86,16 m. Der genetische Beitrag der genetisch identischen Sameneltern ist deutlich zu erkennen (Multilocus-Genotyp des Klons 451: CH02C09: 224/226; CH01h10: 118/136; MS14H03: 178/180, CH01h01: 93/139). 26,32% der in allen drei Untersuchungseinheiten beobachteten Allele

(Abb. 1) fehlen in den Samen dieses Klons. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um die seltenen Allele der Allele. Nur wenige dieser Allele sind lediglich in den Samen des Baumes 451-163 zu finden. Aufgrund der Abhängigkeit der phänotypischen Variation von genetischen Komponenten (RINGO, 2006) könnte davon ausgegangen werden, dass die Ramets dieses Klons zur selben Zeit geblüht haben. Die zeitliche Variation der Pollenwolken spielt hier also keine Rolle. Trotzdem konnte auf der Basis des χ^2 -Homogenitätstests an zwei Genorten die Nullhypothese verworfen werden ($p=0,01$ und $p=0,001$). Dies verweist auf inhomogene, in der genetischen Zusammensetzung unterschiedliche effektive Pollenwolken. Eine mögliche Erklärung dieser Inhomogenität wäre das Verhalten der bestäubenden Insekten, das von unterschiedlichen Faktoren abhängen kann, wie z.B. von der Konkurrenz mit anderen Bestäubern oder auch von der Entfernung der blühenden Bäume zueinander. Prinzipiell wird die nächststehende lukrative Nahrungsquelle aufgesucht (FROMM, 2001). Ein Vergleich von näher zueinander stehenden Bäumen weist allerdings ebenfalls große Unterschiede in der genetischen Pollenwolken-Zusammensetzung auf (Abb. 3). Für den Vergleich wurden die Klone 609-171 und 674-207 mit einem Abstand von 22,6 m gewählt (siehe Abb. 4). Hier konnte auf der Basis des χ^2 -Homogenitätstests an allen vier Genorten die Nullhypothese verworfen werden ($p<0,001$), was auch hier auf inhomogene Pollenwolken verweist.

3.4 Genotypisierung

Die Alleebäume zeigen auf der Basis ihrer Multilocus-Genotypen eine hohe genetische Variabilität. So konnten mit Hilfe der vier Mikrosatelliten-Genorte innerhalb der 83 Bäume 77 Genotypen unterschieden werden. Dies lässt vermuten, dass es sich hier um Sämlinge und keine

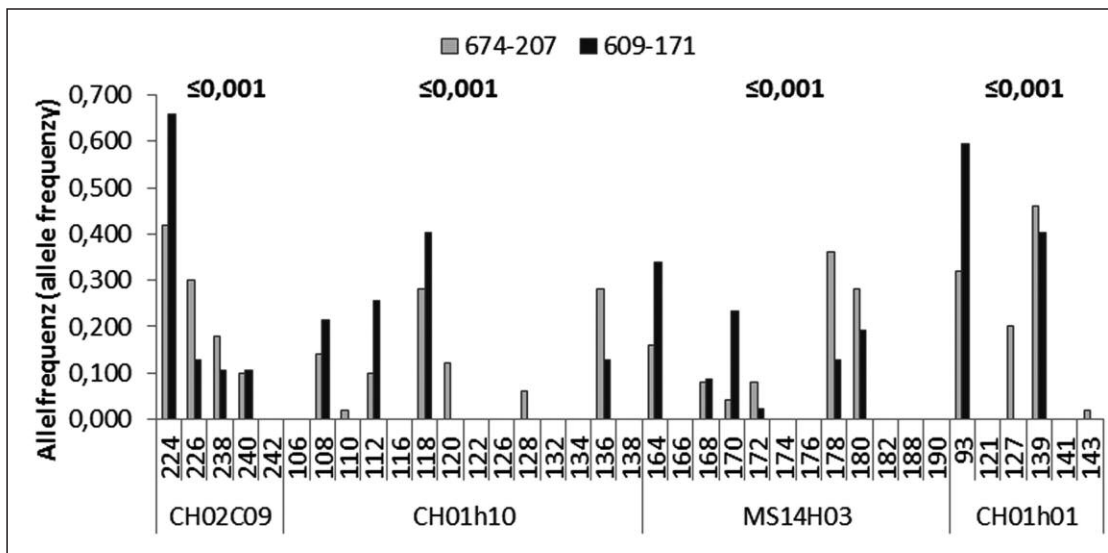


Abb. 3

Geschätzte Allelfrequenzen des Pollenbeitrags für die Samen der Klone 674 und 609 auf den Pflanzplätzen 207 und 171. X-Achse beinhaltet die Alleltypen in bp. Zusätzlich sind die Signifikanzwerte des χ^2 -Homogenitätstests einzeln für jeden Genlocus eingetragen.

Estimated allele frequency of the pollen input for the seed of the clone 674 and 609 on the plant positions 207 and 171. The x-axis shows the allele type in bp. Additionally there are significance data of the χ^2 -homogeneity test for every single locus.

Pfropflinge handelt. Auf der Plantage konnten mit Hilfe dieser Methode 49 unterschiedliche Klone identifiziert werden. Im Vergleich ist nur ein Klon der Allee mit einem auf der Plantage identisch. Auf dieser Grundlage existieren insgesamt 125 unterschiedliche Multilocus-Genotypen innerhalb der Altbäume.

Diese Feststellungen spiegeln sich auch in der Genpool-Diversität wider (Tab. 3). Den höchsten Wert erreicht die Allee. Der Unterschied zur Plantage ist jedoch gering. Der im Vergleich niedrigste Wert der Samen kann wiederum auf die geringe Anzahl der

Samenelter zurückgeführt werden (siehe Verteilung der Allelfrequenzen). Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die effektive Populationsgröße kleiner ist als die Individuenzahl der Altbäume. Es besteht die Möglichkeit, dass noch nicht alle Bäume auf der Plantage die Blühreife erlangt haben oder dass sie unterschiedliche Blühzeiten im Verlauf des Frühlings aufweisen. KONNERT und FROMM (2004) stellten auf einer Winterlinden-Plantage das Phänomen der klonalen Variation der Blühperiode fest. Eine solche genetisch einseitige Einbringung in die Samen würde sich jedoch in der

Tab. 3

Vergleich der mittleren Heterozygotie und der Genpool-Diversität zwischen den Untersuchungseinheiten.
Comparison of the mean heterozygosity and the gene pool diversity between the investigation units.

	Mittlere Heterozygotie mean heterozygosity	Genpool-Diversität gene pool diversity
Plantage seed orchard	0,715	3,548
Nachkommen offspring	0,725	2,871
Allee alley	0,695	3,847

Allelverteilung als auch im Heterozygotiegrad bemerkbar machen. Im Hinblick auf die Mischerbigkeit gibt es aber kaum Unterschiede zwischen den Untersuchungseinheiten (Tab. 3).

3.5 Vaterschaftsanalyse

Unter Verwendung des Ausschlussprinzips konnte für 12,72% (alle Altbäume = potentielle Pollenspender) bzw. 17,05% (beerntete Altbäume = potentielle Pollenspender) der untersuchten Samen der Plantage ein eindeutiger Pollenelter identifiziert werden. Für die Mehrheit der Samen kommen also mehrere potentielle Pollenspender in Frage, die durch die untersuchten Genloci nicht ausgeschlossen werden konnten. Wurden nur die zum Samenelter nächstliegenden potentiellen Pollenspender betrachtet, dann ergaben sich aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten der Zusammensetzung des männlichen Haplotypen für insgesamt alle Samen der jeweiligen Bäume höchstens 12 bis 35 (alle Alt-

bäume = potentielle Pollenspender) bzw. 4 bis 22 (beerntete Altbäume = potentielle Pollenspender) potentielle Pollenelter. Wird die Selbstung in der Berechnung zugelassen, so ist diese für höchstens 10,12% der untersuchten Samen möglich.

Für alle Samen zusammen konnten eindeutige Vaterschaften einerseits innerhalb der Plantage mit einem Anteil von 16,76% (alle Altbäume = potentielle Pollenspender) bzw. 14,74% (beerntete Altbäume = potentielle Pollenspender) und andererseits von der Allee kommend mit einem Anteil von 4,05% (alle Altbäume = potentielle Pollenspender) beobachtet werden. Letzteres ist also der minimale effektive Pollenanteil der Allee. Für eine eindeutige Identifizierung der Pollenelter sollten jedoch mehr Mikrosatelliten-Loci zur Untersuchung herangezogen werden. Nach SLAVOV et al. 2005 sind für eindeutige Ergebnisse bei Elternschaftsanalysen fünf bis neun hochvariable Loci notwendig. Fünf (alle Altbäume = potentielle Pollenspender) bzw. 11 (beerntete Altbäume

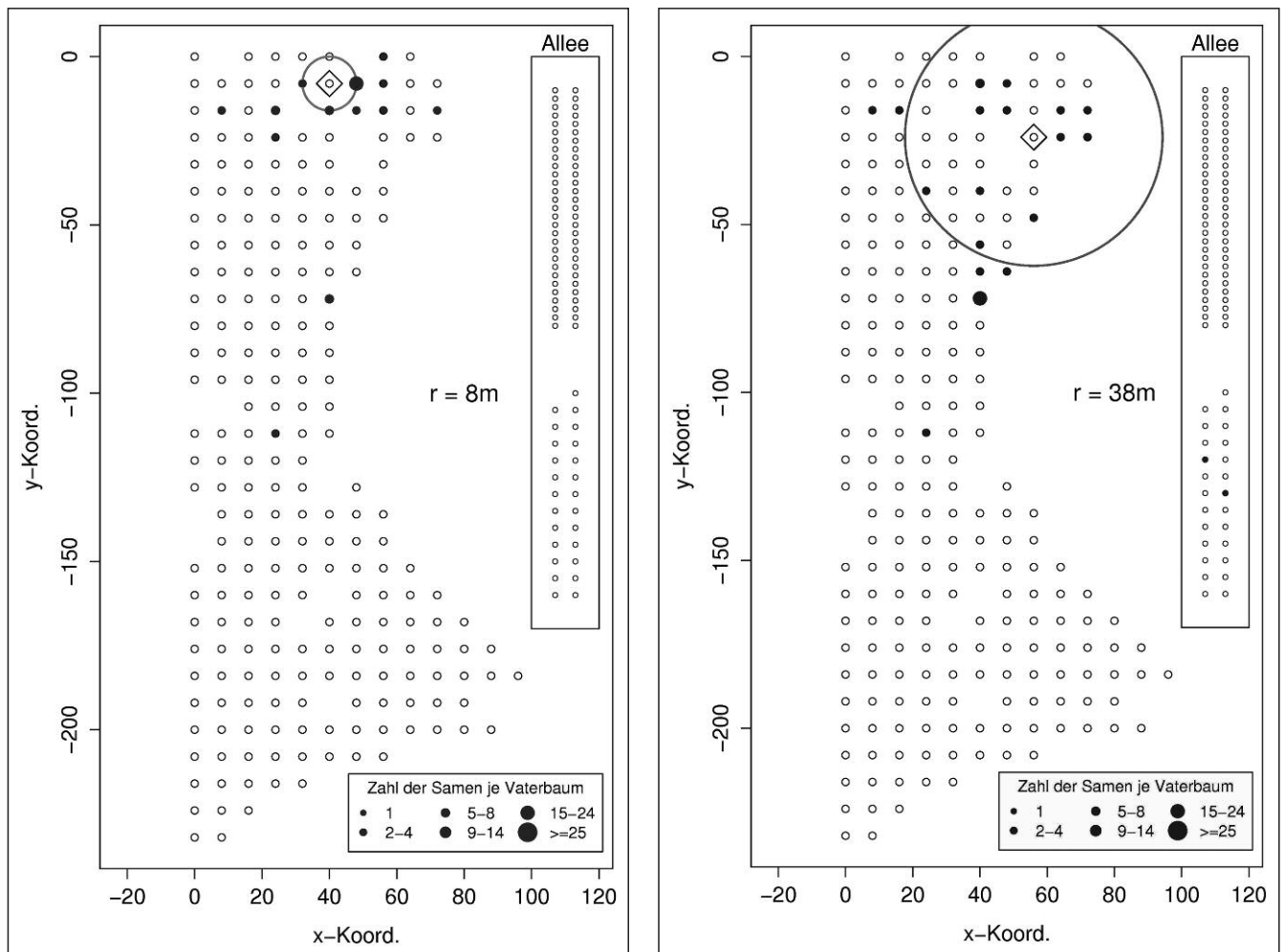


Abb. 4

Die Lage der zum Samenelter a) 609–171 bzw. b) 674–207 (Klonbezeichnung Pflanzplatz) räumlich nächstliegenden potenziellen Pollenspender. Die Allee wurde in die Grafik projiziert. r: mediane effektive Pollenausbreitungsdistanz.

The location of the mother tree a) 609–171 and b) 674–207 (clone number – plant position) and the nearest potential pollen donator. The alley was project into the graphic. r: the median effective pollen dispersal distance.

= potentielle Pollenspender) der untersuchten Samen konnten keinem der untersuchten Altbäume als Pollenspender zugeordnet werden. Einer dieser Embryonen trägt das schon oben erwähnte Allel mit Einzelnvorkommen. Die Unterschiede der Ergebnisse der beiden Berechnungsvarianten zeigen den großen Einfluss der bei der Berechnung zugelassenen potentiellen Pollenspender. Werden die potentiellen Pollenelter der Plantage auf die beernteten Samenelter begrenzt erhöht sich die Schätzung des Genflusses aus der Allee. Die Samen ohne Zuordnung von Polleneltern deuten einerseits auf weitere blühende Exemplare der Plantage, die nicht beerntet wurden. Andererseits ist das ein Hinweis auf weitere potentielle Pollenspender, die entweder in der umgebenden Landschaft oder auf der Plantage selbst als durchgewachsene Unterlage zu suchen sind. Eine weitere Möglichkeit sind die im Jahr 2008 als ausgefallen bezeichnete Bäume, die im Jahr 2007 noch geblüht haben könnten. Laut KAMM et al. 2009 konnten in einer weiträumigen Untersuchung der Art Speierling effektive Pollenausbreitungsdistanzen über zwei Kilometer mit einem Anteil von über 10% beobachtet werden. Weitere Analysen zu dieser Art sind nicht bekannt. Der Aktionsradius der für die Bestäubung in Frage kommenden Insekten wie z.B. Bienen, Hummeln, Schwebfliegen, Pflanzenwespen ist am besten für die Bienen dokumentiert. Prinzipiell werden Trachtquellen von Bienen in unmittelbarer Nähe des Bienenstocks bevorzugt angefliegen. Die Durchschnittsdistanzen betragen ca. zwei Kilometer. Dies hängt allerdings von der Verteilung der Speierlinge und anderer Trachtbäume in der Landschaft ab. So können auch größere Distanzen zurückgelegt werden. Hier scheint die obere Grenze zwischen fünf und sieben Kilometern zu liegen (MÜLLER, 2002). Die tatsächlichen Pollentransportweiten können außerdem durch den „Carry-over“-Effekt die Flugweiten der Bestäuber um ein Vielfaches übertreffen, denn der Pollen kann über mehrere angeflogene Blüten hinweg übertragen werden (FROMM, 2001). Nicht auszuschließen ist das in der Gattung *Sorbus* bekannte Phänomen der Hybridisierung (NELSON-JONES et al., 2002; ROBERTSON et al., 2004; CHESTER et al., 2007), wobei Hybride mit der Art *S. domestica* in der Literatur nicht bekannt sind.

Die graphischen Darstellungen (Abb. 4) zeigen die räumliche Verteilung der zum jeweiligen Samenelter nächststehenden potentiellen Pollenspender (beispielhaft für zwei der sieben untersuchten Bäume). Innerhalb des Kreises um den jeweiligen Samenelter befinden sich die potentiellen Pollenelter, die für 50% der Samen in Frage kommen. Der Kreisradius steht für die mediane, effektive, kleinstmögliche Pollenausbreitungsdistanz, die für alle sieben Samenelter zwischen acht und 38 m liegt, wobei die kleinstmögliche Distanz für den effektiven Pollentransport zu einem einzelnen Samen höchstens 714,6 m aufweist. Enorme Unterschiede in den Ausbreitungsdistanzen treten selbst bei nahestehenden Sameneltern auf. Auch diese Tatsache verweist auf die Inhomogenität der Pollenwolken zwischen den untersuchten Bäumen. Aus den Graphiken ist ersichtlich, dass Pollenspender immer wieder auch in der Allee zu finden sind. Hierbei spielt der Pflanzplatz der Samenelter keine Rolle. Es zeigen demzufolge alle Bäume der

Plantage Externpollen aus der Allee. Die höchste Entfernung zwischen zwei Altbäumen in dieser Untersuchung liegt bei knapp einem Kilometer, was die Hälfte der durchschnittlichen Flugdistanzen der Bienen darstellt (s.o.). Der Anteil der potentiellen Pollenspender innerhalb der Plantage ohne Berücksichtigung der Entfernung zum Samenelter und mit der Betrachtung aller möglichen männlichen Haplotypen liegt über alle Saatgutproben hinweg bei 83,61%. Das bedeutet, dass höchstens 16,39% der Samen der Plantagenbäume einen Samenelter außerhalb der Plantage aufweisen könnten.

4. SCHLUSSFOLGERUNG

Es hat sich gezeigt, dass es für die Elternschaftsanalyse besonders wichtig ist, Früchte direkt von den Bäumen, idealerweise mit einem Blatt des jeweiligen Baumes zu ernten. Auf diese Weise steht ein Samenelter zweifelsfrei fest und es können mögliche Fehlerquellen sicher ausgeschlossen werden. Zusätzlich wäre es von großem Vorteil, die blühenden Altbäume des Erntejahres auf der Plantage zu kartieren. Dadurch könnte ggf. die Anzahl der potentiellen Pollenspender wesentlich eingeschränkt und so eine präzisere Schätzung der effektiven Pollenausbreitungsdistanzen ermöglicht werden. Das Vorkommen zahlreicher Hybridformen innerhalb der Gattung *Sorbus* mit den europäischen Arten als auch zwischen den Gattungen (*Sorbus* z.B. mit *Crataegus*, *Malus* und *Pyrus*) erschwert das Eingrenzen der potentiellen Pollenspender (LEINEMANN et al., 2010; LIESEBACH, 2014). Die Ausschlusswahrscheinlichkeit könnte jedoch durch mehr und vor allem hochvariable Mikrosatelliten Genorte deutlich erhöht werden.

Die hier gezeigten Unterschiede in der genetischen Zusammensetzung der Pollenwolken zeigen die Notwendigkeit weiterer Analysen bezogen auf das Verhalten von Insektenbestäubern. Denn unabhängig von dem Pflanzplatz haben die Bestäuber einen enormen Einfluss auf die genetische Zusammensetzung der Samen der Plantage.

Der Hinweis auf eine im Vergleich zur Anzahl der Altbäume geringere effektive Fortpflanzungsgemeinschaft zeigt, dass das Ziel des uneingeschränkten Paarungskontaktes zwischen den Genotypen der Plantagen in dem Untersuchungsjahr nicht realisiert wurde. Die untersuchte Nachkommenschaft ist nicht repräsentativ für die genetische Zusammensetzung der Plantage. Samen aus nur diesem Erntejahr würden zu einer lückenhaften Erhaltung der Genressourcen führen. Aufzeichnungen sowohl über die Blühzeitpunkte der Klone als auch über das Ausmaß der Fruktifikation der einzelnen Bäume über mehrere Jahre hinweg, würden eine langfristige Aussage erlauben.

Ein weiteres Problem stellt der hier zweifelsfrei nachgewiesene Genfluss durch Pollen von der Allee in die Plantage dar. Das Hauptziel einer Erhaltungssamenplantage ist die Sicherung der gefährdeten Genressourcen. Hierbei ist es wichtig, regionale Aspekte zu beachten und nicht Material zusammen zu stellen, welches aus klimatisch sehr unterschiedlichen Gebieten stammt (MÜLLER-STARCK, 2000). Auf der untersuchten Plantage befinden sich unterschiedliche Klone aus Hessen, deren

genetische Information durch das in dieser Untersuchung beobachtete Einkreuzen der Alleebäume aus unbekannter Herkunft gefährdet wird. In diesem Fall könnten lokal nachteilige genetische Informationen auf die Samen der Plantage übertragen werden. Dem entgegen zu setzen ist die Aussage, dass es bei der Baumart Speierling nicht möglich ist, zwischen Vorkommen aus natürlicher Einwanderung und Vorkommen aus Pflanzung mit anschließender Ausbreitung zu unterscheiden (KAUSCH-BLECKEN VON SCHMELING, 1992). Danach gäbe es auch keine eindeutige Herkunftszuweisung für die Klone der Plantage. Der Genfluss, durch Pollen aus der Allee kommend, wäre somit als positiv zu bewerten. Durch die genetische Variation der 77 Genotypen der Allee wird die Genpool-Diversität der Plantagensamen zusätzlich erweitert. Für gestützte Aussagen dieser Art ist jedoch eine großflächige Untersuchung der Speierlinge in ganz Mitteleuropa nötig, um anhand von genetisch geographischen Mustern erkennen zu können, ob eine genetische Differenzierung nach Herkunftsgebieten überhaupt möglich ist. Zudem könnte festgestellt werden, welche der Population ursprünglich aus menschlichen Anpflanzungen stammen. Eine geeignete Methode wäre hier die PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analyse der Chloroplasten DNA, wie sie von NYARI (2010) für den Speierling in Ungarn durchgeführt wurde. Fest steht jedoch die Notwendigkeit von Maßnahmen zur Förderung dieser Baumart, da die natürlichen Vorkommen bundesweit als „bedroht“ einzustufen sind (BLE, 2014).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Genfluss durch Pollen von einer angrenzenden Allee in eine Erhaltungssamenplantage der gefährdeten Baumart Speierling (*Sorbus domestica* L.) konnte mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern der Zellkern-DNA nachgewiesen werden. Durch das Ausschlussprinzip mit vier Mikrosatelliten-Genorten konnte für 13,2% der Samen der Plantage ein eindeutiger Pollenspender identifiziert werden. Die Allee beteiligte sich an den Samen bei gleichzeitigem Ausschluss weiterer Speierlinge in der Landschaft mit mindestens 3,52% und höchstens mit 16,39%. Die Methode erlaubte zusätzlich eine sichere Identifizierung der Klone aller untersuchten Altbäume. Außerdem gelang der Nachweis über die Inhomogenität der Pollenwolken abhängig von dem Pflanzplatz auf der Plantage. Mögliche Erklärungsansätze wären z.B. die Eigenschaft der Pollenausbreitung durch Insekten als Vektoren oder asynchrone Blütenzeitpunkte. Weiterhin wurde die geringe Repräsentativität der Nachkommenschaft für die Erhaltungssamenplantage herausgestellt.

6. SUMMARY

Title of the paper: *Pollen flow into a conservation seed orchard in Sorbus domestica (service tree) estimated with SSR markers.*

Service Tree (*Sorbus domestica* L.) is a very rare forest tree species. The northern limits of its distribution range reach Hesse and Saxony-Anhalt in Germany. Due to the occurrence of often only single individuals in the forests

the risk of a lack of gene flow exists and thus the risk of a loss of genetic diversity. Gene conservation seed orchards provide a good chance to avoid this risk.

The primary goal of the study was to test the pollen contamination from outside of a Service Tree conservation seed orchard with material originating from forests in Hesse. All 224 individuals of a grafted seed orchard representing 49 genotypes, each represented by one to six ramets, and all 83 individuals of an alley in close vicinity were analysed with the aid of four nuclear microsatellite gene markers (nSSRs) (table 1). Additionally 50 seeds of each of seven orchard trees representing five genotypes were analysed. Paternity analysis by exclusion was performed and minimum pollination distances estimated. By comparing the pollen clouds of different ramets of single genotypes, the hypothesis of homogeneity of pollen contributions was tested. Table 2 shows the observed number of alleles for three groups: the seed orchard, its offspring and the alley. The higher number of alleles in the offspring as compared to the seed orchard indicates gene flow from outside into the seed orchard. The Figure 1 shows the differentiation of the distributions of the allele frequencies between the three groups. Figures 2 and 3 demonstrate inhomogeneity of the pollen cloud between different ramets of the same genotype, which are located at different places in the seed orchard, as well as between different genotypes at neighboring places. Possible explanations are differential pollen dispersal by the pollinating insects or asynchronous flowering. Using the four nSSRs a total of 125 multilocus genotypes was detected. All 49 genotypes of the seed orchard were discriminated and only one multilocus genotype occurs in the seed orchard as well as in the alley. Table 3 compares the mean heterozygosity and the gene pool diversity between the investigation units. The offspring shows a reduction in genetic variability. An explanation might be that not all genotypes on the seed orchard had been flowering and the seeds analysed originate only from five different seed trees. By the exclusion principle with four microsatellites gene loci we identify an unambiguous pollen donor for 13.2% of the offspring. The percentage rate of the offspring with an alley father lies between 3.52 and 16.39% when further Service Trees in the landscape are excluded. Figure 4 gives estimates of median minimum pollen dispersal distances for two different seed trees (609-171 and 674-207). A minimum of 16.4% of the seed orchards offspring has a pollen donor from outside the orchard. The maximum of estimated pollen transport distance was 715 m compared to an absolute distance between the two furthest apart adult trees of about 1000 m.

For future studies it is important to combine observations on flowering and fructification with studies on pollen transport distances based on seeds. Limited flowering in the seed orchard might lead to increased introgression from outside and thus to non representativeness of the seeds genetics as compared to the parents' genetics. The appreciation of additional genetic variation contributed by the genotypes of the alley depends very much on information on their origin and on information on the naturally occurring genetic differentiation across

the natural range of Service tree. As both is missing for this study it offers opportunities for future research.

7. RÉSUMÉ

Titre de l'article: *Influence d'une plantation pour conservation de semences du cormier par l'influence génétique de l'environnement.*

L'influence génétique du pollen d'une allée arborée limitrophe dans une plantation à objectif de conservation génétique de l'espèce ligneuse cormier (*Sorbus domestica* L.) a pu être mise en évidence à l'aide de marqueurs micro-satellites de l'ADN du noyau des cellules. Par le principe d'exclusion de quatre loci génétiques de micro-satellites, on a pu identifier un diffuseur extérieur de pollen pour 13,2% des semences. L'allée interférait donc avec les semences par le biais d'autres cormiers situés dans la campagne, fleurissant au même moment, à hauteur de 3,52% au moins et au plus à hauteur de 16,39%. La méthode permet d'aboutir à une identification sûre du clone de tous les vieux arbres étudiés. En outre la preuve fut donnée de l'hétérogénéité des nuages de pollen en fonction de la place du plant dans la plantation. De possibles explications seraient par exemple la diffusion du pollen par les insectes pollinisateurs ou bien des dates de floraison asynchrones. En tout état de cause il a été mis en évidence la faible représentativité de la permanence génétique de cette plantation à vocation de conservation génétique.

8. LITERATUR

- BLE (2014): Tätigkeitsbericht der Bund-Länder-Arbeitsgruppe Forstliche Genressourcen und Forstsaatgutrecht. Berichtszeitraum 2009–2013. pp. 238.
- CHESTER, M., R. S. COWAN, M. F. FAY und C. G. RICH (2007): Parentage of endemic *Sorbus* L. (Rosaceae) species in the British Isles: evidence from plastid DNA. *Botanical Journal of Linnean Society* **154**, S. 291–304.
- DAKIN, E. E. und J. C. AVISE (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, S. 504–509.
- DOW, B. D. und M. V. ASHLEY (1998): High Levels of Gene Flow in Bur Oak Revealed by Paternity Analysis Using Microsatellites. *Journal of Heredity* **89**, S. 62–70.
- FROMM, M. (2001): Reproduktion einer entomophilen Baumart in geringer Populationsdichte – Das Beispiel der Winterlinde (*Tilia cordata* Mill.) – Dissertation der Fakultät für Forstwissenschaft und Waldökologie der Georg-August-Universität Göttingen.
- GREGORIUS, H. R. (1978): The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Mathematical Biosciences* **41**, S. 253–271.
- GILLET, E. M. (1998): GSED-Genetic Structures from Electrophoresis Data. User's Manual. Institut für Forstgenetik, Univ. Göttingen, S. 1–54.
- GILLET, E. M. und H.-R. GREGORIUS (2000): Qualified Testing of Single-Locus Codominant Inheritance Using Single Tree Progenies. *Biometrics* **56**, S. 801–807.
- HOFFMAN, J. I. und W. AMOS (2005): Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* **14**, S. 599–612.
- JONES, A. G. und W. R. ARDREN (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* **12**, S. 2511–2523.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER und T. C. MARSHAL (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, S. 1099–1006.
- KAMM, U., P. ROTACH, F. GUGERLI, M. SIROKY, P. EDWARDS und R. HOLDEREGGER (2009): Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. *Heredity* **103**, S. 476–482.
- KAUSCH-BLECKEN VON SCHMELING, W. (1992): Der Speierling. Goltze Druck.
- KONNERT, M. und M. FROMM (2004): Genetische Variation in kommerziellen Saatgutpartien aus Erntebeständen und Samenplantagen von Winterlinde (*Tilia cordata*) und Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*). *Mitt. aus der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz* **52**, S. 204–212.
- LEINEMANN, L., K. KAHLERT, W. ARENHÖVEL, W. VOTH und B. HOSIUS (2010): Einblicke in genetische Variationsmuster bei der Gattung *Sorbus* in Thüringen. *AFJZ* **9/10**, S. 169–174.
- LIESEBACH, H. (2014): Sexuelle und asexuelle Fortpflanzungsformen in der Gattung *Sorbus* L. (Rosaceae) – ein Review unter besonderer Berücksichtigung der Apomixis. *Mitt. Deutsch. Dendrol. Ges. (MDDG)* **99**, S. 55–66.
- MÜLLER, W. (2002): Ecological Risk Research: GVO freie Bewirtschaftungsgebiete: Konzeption und Analyse von Szenarien und Umsetzungsschritten. Umweltressort des Landes Oberösterreich und des Bundesministeriums für soziale Sicherheit und Generationen.
- MÜLLER-STARCK, G. (2000): Genetische Variation von Speierling und Elsbeere. *Allgemeine Forstzeitschrift AFZ/der Wald*, S. 23–24.
- NELSON-JONES, E. B., D. BRIGGS und A. G. SMITH (2002): The origin of intermediate species of genus *Sorbus*. *Theor. Appl. Genet.* **105**, S. 953–963.
- NYARI, L. (2010): Genetic Variability of Service Tree (*Sorbus domestica* L.) in the Hungarian Middle Mountains – Based on cpDNA Analysis in Two Regions. *Acta Silv. Lign. Hung.*, Vol. **6**, S. 17–32.
- PEAKALL, R. und P. E. SMOUSE (2006): GENALEX: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, S. 288–295.
- PRIMACK, R. B. (1995): Naturschutzbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, S. 37–41.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2007): A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RINGO, J. (2006): Genetik Kompakt. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- ROBERTSON, A., A. C. NEWTON und R. A. ENNOS (2004): Breeding systems and continuing evolution in the endemic *Sorbus taxa* on Arran. *Heredity* **93**, S. 487–495.
- RUDOW, A. (2001): Projekt Förderung seltener Baumarten. Professur Waldbau ETHZ Eidg. Forstdirektion BUWAL.
- SLAVOV, G. T., G. T. HOWE, A. V. GYAUROVA, D. S. BRIKES und W. T. ADAMS (2005): Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Molecular Ecology* **14**, S. 3109–3121.
- WAITS, L. P., G. LUIKART und P. TABERLET (2001): Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* **10**, S. 249–256.