

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 Sameneltern 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

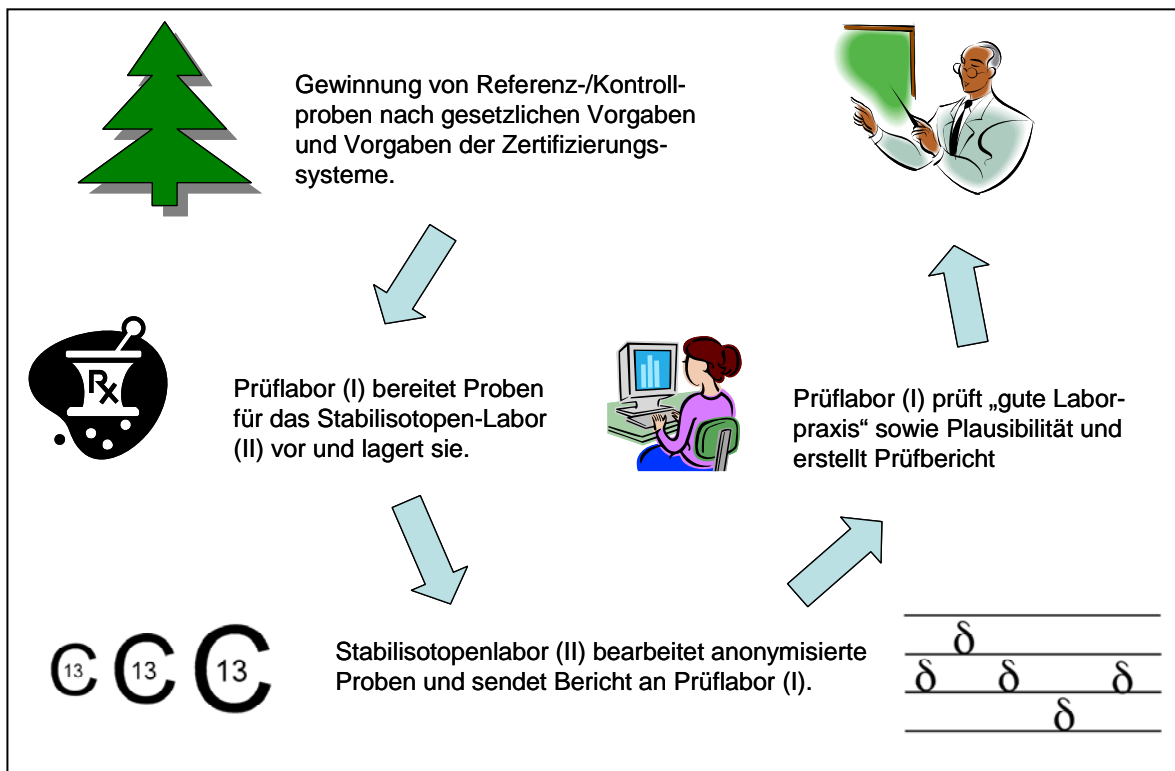


Abb. 1: Einführung der Stabilisotopen-Analytik in die Praxis der Zertifizierung / Kontrolle von forstlichem Vermehrungsgut

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