

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

Karl Gebhardt

## Zusammenfassung

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

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

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

### Abstract

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

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

## 1. Einleitung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Material und Methoden

### Buche

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



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

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

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

### Roterle

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



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

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

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

über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor analysiert, ionisiert und einem Massenspektrometer zugeführt.

Dies führt im Massenspektrometer zu Signalen auf den Massen 44 ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ), 45 ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$ ) und 46 ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ). Aus den Ratios 45/44 für die Probe und dem Arbeitsstandard ( $\text{CO}_2$ -Gas) werden Delta-Werte berechnet, die auf einen internationalen Standard bezogen sind.

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

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

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

### Statistik

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

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

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

## 3. Ergebnisse

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

### Buche

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

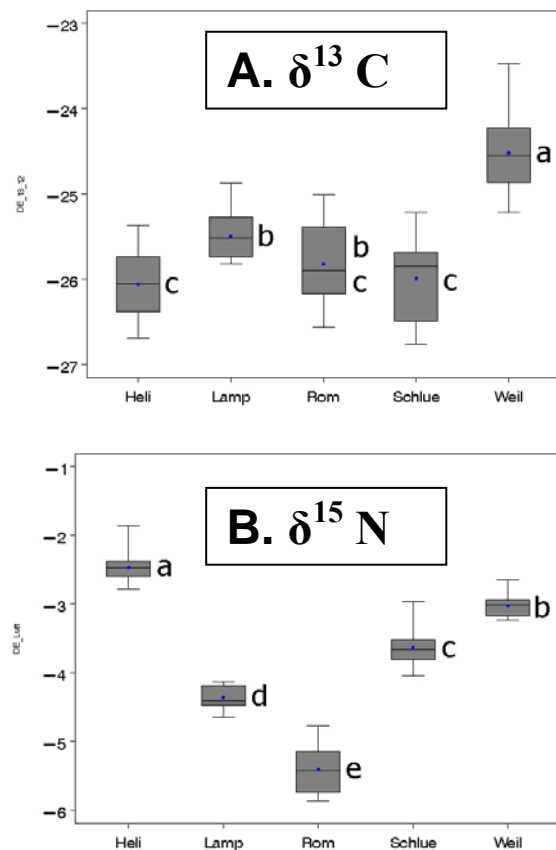


Abb. 3: Unterschiede der Delta-Werte von A. Kohlenstoff ( $\text{DE}_{13/12}$  PDB) und B. Stickstoff ( $\text{DE}_{\text{Luft}}$ ) der 5 Bestandesmittel der gelagerten Saatgutmengen

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

Tabelle 2: Zuordnung (Anzahl / Prozent) der gelagerten 75 Teilmengen aus 5 Buchenbeständen anhand der DE\_29/28-Werte nach Kreuzvalidierung mit quadratischer Distanzfunktion

Table 2: Association (number / percent) of 75 stored seed batches from 5 beech stands using a quadratic discriminant function for cross validation of the delta values of N<sup>15</sup> (DE\_29/28)

Kreuzvalidierungsergebnisse mit 3 Nächste Nachbarn  
 Quadratische Distanzfunktion

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

Posteriori-Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu jeder Herkunft

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

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

Anzahl der Beobachtungen und Prozentwert klassifiziert nach Herkunft

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

Fehlerzählungsschätzwerte für Herkunft

	Heli	Lamp	Rom	Schlue	Weil	Mittel
Rate	0.1333	0.0000	0.0667	0.1333	0.1333	<b>0.0933</b>
Priori	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000	

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

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

DE\_29/28, DE\_13/12, DE\_46/44 und der mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmte Kohlenstoffgehalt (CprzWLD) aus einem Probendurchgang berücksichtigt werden.

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

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

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

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

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

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

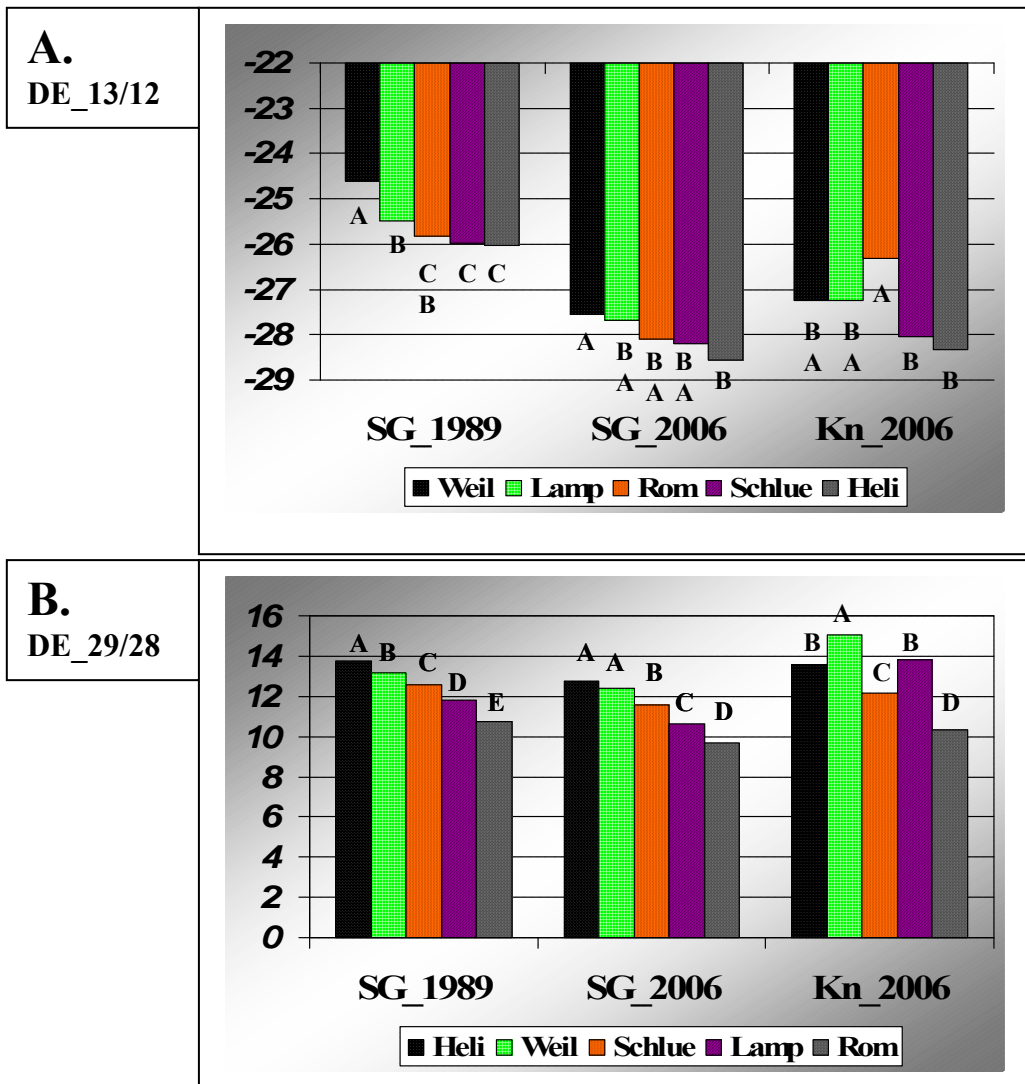


Abb. 4: Mittel der (A) Kohlenstoff- und (B) Stickstoff-Isotopen der Saatgutproben aus 1989 (SG\_1989) sowie der Saatgut- (SG\_2006) und Knospenproben (Kn\_2006) aus dem Reifejahr 2006 von je fünf Buchenbeständen

Fig. 4: Means of the (A) carbon- and (B) nitrogen-isotope values of seedlots harvested in 5 identical beech stands in 1989 and 2006 (SG\_1989; SG\_2006) as well as bud samples from single trees (Kn\_2006)

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

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

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

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

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

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

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

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

Eine Zuordnung der Einzelbäume zum richtigen Bestand (Herkunft) ist mit einer Diskriminanzfunktion sowohl mit den nicht eng korrelierten Analysenwerten (DE\_29/28, DE\_46/44, DE\_13/12, Nprz\_WLD) von Knospen (Tab. 6) als auch mit den Analysenwerten (DE\_29/28, DE\_46/44, DE\_45/44, Nprz\_WLD und Cprz\_WLD) von den auf Netzen unter Einzelbäumen gesammelten Bucheckern (Tab. 7) möglich, bleibt jedoch stärker fehlerbehaftet. Der Fehler belief sich bei

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

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



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

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

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

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

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

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

## Roterle Saatgutvergleich mehrerer Reifejahre

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

und Zuordnung zur Herkunft anhand der Analysenwerte von DE\_29/28, DE\_13/12 sowie der mittels Massenspektrometrie bestimmten Gehalte von Kohlenstoff und Stickstoff (Cprz\_MS und Nprz\_MS) bei einer Fehlerrate von 18,6 % erfolgen. Dabei wurden in 3- bis 5facher Wiederholung die Saatgutpartien von 14 der 28 Herkünfte fehlerlos zugeordnet (Tab. 9).

Tabelle 8: Herkunft der untersuchten Roterlen-Saatgutpartien

Table 8: Origin of the investigated seedlots of black alder

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

Tabelle 9: Fehlerzählungsschätzwerte für 28 Roterlen-Herkünfte (127 Saatgutpartien aus 19 Orten und 16 Reifejahren) anhand der Analysenwerte von DE\_29/28, DE\_13/12, Cprz\_Ms und Nprz\_Ms) nach Kreuzvalidierung mit quadratischer Distanzfunktion (vgl. Tab. 2)

Table 9: Error count estimates of 28 origins of black alder (127 seedlots from 19 places of origin and 16 years of maturity) derived from a cross validation of the analysed data of DE\_29/28, DE\_13/12, Cprz\_MS and Nprz\_MS using a square discriminant function (see Tab. 2)

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

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

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

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

### Saatgut / Knospen / Zapfen

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



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

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

## 4. Anwendung der Stabilisotopen-Methode

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

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

vorhanden ist und somit die Messungen nicht in einer Serie erfolgen können, müssen zum Vergleich solche Variablen genutzt werden, die für einen Laborvergleich geeignet sind. Für die Kohlenstoff- und Stickstoffisotope sind dies der DE\_13/12 PDB- bzw. der DE\_Luft-Wert.

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

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

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

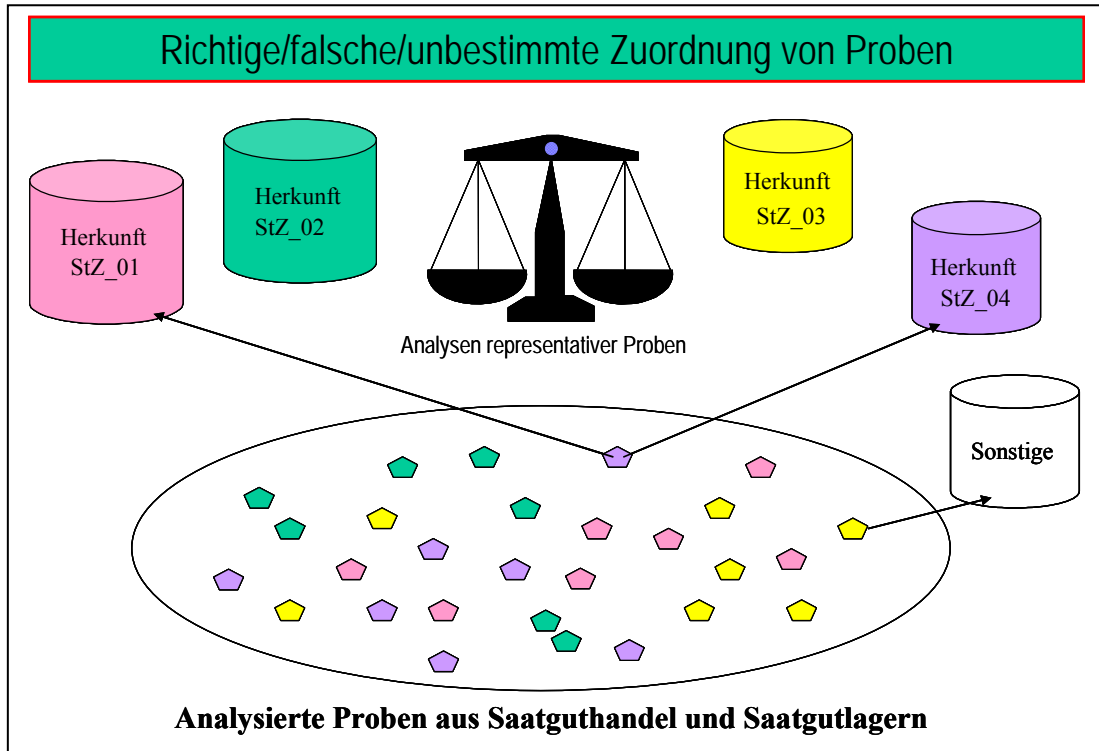


Abb. 6: Schema der Anwendung der Stabilisotopen-Methode für Zertifizierung und Kontrolle

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

Tabelle 11: Klassifizierung von außerhessischen Buchen-Saatgutproben mithilfe einer quadratischen Diskriminanzfunktion der Variablen DE\_13\_12, DE\_Luft, Cprz\_WLD und Nprz\_WLD

Table 11: Classification of nonhessian beech seedlots by use of a square discriminant function (variables: DE\_13\_12, DE\_Luft, Cprz\_WLD and Nprz\_WLD)

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

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

\* Falsch klassifizierte Beobachtung

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

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

## 5. Zusammenfassende Diskussion

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

Unterschiede zwischen Pflanzenarten beruhen z. B. auf unterschiedlicher CO<sub>2</sub>-Fixierung bei C<sub>3</sub>-/C<sub>4</sub>-Pflanzen und Crassulaceen (FARQUHAR et al. 1989), sie können jedoch auch durch den unterschiedlichen Konsum von Gasen aus abgereicherten fossilen Brennstoffen entstehen. Messungen der Kohlenstoff- und Sauerstoffisotope im Phloemsaft von Buchen zeigen, dass die Aktivität der Spaltöffnungen beide Variablen entscheidend beeinflusst (KEITEL et al. 2003). Organ- und gewebespezifische Unterschiede ergeben sich durch unterschiedlichen Gehalt des Langzeit-Kohlenstoffspeichers Fett und durch Zellwandkomponenten wie Lignin und Cellulose (DEINES 1980). Bei dem angewandten Messverfahren (IRMS; isotope ratio mass spectroscopy) kann die Linearität der Messwerte durch Verwendung interner Feststoffstandards

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

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

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

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

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

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

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

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

## Danksagung

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

## Literatur

- BONER, M.; FÖRSTEL, H. (2001): Überprüfung der  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotope im Schaum- und Perlwein. Der Deutsche Weinbau, Heft 15: 18 – 23
- DEINES, P. (1980): The isotopic composition of reduced organic carbon. In P. FRITZ and J.C. FONTES (eds.): Handbook of Environmental Isotope Geochemistry Vol. I: The Terrestrial Environment. Elsevier, Amsterdam, New York: 329-407
- FARQUHAR, G.D., EHLERINGER, J.R.; HUBICK, K.T. (1989): Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40: 503– 537
- FÖRSTEL, H. (2002): Mit Isotopen Fingerabdruck den Lebensmitteln auf der Spur. BioWorld (1): 26-27
- FÖRSTEL, H. (2003): Kontrolle der Herkunft mittels Stabilisotopen. BfN-Skripten 96: 82-91
- FRY, B. (2006): Stable isotope ecology. Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA
- GEBHARDT, K.; GROTEHUSMANN H. (2006): Unterscheidung von Saatgutpartien der Winterlinde mittels Stabilisotopen. In HESSEN-FORST (Hrsg.): Forstliche Genressourcen als Produktionsfaktor. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung vom 20. bis 22. Oktober 2005 in Fulda. Hessen-Forst, Hann. Münden: 153-159
- GEBHARDT, K.; SCHÖNFELDER, E. (2008): Differentiation of seedlots of wild cherry by the analysis of stable isotopes ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Austrian Journal of Forest Science 125: 121-134
- GESSLER, A.; RENNENBERG, H.; ALDINGER, E.; DOUNAVI, A. (2005): Herkunftsbestimmung mit Hilfe von DNA- und Isotopenanalytik., unveröffentlicht
- HAASE, B.; HOSIUS, B.; LEINEMANN, L. (2007): Das FfV-Verfahren stellt sich vor. AFZ-Der Wald (16): 852-853
- SANDER, T.; ROTHE, G.M.; WEISGERBER, H.; JANSSEN, A. (2001): Allelic and genotypic variation of 13 European beech (*Fagus sylvatica* L.) -populations in Hesse, Germany. Forest Genetics 8: 13-24
- SCHNECK, D.; UHLMANN, A. (2007): Hinweise zur Probenahme für die Untersuchung von Forstsaatgut. AFZ-Der Wald (16): 846-847
- KEITEL, C.; ADAMS, M.A.; HOLST, T.; MATZARAKIS, A.; MAYER, H.; RENNENBERG, H.; GEBLER, A. (2003): Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomata conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). Plant, Cell and Environment 26: 1157–1168
- KLIMMEK, A. (2003): Bestimmung des geografischen Ursprungs von Weinen mittels Multi-komponentenanalyse und multivariater Statistik. Diss. TU Berlin
- KONNERT, M. (2006): Erfolge (und Grenzen) bei dem Herkunftsnachweis mittels Isoenzym- und DNA-Analysen. In HESSEN-FORST (Hrsg.): Forstliche Genressourcen als Produktionsfaktor. 26. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung vom 20. bis 22. Oktober 2005 in Fulda. Hessen-Forst, Hann. Münden: 49-58
- KONNERT, M.; BEHM, A. (1999): Genetische Strukturen einer Saatgutpartie –Einflussfaktoren und -möglichkeiten. Beitr. Forstw. u. Landschaftsökol. 33 (4): 152-157

### Anschrift des Autors:

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