

**Fachgebiet Forstgenetik**

**Entwicklung molekulargenetischer Marker bei der Fichte  
(*Picea abies* (L.) Karst) und deren Anwendung für genetische  
Erhebungen in umweltbelasteten Populationen**

**Ricardo Riegel**

Vollständiger Abdruck der von Studienfakultät für Forstwissenschaft und Ressourcenmanagement der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Forstwissenschaft (Dr. rer. silv.)** genehmigten Dissertation.

Prüfer der Dissertation:      1. Prof. Dr. G. Müller-Starck  
   2. Prof. Dr. R. Matyssek

Die Dissertation wurde am 23.04.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Studienfakultät für Forstwissenschaft und Ressourcenmanagement am 16.07.2001 angenommen.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von 1998 bis 2001 im Rahmen des von der DFG getragenen Sonderforschungsbereiches „Wachstum oder Parasitenabwehr?“ (SFB607) im Fachgebiet Forstgenetik der Technischen Universität München in Weihenstephan angefertigt.

Meinen besonderen Dank möchte ich an Prof. Dr. Gerhard Müller-Starck aussprechen, der die Studie anleitete. Die Überlassung eines interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen erlaubten eine erfolgreiche wissenschaftliche Arbeit. Ein weiteres Dankeschön gilt seiner fachlichen Unterstützung sowie den hilfreichen kritischen Kommentaren bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leistete Dr. Roland Schubert mit fachlichem Beistand, wertvollen Anregungen und zahlreichen Verbesserungsvorschlägen bei der Zusammenschrift.

Bei allen Mitarbeitern des Fachgebietes Forstgenetik möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere möchte ich Eliane Röscher für die tatkräftige Hilfe bei den Isoenzym-Analysen sowie für ihre Unterstützung in zahlreichen technischen Aufgaben danken. Ein besonders herzlicher Dank geht an Christiane Bittkau für die stetige Aufmunterung, die guten Ratschläge und die fruchtbare Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. L. Paule und Dr. D. Gömöry von der Technischen Universität Zvolen (Slowakei), Dr. R. Longauer von dem Forschungsinstitut für Forst in Zvolen, Dr. I. Scotti von der Universität Udine (Italien), Dr. H. Wolf von der Sächsischen Landesanstalt für Forsten und Dr. M. Konnert von der Bayrischen Landesanstalt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial, die diese Arbeit bereicherten.

An dich Carina geht das größte Dankeschön, nicht nur wegen den vielen Stunden, die du in der letzten Zeit mit der Korrektur des Manuskriptes verbracht hast, sondern vor allem wegen der Unterstützung und Liebe, die du mir während der ganzen Zeit entgegengebracht hast.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Ökologische und ökonomische Bedeutung der Fichte .....	1
1.2	Neuartige Waldschäden und die Bedeutung genetischer Untersuchungen.....	2
1.3	Entwicklung der genetischen Markeranalyse bei der Fichte.....	4
2	ZIELSETZUNG.....	8
3	MATERIAL UND METHODEN.....	9
3.1	Standortbeschreibung und Auswahlverfahren der Probebäume.....	9
3.1.1	Referenzpopulation Kranzberger Forst.....	10
3.1.2	Fichtenbestand der Region Spiš unter Schwermetall- und SO <sub>2</sub> -Belastung.....	10
3.1.3	Mischklonplantagen im Sächsischen Erzgebirge unter SO <sub>2</sub> -Belastung.....	11
3.1.4	Fichtenbestand des Forstamtes Gunzenhausen unter Streusalzbelastung.....	12
3.1.5	Pilotstudie an Tief- und Hochlagenfichten in Berchtesgaden.....	13
3.2	EST-Markerentwicklung.....	14
3.2.1	DNA Extraktion.....	14
3.2.2	cDNA Sequenzen, Primerkonstruktion und PCR-Amplifikation.....	14
3.2.3	Nachweis von Längenpolymorphismen und Punktmutationen an den PCR-Produkten.....	17
3.2.4	Vererbung der DNA-Marker und Test auf freie Rekombination zwischen den Loci.....	18
3.3	Populationsstudien.....	19
3.3.1	Genetische Marker.....	19
3.3.1.1	Isoenzym-Genmarker.....	19
3.3.1.2	EST-Marker.....	20
3.3.1.3	Chloroplasten-Mikrosatelliten.....	21
3.3.2	Quantifizierung der genetischen Variation und statistische Prüfverfahren....	22

4	ERGEBNISSE.....	25
4.1	Entwicklung polymorpher DNA-Marker.....	25
4.1.1	Primerkonstruktion und PCR-Amplifikation.....	25
4.1.2	Polymorphismen und Vererbung der Markerfragmente.....	26
4.1.3	Überprüfung der Aufspaltung einzelner Loci sowie der Rekombination zwischen den Loci in einer Kreuzungsnachkommenschaft.....	30
4.2	Genetische Variation in der Referenzpopulation Kranzberger Forst.....	32
4.2.1	Quantifizierung genetischer Variation anhand der neu entwickelten DNA-Marker.....	32
4.2.2	Gegenüberstellung von kernkodierten DNA- und Isoenzym- Genmarkern sowie Chloroplasten-Mikrosatelliten.....	34
4.3	Genetische Untersuchungen in stark belasteten Fichtenpopulationen.....	38
4.3.1	Sensitive und tolerante Kollektive gegenüber Schwermetall- und SO <sub>2</sub> -Belastung.....	38
4.3.2	Sensitive und tolerante Kollektive gegenüber SO <sub>2</sub> -Belastung.....	45
4.3.3	Sensitive und tolerante Kollektive gegenüber Streusalzbelastung.....	50
4.4	Pilotstudie an Tief- und Hochlagenfichten in Berchtesgaden.....	59
5	DISKUSSION.....	63
5.1	Entwicklung und Kopplungsanalyse von PCR gestützten DNA-Markern im Kerngenom der Fichte.....	63
5.2	Eignung von Isoenzym-, EST- und cpSSR-Marker für die Beschreibung von genetischer Variation innerhalb von Populationen.....	66
5.3	Genetische Unterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven.....	70
5.3.1	Auswirkungen auf das Kerngenom.....	70
5.3.2	Auswirkungen auf das Chloroplastengenom.....	79
5.4	Pilotstudie an Tief- und Hochlagenfichten.....	84
5.5	Schlussfolgerungen.....	86
6	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY.....	88
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	92

8 ANHANG.....	I
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	I
8.2 Gegenüber SO <sub>2</sub> sensitive und tolerante Fichtenklone im Erzgebirge.....	II
8.3 Nomenklatur der Allele.....	III
8.4 Genetische Diversität.....	IV

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ökologische und ökonomische Bedeutung der Fichte

Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) ist in natürlichen Vorkommen ausschließlich auf der nördlichen Hemisphäre zu finden. Vergesellschaftet mit den Koniferengattungen *Abies*, *Larix* und *Pinus* prägt sie den borealen Nadelwaldgürtel.

Systematisch wird die Fichte in zwei Unterarten unterteilt. Das natürliche Areal der europäischen Varietät (*ssp. abies*) dehnt sich von Mitteleuropa bis zum 69. Breitengrad in Skandinavien aus und reicht weit, bis etwa zum 55. Längengrad, in das kontinentale Nordrußland hinein. Die sogenannte sibirische Varietät (*ssp. obovata*) ist vom westlichen Vorland des Urals bis zur ostasiatischen Küste zu finden (SCHMIDT-VOGT 1977). Den Pollenanalysen zufolge waren die europäischen Fichtenvorkommen während der Eiszeit auf zwei Refugien beschränkt: eines in Westrußland, von wo aus Skandinavien und das Baltikum wiederbesiedelt wurden, und ein weiteres in den südöstlichen europäischen Gebirgsketten, von wo aus die Neubesiedelung Mitteleuropas stattfand (HUNTLEY und BIRKS 1983).

*Picea abies* ist eine Art mit großer ökologischer Amplitude (SCHMIDT-VOGT 1977), was auch durch die variierenden standörtlichen und klimatischen Gegebenheiten ihres riesigen Verbreitungsgebietes belegt wird. Sie gilt als eine überwiegend flachwurzelnde halbschatten-tolerante Art, die empfindlich gegenüber Trockenperioden reagiert, aber nur geringe Nährstoffansprüche stellt. Sie wächst auf gut durchlüfteten sauren bis alkalischen Böden. Ihr Wärmebedarf ist eher gering, sie ist z.B. auf Dauerfrostböden in Nordsibirien wie auch in Höhenlagen von 2200m in den Zentralalpen vorzufinden. Das Optimum der Art liegt in niederschlagsreichen montanen Vegetationszonen Mittel- und Osteuropas.

Durch die intensive Waldbewirtschaftung der letzten 200 Jahre, welche die Fichte wegen ihrer hohen Massenleistungen bevorzugte, hat diese Baumart innerhalb und vor allem außerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebietes einen ständig steigenden Anteil an der Waldfläche erlangt (DENGLER 1980). Mit 2,75 Mio. Hektar nimmt sie in Deutschland einen Anteil von 37,4% der Gesamtwaldfläche ein (Basis: alte Bundesländer; BML 1993). Sie rangiert damit weit vor Kiefer (18,2%), Buche (16,6%) und Eiche (9,7%). Nahezu die Hälfte (45,8%) des in der Bundesrepublik stockenden Holzvorrates stammt aus Fichtenwäldern. Diese Daten bringen klar zum Ausdruck, dass die Fichte zu den ökonomisch und ökologisch wichtigsten Baumarten in Deutschland gehört.

## 1.2 Neuartige Waldschäden und die Bedeutung genetischer Untersuchungen

*Picea abies* ist die ertragreichste Baumart des bundesdeutschen Waldes, zugleich aber bedingt durch die Monokultur die wohl empfindlichste Hauptbaumart, wie Rotfäuleschäden, Insektenkalamitäten sowie Sturm- und Schneebruch-Katastrophen der Vergangenheit zeigen (SCHMIDT-VOGT 1989). Neben den seit langem bekannten natürlichen Schadfaktoren wirken sich in den letzten Jahrzehnten verstärkt anthropogene Stoffeinträge wie beispielsweise Schwefel, Säuren und basische Kationen auf Vitalität und Zuwachsgeschehen unserer Fichtenbestände aus (RÖHLE 1995). Auch wenn die Depositionsraten von Schadstoffen in den letzten Jahren zurückgegangen sind, haben die Auswirkungen solcher Belastungen nicht im gleichen Maße abgenommen. In Deutschland weisen aktuell 25% der Fichtenflächen deutliche Schäden auf, damit liegt das Schadniveau bei Werten, wie sie auch schon Mitte der 80iger Jahre auftraten (BML 2000). Dieses lässt sich zum einen durch die Langzeitwirkung der im Boden festgelegten Stoffeinträge erklären, zum anderen aber auch durch das verstärkte Auftreten anderer Schadstoffe (z.B. Anstieg von Stickstoff- und Ozonbelastung bei gleichzeitigem Rückgang von Schwefelmissionen; RABEN *et al.* 1998; BML 2000). Die atmosphärischen Stoffeinträge sowie die verursachten Schäden sind auf europäischer Ebene wie auch auf Bundes- und Landesebene regional sehr unterschiedlich. Beispielsweise sind die höchsten Sulfateinträge in immissionsexponierten Lagen der Mittelgebirge zu finden (BML 2000). Trotz großer Fortschritte beim Umweltschutz haben Luftverunreinigungen mit eutrophierenden, potenziell toxischen und säurebildenden Eigenschaften nach wie vor großen Einfluss auf den Stoffhaushalt, Vitalität und insbesondere auf die nachhaltige Entwicklung der Fichtenbestände.

Entscheidend für das langfristige Überleben von Populationen in einer mit Schadstoffen belasteten Umwelt ist ihre Fähigkeit, auf diese Veränderungen zu reagieren. Stehen hinter unterschiedlichen Merkmalsausprägungen der Individuen (z.B. sensitiv/tolerant) keine genetischen Unterschiede, so besteht für die Population selbst auch keine Möglichkeit der evolutionären Anpassung an die stressrelevanten Umweltbedingungen (ZIEHE und GREGORIUS 1996). Die genetische Variation ist somit die wichtigste Grundlage, um bei Veränderungen der Umweltbedingungen eine Anpassungsfähigkeit einer Population zu gewährleisten (GREGORIUS 1991). Mit Hilfe von biochemisch-genetischen Markern lässt sich die genetische Variation, welche Hinweise auf Anpassungsprozesse ermöglicht, quantifizieren.

Umweltstress muss hinsichtlich seiner Wirkungen auf die genetischen Strukturen von Populationen als gerichteter Prozess betrachtet werden, der zu einer relativen Bevorzugung bzw. Benachteiligung bestimmter Genotypen führt (genetische Selektion). Genetische Variation kann verloren gehen, wenn Populationen so stark dezimiert werden, dass die Restpopulationen aufgrund zufallsmäßig bedingter Verluste (genetische Drift) nicht mehr alle genetischen Typen enthält. Ferner kann eine Verringerung der Populationsgröße wegen der

geringeren Anzahl reproduktionsfähiger Individuen zu einem Anstieg der Inzucht führen (DEGEN und SCHOLZ 1998; MÜLLER-STARCK und SCHUBERT 2000). Am deutlichsten werden Selektionsprozesse an Populationen, die unter extrem starken Umweltstress stehen.

Ökologisch-genetische Forschungsarbeiten zur Wirkung von Luftverunreinigung auf Wälder belegen Phänomene wie Viabilitätsselektion (BERGMAN und SCHOLZ 1985; MÜLLER-STARCK 1993; STARKE *et al.* 1996), Fertilitätsselektion (VENNE *et al.* 1989), genetische Drift (ZIEGENHAGEN *et al.* 1995) und Mutationen (BAKHTIYAROVA *et al.* 1995).

Die Ziele ökologisch-genetischer Waldschadensforschungen sind zum einem die Erfassung genetisch bedingter, unterschiedlicher Merkmalsausprägungen (sensitiv/tolerant) auf individueller Ebene und zum anderen die Veränderungen des Allelbestandes auf Populationsebene. Spezifische Hinweise auf mögliche Veränderungen der genetischen Struktur von Fichtenpopulationen bzw. Fichtenkollektiven durch anthropogene Schadstoffe mit Hilfe genetischer Erhebungen sind in den in *Tabelle 1.2-1* aufgelisteten Arbeiten zu finden. Sieht man von einer Untersuchung ab (SCOTTI *et al.* 1998a), basieren alle bisher durchgeführten Studien auf 8 bis 14 Isoenzym-Genloci. Die zum Teil geringe Anzahl untersuchter Isoenzym-Genmarker und die Tatsache, dass die meisten untersuchten Enzyme an der Regulation des Zitronensäurezyklus beteiligt sind, kann dazu führen, dass weite Bereiche des Kerngenoms in den bisherigen ökologisch-genetischen Studien nicht erfasst wurden bzw. unterrepräsentiert sind.

Tab. 1.2-1 Mit genetischen Markern durchgeführte Untersuchungen in umweltbelasteten Fichtenpopulationen. Verändert nach MÜLLER-STARCK (1994) und GEBUREK (2000).

Stressor, Versuchsmaterial	Heterozygotie	Vielfalt oder Diversität	Referenz
komplexe Freilandbelastung; 2 Bestände; Vergleich toleranter vs. sensibler Fichten	höher in den toleranten Kollektiven; 31% vs. 25%	Allele pro Locus: 2,33 vs. 2,22 Diversität: 1,31 vs. 1,34;	BERGMANN und SCHOLZ (1987)
komplexe Freilandbelastung in 4 Beständen + Fumigation von Klonen mit O <sub>3</sub> , SO <sub>2</sub> und HF; Vergleich toleranter vs. sensibler Fichten	höher in den toleranten Kollektiven; 31% vs. 27%	keine Angaben	BERGMANN und SCHOLZ (1989)
komplexe Freilandbelastung; 24 Dauerbeobachtungsflächen; Vergleich toleranter vs. sensibler Fichten	keine Unterschiede	keine Unterschiede	LÖCHELT (1994)
komplexe Freilandbelastung; 3 Bestände; Vergleich toleranter vs. sensibler Fichten	höher in den toleranten Kollektiven; 14% vs. 12%	Allele pro Locus: 2,4 vs. 2,3	RADDI <i>et al.</i> (1994)
komplexe Freilandbelastung, hauptsächlich SO <sub>2</sub> und NO <sub>x</sub> ; 1 Bestand; Vergleich toleranter vs. sensibler Fichten	höher in den toleranten Kollektiven; 26% vs. 19%	Allele pro Locus: keine Unterschiede	PRUS-GŁOWACKI und GODZIK (1995)
Zink und Blei; Vergleich des Ausgangsmaterials mit dem überlebenden Kollektiv	etwas höher in dem überlebenden Kollektiv	keine Angaben	BERGMANN und HOSIUS (1996)
komplexe Freilandbelastung; 2 Bestände; Vergleich zwischen unterschiedlich belasteten Beständen	keine Angaben	Diversität: geringer in der belasteten Population	SCOTTI <i>et al.</i> (1998a)



### 1.3 Entwicklung der genetischen Markeranalyse bei der Fichte

Unter dem Begriff genetische Marker werden Merkmale verstanden, die indirekt auf Phänotypebene (z.B. exprimierte Enzyme) oder direkt auf DNA-Ebene Auskunft über die genotypische Struktur an einzelnen Genorten liefern. Solche Marker erfassen sowohl das Kerngenom als auch die Organellengenome.

Genetische Marker können in drei Gruppen eingeteilt werden: morphologische-, biochemische- und DNA-Marker. Die Anzahl vorhandener morphologischer Marker ist sehr begrenzt. Erst die Etablierung biochemischer Isoenzym-Genmarker zu Beginn der 70iger Jahre (BARTELS 1971; BERGMANN 1971) ermöglichte eine Vielzahl genetischer Studien in Waldpopulationen (Übersicht in PAULE 1992). Isoenzyme sind verschiedene Formen eines Enzyms mit gleicher Funktion aber Unterschieden in der Primärstruktur. Diese können mit Hilfe der Elektrophorese identifiziert werden. Der größte Nachteil dieser genetischen Marker ist jedoch ihre begrenzte Anzahl, denn je nach Baumart stehen nur 20 bis 30 Loci zur Verfügung (GLAUBITZ und MORAN 2000). Das außerordentlich große Genom der Fichte ( $3-4 \times 10^{10}$  Basenpaare; GOVINDARAJU und CULLIS 1991) kann mit Isoenzym-Genmarkern deshalb nicht repräsentativ untersucht werden.

Seit Mitte der 80iger Jahre erlaubt die Entwicklung rekombinanter DNA-Techniken, genetische Unterschiede direkt auf Nukleinsäureebene nachzuweisen. Mit Hilfe dieser Methoden lässt sich eine unbegrenzte Anzahl molekularer DNA-Marker etablieren. Weitere Vorteile der DNA-Marker gegenüber den Isoenzym-Genmarkern ergeben sich durch die Eigenschaften der DNA-Moleküle selbst: sie sind in jeder Zelle, in jedem ontogenetischen Stadium eines Organismus vorzufinden und zeigen so große Stabilität, dass Sequenzen auch noch mehrere Jahrtausende intakt erhalten bleiben können (CANO *et al.* 1993). Die heutzutage weit verbreitete Untersuchung von DNA-Markern basiert auf der von MULLIS und FALOONA (1987) entwickelten Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie ist eine ausgesprochen effiziente Methode, die es selektiv ermöglicht, spezifische Zielsequenzen aus einem heterogenen DNA-Gemisch *in vitro* zu amplifizieren. Mehrere PCR-gestützte Markertechniken sind inzwischen beschrieben worden (Übersicht in KARP *et al.* 1998; BERGMANN und LEINEMANN 2000; SUNNUCKS 2000; GLAUBITZ und MORAN 2000). Sie unterscheiden sich nicht nur in dem nötigen experimentellen Aufwand, sondern auch im Ausmaß der beobachteten Variation und der Art des Weitergabe- und des Wirkungsmoduses. Die wichtigsten Eigenschaften sowie Vor- und Nachteile der heute verwendeten genetischen Markertypen sind in *Tabelle 1.3-1* zusammengefasst.

Tab. 1.3-1 Eigenschaften verschiedener genetischer Marker und ihre Eignung für populationsgenetische Untersuchungen. Verändert nach BERGMANN und LEINEMANN (2000) sowie GLAUBITZ und MORAN (2000); +++ sehr gut; ++ gut; + ausreichend; - nicht geeignet.

	Isoenzyme	Amplifizierte Gensequenzen (STS-, EST-Marker)	RAPDs AFLPs	Mikrosatelliten (SSR)	Chloroplasten- Mikrosatelliten (cpSSR)
<b>Eigenschaften</b>					
Anzahl Loci pro Reaktion	1-3 oder mehr	1 oder mehr	5-80	1 oder mehr	1
Vererbung	kodominant	kodominant	dominant	kodominant	uniparental
Variabilität	niedrig-mittel	niedrig-mittel	hoch	sehr hoch	mittel
Genexpression	Unterschiede zwischen Allelen möglich	Unterschiede zwischen Allelen möglich	unbekannt	nicht codierend	nicht codierend
Entwicklungsaufwand	niedrig	sehr hoch	niedrig	sehr hoch	hoch
<b>Eignung</b>					
Genetische Diversität	+	+	++	+++	+
Populations- differenzierung	+	+	++	++	++
Genotypische Struktur, Heterozygotie	++	++	-	++	-
Adaptive Variation	+	++	-	-	+

PCR-gestützte Techniken wie RAPD-Marker, die Variation an zufallsmäßig amplifizierten DNA-Fragmenten beschreiben und AFLP-Marker, die Polymorphismen an Restriktionsfragmenten identifizieren, lassen sich schnell etablieren, da keine weiteren Vorkenntnisse über das Genom des zu untersuchenden Organismus notwendig sind. Bei der Fichte wurden solche Techniken bereits für spezifische Fragestellungen wie Individuen-Identifizierung (SCHEEPERS *et al.* 1997) und Genkartierung (BINELLI und BUCCI 1994; BUCCI *et al.* 1997; PAGLIA *et al.* 1998) eingesetzt. Ihre dominante Vererbung (d.h. nur ein Allel eines Locus ist identifizierbar) und die Schwierigkeit, homologe Varianten zwischen Individuen zu identifizieren, machen diese DNA-Marker für die Quantifizierung genetischer Variation in Populationen aber eher ungeeignet.

Nur selten sind mit den bisher für die Fichte entwickelten DNA-Markern Populationsstudien durchgeführt worden. Bisher wurden nur italienische Fichtenpopulationen mit dominant vererbten RAPD-Markern oder aus ihnen erzeugten SCAR-Markern (BUCCI und MENOZZI 1995, SCOTTI *et al.* 2000) sowie österreichische Fichtenpopulationen mit kodominant vererbten Mikrosatelliten (GEBUREK *et al.* 1998) genetisch charakterisiert.

Mikrosatelliten-Marker (SSRs), bei denen die Anzahl kurzer repetitiver Sequenzmotive der DNA identifiziert werden, zählen zu den verbreitetsten DNA-Markern der letzten Jahre. Sie gehören wegen ihrer hohen Variabilität und kodominanten Vererbung (d.h. beide Allele eines Locus sind identifizierbar) zu den effizientesten Markertypen (POWELL *et al.* 1996). Dennoch

ist die Entwicklung und Anwendung von anonymen Mikrosatelliten-Markern in Koniferen begrenzt. Das große Genom und das hohe Vorkommen repetitiver DNA-Sequenzen führt häufig dazu, dass Mikrosatelliten-Marker Produkte an mehreren nicht homologen Loci amplifizieren, deren anschließende Auswertung sehr komplex ist (ECHT *et al.* 1996; SORANZO *et al.* 1998). Hinzu kommt, dass anonyme Mikrosatelliten- wie auch RAPD- und AFLP-Marker nur eine gewisse Indikatorfunktion für populationsgenetische Prozesse haben können, da ihre Varianten nicht direkt an der Umweltanpassung beteiligt sind (BERGMANN und LEINEMANN 2000). Diese Indikatorfunktion wird auch in Frage gestellt, weil bei großen Genomen, wie dem der Fichte, anonyme Marker oft weit entfernt von exprimierten DNA-Regionen liegen und somit von Evolutionsprozessen (z. B. Selektion) nicht betroffen sind (SCOTTI *et al.* 2000).

Als Alternative bietet sich die Entwicklung PCR-gestützter Marker auf der Grundlage exprimierter DNA-Sequenzen (EST-Marker; expressed sequences tags) an. Hierbei können Insertionen oder Deletionen direkt nach der PCR als Längenvarianten nachgewiesen werden. Darüber hinaus können mit einem Restriktionsverdau der PCR-Produkte auch Punktmutationen ersichtlich werden (PERRY und BOUSQUET 1998; TSUMURA *et al.* 1997). Bedingt durch den hohen Entwicklungsaufwand ist für die Fichte zur Zeit nur eine begrenzte Anzahl solcher spezifischer DNA-Marker bekannt.

In den letzten Jahren stieg das Interesse, exprimierte Gensequenzen anstatt anonymer Sequenzen als Marker in Genkarten einzubauen (GILPIN *et al.* 1997; CATO *et al.* 2001). Das hat mehrere Gründe. Erstens, wenn ein EST-Marker mit einem bestimmten phänotypischen Merkmal assoziiert werden kann, ist es möglich, dass das Gen selbst auf diese Eigenschaft einen Einfluss hat. Zweitens können Gene, die nur in bestimmten Organen oder unter bestimmten Umweltbedingungen exprimiert werden, gezielt kartiert werden (CATO *et al.* 2001). Drittens erlauben es EST-Marker, Homologien zwischen verwandten Arten zu erkennen (TSUMURA *et al.* 1997; PERRY *et al.* 1999), was besonders beim Vergleich von QTLs (quantitative trait loci) von Interesse ist. Die Verfügbarkeit einer genetischen Kopplungskarte ist sowohl für populationsbiologische Studien wie auch für Evolutionsstudien (Selektion) von großer Bedeutung. Für den ersten Fall können gezielt ungekoppelte Marker, die das komplette Genom repräsentieren, ausgewählt werden und im zweiten Fall können anhand der Karte die genomischen Regionen identifiziert werden, die in Selektionsprozessen involviert sind (BINELLI und BUCCI 1994).

Im Gegensatz zum rekombinierenden, biparental vererbten Kerngenom werden Organellen in der Regel uniparental vererbt. Bedingt durch ihren Vererbungsmodus agiert das haploide Genom des Organells als eine einzige Vererbungseinheit, ohne dass eine neue Rekombinationsmöglichkeit besteht (BURG *et al.* 1998). Bei *Picea* werden die Mitochondrien maternal, d.h. über den Samen und die Chloroplasten paternal, folglich über den Pollen an die Nachkommen weitergegeben (STINE *et al.* 1989; SUTTON *et al.* 1991; SPERISSEN *et al.* 1999). Mit Ausnahme sogenannter „hotspots“, in denen repetitive DNA-Sequenzen vorkommen, ist das Chloroplastengenom über nahezu alle Pflanzenarten hinweg sehr konservativ

(HIPKINS *et al.* 1995; PROVAN *et al.* 2001). Wegen dieser Eigenschaften wurde das Chloroplastengenom in den letzten Jahren für die Entwicklung universeller, d.h. über Gattungs- oder Familienniveau hinweg nutzbarer PCR-gestützter Marker verwendet. Beispielsweise ermöglichte die Entwicklung konservativer Primer für variable Mikrosatellitensequenzen in *Pinus thunbergii* (VENDRAMIN *et al.* 1996) den Einsatz PCR-gestützter Marker in zahlreichen genetischen Studien anderer Koniferenarten oder Gattungen wie *Pinus* (MORGANTE *et al.* 1998; ECHT *et al.* 1998), *Abies* (VENDRAMIN und ZIEGENHAGEN 1997; ZIEGENHAGEN *et al.* 1998; VENDRAMIN *et al.* 1999) und *Picea* (VENDRAMIN *et al.* 2000). In diesen Arbeiten wurden Chloroplasten-Mikrosatelliten zur Analyse von Populationsdifferenzierungen, zur Untersuchung nacheiszeitlicher Rückwanderungen wie auch für Vaterschaftsanalysen eingesetzt. Dabei wurde die hohe Variabilität dieser Marker und ihre Eignung zur Beschreibung genetischer Variation belegt.

Studien an Fichtenpopulationen mit maternal vererbten Mitochondrien-Markern zeichnen die gute Eignung solcher Marker zur großräumigen Differenzierung von Populationen des gesamten Verbreitungsgebietes aus (SPERISEN *et al.* 2001). Dennoch liegt die genetische Variation, die innerhalb von Fichtenpopulationen mit ihnen nachgewiesen werden kann, weit unter den Möglichkeiten, die Chloroplasten-Mikrosatelliten bieten.

## 2 ZIELSETZUNG

Die experimentellen Ziele der vorliegenden Untersuchungen lassen sich in zwei Arbeitsschwerpunkte gliedern:

Der erste Schwerpunkt umfasst die Entwicklung von locusspezifischen, kodominant vererbten DNA-Markern für das Kerngenom der Fichte. Damit soll für diese wichtige Baumart das vorhandene Spektrum um an Genen gekoppelte Marker erweitert werden. Den Ausgangspunkt bilden bekannte Gensequenzen aus einer unter Pathogenstress induzierten cDNA-Klonbank der Fichte. Die Eignung der neu entwickelten DNA-Marker zur Beschreibung genetischer Variation soll innerhalb einer Referenzpopulation getestet und mit Isoenzym-Genmarkern verglichen werden.

Als zweiter Schwerpunkt steht die Anwendung molekularer Marker zum Nachweis der Auswirkungen von extremen Umweltstress auf die genetische Zusammensetzung von Freilandpopulationen der Fichte im Mittelpunkt. Die genetischen Inventuren mittels Isoenzym-Genmarkern, DNA-Markern und Chloroplasten-Mikrosatelliten in Fichtenkollektiven aus drei umweltbelasteten Standorten sowie eine Pilotstudie an Fichtenpopulationen der Tief- und Hochlagen sollen folgende Fragen beantworten:

- Sind Selektionsereignisse im Kerngenom mit EST-Markern nachweisbar? Wenn ja, sind sie mit EST- und Isoenzym-Markern gleichermaßen zu erfassen?
- Beeinflussen verschiedene Umweltbedingungen Selektionsereignisse in den gleichen oder in unterschiedlichen Genombereichen?
- Unterliegt das Chloroplastengenom einem nachweisbaren Selektionsdruck durch Umweltstress?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Standortbeschreibung und Auswahlverfahren der Probebäume

Insgesamt wurden an vier deutschen und einem slowakischen Standort genetische Untersuchungen an Fichtenpopulationen (*Picea abies* (L.) Karst.) durchgeführt. Deren geographische Lage ist in *Abbildung 3.1-1* ersichtlich.

Die Population Kranzberger Forst wurde als Referenzpopulation bei der Entwicklung von EST-Markern eingesetzt. Die weiteren vier Standorte sind oder waren außerordentlichem abiotischem Umweltstress ausgesetzt. Hier richtet sich die genetische Untersuchung auf Kollektive von Individuen, die sich bezüglich ihrer phänotypischen Antwort auf den Stressfaktor extrem unterscheiden.

Im Folgenden werden die einzelnen Standorte beschrieben. Dabei wird besonders auf die vorhandene Umweltbelastung und Auswahlverfahren der Probebäume eingegangen.



Abb. 3.1-1 Geographischer Überblick der Standorte, in denen genetische Untersuchungen an Fichtenpopulationen durchgeführt wurden, einschließlich Probenauswahlverfahren und Belastungssituation (n = Anzahl untersuchter Bäume).

### **3.1.1 Referenzpopulation Kranzberger Forst**

Es handelt sich um eine Dauerbeobachtungsfläche der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN in unmittelbarer Nähe von Freising (Bayern, 490m ü. NN). Bei dem Vorbestand dieser Fläche handelte es sich um einen Fichtenbestand, der in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts gepflanzt worden war. Aus ihm hat sich der heute ca. 50 Jahre alte Fichten/Buchen-Mischbestand durch natürliche Verjüngung entwickelt (PRETZSCH *et al.* 1998). Aus dem ca. 0,5 ha umfassenden Bestand wurde aus der Grundgesamtheit der Fichten ein Kollektiv von 100 zufallsmäßig ausgewählten Individuen beprobt. Für die Laboruntersuchungen wurden Knospen der einzelnen Fichten im November 1998 gesammelt und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.1.2 Fichtenbestand der Region Spiš unter Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung**

Die Spiš Region, vornehmlich das Tal des Flusses Hnilec, gehört zu den ältesten Industriegebieten der Slowakei. Eisenerze werden hier schon seit dem 14. Jahrhundert verhüttet (CAMBEL 1986). Im 18. Jahrhundert kamen Kupfer und Zink hinzu.

Wegen der Verwendung veralteter Schmelz- und Verarbeitungstechniken sowie der Benutzung arsenreicher Braunkohle als Energieträger, gehören insbesondere die Produktionsstätten Krompachy und Rudnany zu den hauptsächlichen Umweltverschmutzern der Region. Darüber hinaus besteht eine zusätzliche Umweltbelastung durch den intensiven Eintrag SO<sub>2</sub>-belasteter Luftmassen aus anderen Industriegebieten (Ostrava und Katowice). Im Zusammenhang mit der Umweltbelastungssituation berichtet MANKOVSKÁ (2000) über hohe Mengen an Arsen, Quecksilber, Kupfer und Schwefel in der Biomasse der lokalen Wälder.

Die Fichte stellt mit einem Anteil von 60% die Hauptbaumart der Region dar. Einer Studie zufolge (BUCHA *et al.* 2000) beträgt der mittlere Nadelverlust an Fichten in der Spiš Region 32,6% und liegt damit weit über dem slowakischen Durchschnitt von 21,6%.

Unter den zuvor beschriebenen Belastungen des Hnilec Tales treten in einigen Waldbeständen Bäume auf, die starke Schadsymptome zeigen und in unmittelbarer Nähe befinden sich andere Individuen, die einen noch sehr vitalen Eindruck machen (*vgl. Abb. 3.1-2*). Für die genetischen Untersuchungen an derartigen sensitiven und toleranten Fichten wurden zwei benachbarte Fichten/Tannen-Mischbestände (Fichten im Alter von ca. 80 Jahren) in der Nähe des Dorfes Noveská Huta ( $48^{\circ} 53' \text{ N}$ ,  $20^{\circ} 32' \text{ E}$ ) ausgewählt. Bedingt durch die topographischen Verhältnisse unterscheiden sich die beprobten Flächen bezüglich ihrer Schadintensität. Ein Bestand (als Fläche A bezeichnet) breitet sich im oberen Bereich eines Berghanges aus und ist somit direkt der Luftverschmutzung ausgesetzt. Entsprechend sind die Schäden auf der Versuchsfläche A sehr intensiv und fortgeschritten. Der zweite Bestand (als Fläche B bezeichnet) liegt auf einem gegenüberliegenden Berg in einer geschützten Tallage. Die Versuchsfläche B ist daher weniger vom Schadgeschehen betroffen als Fläche A.

Die Probestämme wurden in beiden Flächen anhand der Paarmethode (GREGORIUS 1989) ausgewählt. Dabei wurden in jedem Bestand jeweils Paare räumlich benachbarter Bäume mit

gleicher soziologischen Stellung, aber unterschiedlicher phänotypischer Merkmalsausprägung bezüglich der Schadsymptome ausgewählt. Der Schadintensität entsprechend wurden die Individuen zum Kollektiv der toleranten sowie dem Kollektiv der sensitiven Fichten zusammengefasst. Für die Kollektive der toleranten Individuen wurden Fichten ausgewählt, die grüne, dichte Kronen besaßen. Hingegen wurden Fichten, die ein geringes Wachstum in den letzten 10 Jahren aufwiesen sowie unter starkem Nadelverlust bzw. Nadelvergilbung litten, als kranke Individuen eingestuft und zum Kollektiv der sensitiven Bäume zusammengefasst. Bei der Auswahl erkrankter Fichten wurde darauf geachtet, dass an den Bäumen keinerlei Anzeichen von Borkenkäferfraß, Pilzbefall oder mechanische Schäden auftraten, um andere Faktoren als die Luft- und Bodenverschmutzung als Ursachen des Schadbildes auszuschließen. In den Wintermonaten der Jahre 98/99 und 99/00 wurden sowohl auf der stark geschädigten Fläche A, wie auch auf der Fläche B jeweils 26 Fichtenpaare ausgewiesen und Knospenproben von ihnen isoliert (PAULE *et al.* 2001; LONGAUER *et al.* 2001).



Abb. 3.1-2 Beispiel für das Nebeneinander von deutlich geschädigten und vitalen Fichten in der mit Schwermetall und SO<sub>2</sub> belasteten Region Spiš.

### **3.1.3 Mischklonplantagen im Sächsischen Erzgebirge unter SO<sub>2</sub>-Belastung**

Seit den 50er Jahren traten in den Hoch- und Kammlagen des Erzgebirges sowie in exponierten Lagen des Elbsandsteingebirges und des Zittauer Gebirges Schäden mit unterschiedlicher Intensität und Verbreitung an Fichtenbeständen auf, die durch SO<sub>2</sub>-Immisionen aus Braunkohlekraftwerken im Böhmischem Becken verursacht wurden (LIEBOLD und DRECHSLER 1991; RABEN *et al.* 1996).

Bereits in den 70er Jahren war man deshalb auf dem Gebiet der ehemaligen DDR bemüht, eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit bei der Fichte gegenüber SO<sub>2</sub> mittels züchterischen Maßnahmen zu erreichen. Erste Schritte wurden mit der Auswahl vitaler Fichten in den extrem immisionsbelasteten Standorten des sächsischen und tschechischen Erzgebirges, des Elbsandsteingebirges, des Zittauer Gebirges und des polnischen Iser- Riesgebirges eingeleitet, wobei ca. 1500 feldresistente Fichten im Alter von 15 bis 110 Jahren ausgelesen worden sind (TZSCHACKSCH 1983, nach WOLF 1998). Die toleranten Bäume wurden autovegetativ vermehrt, um eine Fichten-Mehrklonsorte mit erhöhter SO<sub>2</sub>-Widerstandsfähigkeit



zusammenzustellen. Zwischen 1986 und 1990 wurden 13 Versuchsflächen mit Klonen feldresistenter Fichten bepflanzt, um sie hinsichtlich ihrer Wuchseigenschaften zu prüfen (WOLF 1998).

Im Winter 1995/96 traten auf den Versuchsflächen Altenberg und Bärenfels durch lang anhaltenden Zustrom SO<sub>2</sub>-belasteter Luftmassen aus dem Böhmischem Becken sehr hohe Schadstoffimmissionen auf (RABEN *et al.* 1996), wobei einzelne Fichtenklone rötliche Verfärbungen und Nadelverluste aufwiesen. Im Spätsommer 1996 wurde der Nadelverlust bonitiert, unter Erhebung folgender Schadklassen: 4 = 0-25% Nadelverlust; 3 = 26-50% Nadelverlust; 2 = 51-75% Nadelverlust; 1 = 76-100% Nadelverlust (WOLF 1998).

Für die genetischen Untersuchungen wurde anhand der Nadelverlustbonitur aus der Gesamtheit der bewerteten Klone (n = 119 in Altenberg; n = 141 in Bärenfels) für jede Versuchsfläche zwei Subpopulationen gebildet, die jeweils die 24 vitalsten und die 24 am meisten geschädigten Bäume zusammenfassen (detaillierte Ausführungen zu den untersuchten Klonen sind im *Anhang 8.2* zu finden).

### **3.1.4 Fichtenbestand des Forstamtes Gunzenhausen unter Streusalzbelastung**

Das Untersuchungsgebiet liegt im Mönichswald (Bayern) unmittelbar an der Bundesstraße 13, die die Stadt Gunzenhausen mit Ansbach verbindet. Im Standort ist ein sogenannter Zweischichtboden anzutreffen, d. h. unter einer mehrere Dezimeter starken Sandauflage befindet sich eine Tonschicht unterschiedlicher Mächtigkeit. Für das Grundwasser hat die Sandschicht im wassergesättigten Zustand Leitungsfunktion, die Tonschicht Staufunktion. Die Besonderheit des Untersuchungsgebietes liegt in seinem von Ost nach West fallenden Gelände und dem oberflächennahen Grundwasserkörper. Diese geologische Situation bedingt das Ausstreichen des Grundwassers in den Fichten- und Kiefernbeständen im westlichen Teil des Gebietes. Das Ausbringen von Streusalz auf der Bundesstraße 13 begann seit Anfang der 70er Jahre und wird bis heute fortgesetzt, wobei Grundwasseruntersuchungen im Jahre 1984 eine hohe Chloridbelastung offenbarten (244mg/l Cl<sup>-</sup>; SCHÖMIG 1988). Die Belastung wird besonders deutlich, wenn man zum Vergleich Chloridwerte von Quellwasser aus der Umgebung von Gunzenhausen heranzieht (3,6-36,5mg/l Cl<sup>-</sup>; SCHÖMIG 1988). Neuere Untersuchungen des WASSERWIRTSCHAFTSAMTES ANSBACH bestätigen eine stets anhaltende Belastung mit Streusalz, im späten Winter 1999 konnten im Grundwasser des Untersuchungsgebietes Chloridkonzentrationen von 123 bis 145mg/l festgestellt werden.

Die untersuchten Fichtenbestände befinden sich auf oder im unmittelbaren Umgriff einer bereits 1986/1987 vom LEHRSTUHL FÜR WALDWACHSTUMSKUNDE DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN eingerichteten, vielparzelligen Versuchsfläche (SCHÖMIG 1988), die unter waldwachstumskundlicher Dauerbeobachtung steht und seit dem Jahr 2000 Gegenstand eines interdisziplinären Forschungsvorhaben ist (BACHMANN *et al.* in Vorbereitung). In diesen Fichtenbeständen ist das phänotypische Schadbild aufgrund der Streusalzbelastung sehr heterogen. Während einige Bäume rötliche Nadelverfärbung zeigen

und bereits beim Absterben sind, befinden sich in räumlicher Nähe vitale Individuen, bei denen keine Schadsymptome zu erkennen sind. *Abbildung 3.1-3* dokumentiert diese Situation.

Die genetische Analyse der sensitiven und toleranten Fichten wurde an zwei benachbarten Beständen im Alter von 30 bzw. 10 Jahren durchgeführt (Fläche ANA bzw. Fläche ANB). Ende des Winters 2000 wurde unter Anwendung der Paarmethode (GREGORIUS 1989, *vgl. Kap. 3.1.2*) auf jeder der ca. 0,25 ha großen Versuchsfelder 35 Paare sensitiver und toleranter Fichten ausgewählt und Knospenproben gesammelt. In der Fläche ANA wurde darüber hinaus an 10 Individuen (5 sensitive und 5 tolerante) Nadelproben entnommen, die an der BAYERISCHEN LANDESANSTALT FÜR WALD UND FORSTWIRTSCHAFT - SACHGEBIET II, hinsichtlich ihres Chloridgehaltes analysiert wurden. Die restlichen sensitiven und toleranten Individuen beider Flächen wurden jeweils zu Nadelgesamtproben vereint und bezüglich des Chloridgehaltes untersucht.

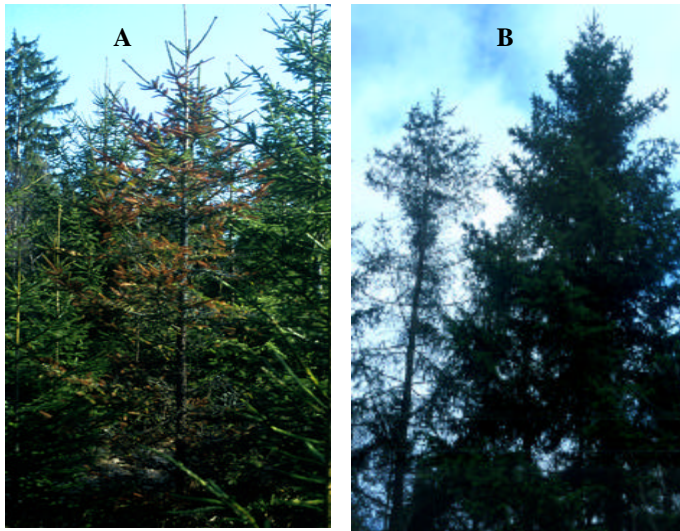


Abb. 3.1-3 **A:** Eine Fichte der Fläche ANB zeigt eine durch Salzschäden verursachte, rotbraune Verfärbung der Nadeln. **B:** Beispiel eines Untersuchungs-paares auf der Fläche ANA. Links steht eine sensitive Fichte, die unter starkem Nadelverlust leidet, rechts eine als tolerant eingestufte Fichte, die eine volle und vitale Krone besitzt.

### **3.1.5 Pilotstudie an Tief- und Hochlagenfichten in Berchtesgaden**

Um die Anpassung und Anpassungsfähigkeit von Fichten an Hochlagenverhältnisse aus genetischer Sicht zu untersuchen, wurden im Nationalpark Berchtesgaden (Bayern) aus einem Fichten-Altbestand der Höhenstufe 650-800m ü. NN in einem randomisierten Auswahlverfahren 48 Individuen beerntet. Dieses Knospenmaterial wird im folgenden als Tieflagenpopulation bezeichnet. Circa 2,5 km entfernt von der Tieflage wurden in einem Fichtenbestand der Höhenstufe 1650-1800m ü. NN ebenfalls 48 Individuen ausgewählt (als Hochlagenpopulation bezeichnet). Bei den Hochlagenfichten handelt es sich um Fichten aus Naturverjüngung im Alter von 4 bis 30 Jahren, die im Rahmen eines EU-Projekt (CT 96-1949) von Dr. M. KONNERT (BAYRISCHE LANDESANSTALT FÜR FORSTLICHEN SAAT- UND PFLANZENSCHUTZ, Teisendorf) als Knospenproben beerntet worden sind.

## 3.2 EST-Markerentwicklung

### 3.2.1 DNA-Extraktion

Als Basismaterial für die Markerentwicklung dienten 18 Fichten sowie Einzelbaumabsaaten der gleichen Individuen. Die Bäume stammen aus dem Kranzberger Forst in der Nähe von Freising (Bayern). Im Oktober 1995 wurden unmittelbar nach einer Hiebsmaßnahme Knospen und Zapfen von den gefälltten Fichten geerntet. Die Knospen wurden bis zur DNA-Extraktion bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, und aus den Zapfen wurde Einzelbaumsaatgut gewonnen, das anschließend bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

Für die Extraktion genomischer DNA wurde sowohl auf das haploide Gewebe des Endosperms als auch auf diploides Knospengewebe zurückgegriffen. Das Endosperm wurde mit Hilfe einer Pinzette und dem Skalpell aus dem Samen herauspräpariert. Dabei wurde beachtet, dass keine Kontamination mit diploidem Gewebe des Embryos oder Testa stattfand. Bei den Knospen wurden die Knospenschuppen entfernt und nur der Blattprimordienkörper für die DNA-Isolierung verwendet. Das zur DNA-Extraktion eingesetzte Material wurde in einem Eppendorfgefäß mit einem Edelstahl-Bohrkopf für ca. 30 Sekunden homogenisiert.

Die DNA Extraktionsmethode basiert auf dem von DOYLE und DOYLE (1989) beschriebenen Verfahren. Dem Standard-Extraktionspuffer wurden  $1\text{mg/ml}$  Rnase A, QIAGEN, Hilden zugesetzt.

Die präparierte genomische DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen und als Stammlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Entsprechend dieses Verfahrens erfolgte auch die Präparation von Knospen-DNA in den vier deutschen und dem slowakischen Fichtenbestand.

### 3.2.2 cDNA Sequenzen, Primerkonstruktion und PCR-Amplifikation

#### • cDNA Sequenzen

Die cDNA-Sequenzen wurden in vorausgegangenen und bereits abgeschlossenen Projekten am LEHRBEREICH FORSTGENETIK der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN aufgeklärt und anhand von Homologievergleichen in internationalen Datenbanken identifiziert (NAGEISKY 1999; SCHUBERT *et al.* 2001). Als Ausgangsbasis diente eine unter Pathogenstress (elicitor) induzierte cDNA Bibliothek (GALLIANO *et al.* 1993).

Die für die EST-Markerentwicklung zur Verfügung gestellten Fichten-cDNA-Sequenzen haben unterschiedliche Funktionen im Organismus. Ein Überblick der eingesetzten Gensequenzen und ihre Beschreibung ist in *Tabelle 3.2-1* zu finden.

#### • Primerkonstruktion

Mit Unterstützung des HIBIO DNASIS Computerprogramms (Version 2.5, HITACHI Software Engineering Europe, Olivet Cedex, France) wurden für die 15 in *Tabelle 3.2-1* dargestellten

cDNA-Sequenzen, klonspezifische Primerpaare (*siehe Tab. 4.1-1*) entworfen. Dabei wurde besonders auf hohe Schmelztemperaturen (ca. 62°C) und Sequenzspezifität geachtet, sowie darauf, dass die Primer keine Sekundärstrukturen bilden. Die Mindestlänge der Primer betrug 18 Basenpaare. Um eine gute Analyse der genomischen PCR-Produkte zu ermöglichen, wurden die Größe der Amplifikate durch Vorwärts- und Rückwärtsprimer auf 150 bis 450 Basenpaare begrenzt. Innerhalb der cDNA-Sequenzen wurden, wenn möglich, der Rückwärtsprimer in der 3' untranslatierten Genregion (3'UTR) positioniert. In allen Fällen wurde der Rückwärtsprimer jeweils an seinem 5' Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert, um eine Analyse der PCR-Produkte anhand des ALFexpress-Geräts zu ermöglichen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 3.2-1 Beschreibung der 15 Fichten-cDNA-Sequenzen, die für die Entwicklung von EST-Markern herangezogen worden sind. Verändert nach NAGEISKY (1999) sowie SCHUBERT *et al.* (2001); bp = Basenpaare; as = Aminosäuren.

cDNA Klon	EMBL Identifikations-Nummer	Länge in (bp)	(as)	Genfunktion anhand der vorhandenen Aminosäure-Sequenzhomologie mit Genen anderer Organismen
pPA0002	AJ271125	1620	(380)	54% Identität mit einem A-Typ Cyclin von <i>A. capillus-veneris</i>
pPA0006	AJ132531	1090	(232)	63% Identität mit dem 40 S ribosomalen Protein S2 von <i>A. thaliana</i>
pPA0011	AJ271127	618	(82)	67% Identität mit dem 30 S ribosomalen Protein S9 von <i>Synechocystis</i>
pPA0023	AJ271128	1194	-	keine Homologie gefunden, beinhaltet eine unvollkommene Repeatsequenz (GAX) <sub>9</sub> GTC(GAX) <sub>6</sub> X=A,G,T,C
pPA0031	AJ271129	1020	(229)	100% Identität mit anderen pflanzlichen Polyubiquitin-Genen
pPA0034	AJ132532	300	-	keine Homologie gefunden, beinhaltet eine unvollkommene Repeatsequenz (CT) <sub>6</sub> TT(CT) <sub>5</sub>
pPA0038	AJ271130	631	(120)	72% Identität mit dem Halotoleranzprotein HAL3 von <i>A. thaliana</i>
pPA0043	AJ132533	1658	(432)	86% Identität mit dem 78 KD Glucoseregulierten Protein von <i>N. tabacum</i> (gehört zur HSP 70-Hitzeschockgenfamilie)
pPA0052	AJ132534	1747	(444)	93% Identität mit dem Translations-Elongationsfaktor 1- $\alpha$ von <i>O. sativa</i>
pPA0053	AJ132535	1036	(262)	90% Identität mit dem ADP/ATP-Translokator von <i>O. sativa</i>
pPA0055	AJ132536	628	(76)	88% Identität mit der $\beta$ -Untereinheit des ATP-Synthasekomplexes von <i>H. brasiliensis</i>
pPA0066	AJ132537	932	(207)	78% Identität mit dem 60 S ribosomalen Protein L13-2 (Kälte-induziertes Protein 24B) von <i>B. napus</i>
pPA0067	AJ132538	1078	(196)	78% Identität mit der NADPH-abhängigen Zytochrom P450-Reduktase von <i>P. aureus</i>
pPA0076	AJ132539	899	-	keine Homologie gefunden, beinhaltet eine perfekte Repeatsequenz (TGG) <sub>6</sub>
pPA0078	AJ132540	1139	(230)	82% Identität mit der Glutamateystein-Ligase von <i>L. esculentum</i>

Darüber hinaus wurden Primer für ein Cinnamylalkohol-Dehydrogenasegen (CAD) getestet. Die Primer für die als Cad7 bezeichnete Sequenz (EMBL Identifikations-Nummer = AJ001925) wurden im Rahmen der Arbeit von SCHUBERT *et al.* (1998) entwickelt und hier unter modifizierten PCR-Bedingungen getestet. Die als P3/P4 bezeichneten Primer flankieren eine polymorphe Region im Intron Nr. 5 der CAD-Genfamilie (vgl. Tab. 4.1-1).

### • PCR-Amplifikation

Die Amplifikation von genomischer Fichten-DNA erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Für die Durchführung der Reaktionen standen zwei verschiedene Thermocycler-Geräte zur Verfügung (Mastercycler<sup>®</sup> gradient-Gerät von EPPENDORF, Köln; PTC-100-Gerät von MJ Research Inc., USA). Alle Primerpaare wurden mit Hilfe von drei verschiedenen PCR-Programmen getestet (vgl. Tab. 3.2-2) und anschließend das optimale Programm im Hinblick auf das Auftreten von PCR-Fragmenten ausgewählt. Das PCR-Reaktionsgemisch setzte sich für jede zu analysierende Probe wie in *Tabelle 3.2-3* aufgeführt zusammen.

Tab. 3.2-2 Temperaturprofil der verwendeten PCR-Programme.

Programm	Denaturierung	Primerbindung	Kettenverlängerung	Anzahl Zyklen
<b>JAN 1</b>	94°C / 5 Min.	60°C / 5 Min.	72°C / 1 Min.	1
	94°C / 1 Min.	60°C / 1 Min.	72°C / 1 Min.	42
			72°C / 9 Min.	1
<b>RR2</b>	94°C / 4 Min.			1
	94°C / 1 Min.	50°C / 1 Min.	72°C / 1 Min.	34
			72°C / 5 Min.	1
<b>RR3</b>	94°C / 4 Min.			1
	94°C / 1 Min.	55°C / 1 Min.	72°C / 1,5 Min.	30
			72°C / 10 Min.	1

Tab. 3.2-3 PCR-Ansatz zur genomischen Amplifikation von DNA-Gensequenzen der Fichte.

Reagenzien	Volumen	Konzentration/ Stoffmenge	Quelle
Fichten-DNA	5 µl	ca. 40 ng	
Nukleotidmix (dATP:dCTP:dTTP:dGTP; 10 mM)	0,5 µl	je 0,1mM	AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH, Freiburg
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µl	1,5 mM	GIBCO/BRL
spezifischer Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl	10 pmol	MWG-BIOTECH
spezifischer Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl	10 pmol	MWG-BIOTECH
Platinum <sup>®</sup> Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,1 µl	0,5 U	GIBCO/BRL
10 x PCR-Reaktionspuffer	2,5 µl	-	GIBCO/BRL
steriles H <sub>2</sub> O	14,15 µl	-	
gesamtes Volumen	25 µl	-	

### **3.2.3 Nachweis von Längenpolymorphismen und Punktmutationen an den PCR-Produkten**

Mit jedem Primerpaar wurde die genomische DNA von 18 verschiedenen Fichten aus dem Kranzberger Forst amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromidhaltigen (GIBCO/BRL) 1,5%-Agarosegel (GIBCO/BRL) unter Verwendung von 0,5 TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Anregung der DNA erfolgte durch UV-Licht (Transiluminator T2 von BIOMETRA, Göttingen). Die Gele wurden mit einer Digitalkamera (EDAS120, EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, USA) dokumentiert. Zur genauen Bestimmung von Längenpolymorphismen zwischen den Fichtenindividuen wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines ALFexpress-Geräts aufgetrennt (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Die Fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden denaturiert (bei 94°C für 4 Min. unter Zugabe von Formamid-Puffer) und in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt. Es wurden zwei Geltypen verwendet: im Normalfall wurden Gele mit 7M Harnstoff/ 6% Acrylamid eingesetzt. Für einige Marker war eine spezifische Auftrennungsmatrix nötig (siehe Ergebnisse), weswegen mit Long Ranger-Gelen (6 M Harnstoff/ 5,5% Hydrolink; BIOZYM, Hess. Oldendorf) gearbeitet worden ist. Die Gele wurden im ALFexpress-Gerät in einer vertikalen Elektrophorese eingesetzt (Bedingungen: Normal → 60-120 Min. Laufzeit, 1500 Volt, 38 mA, 34 W, 50°C, 0,6 x TBE; Long Range → 120-180 Min. Laufzeit, 800 Volt, 60 mA, 25 W, 55°C, 0,5 x TBE). Die unter denaturierenden Bedingungen getrennten Produkte werden beim Passieren des unteren Gelabschnittes von einem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Unter Computerkontrolle wird in jeder Gelspur die Höhe des Fluoreszenzlichtes im 2-Sekundentakt erfasst. Die Länge der PCR-Fragmente wurde mit Unterstützung des Computerprogramms ALLEL LINKS 1.0 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) unter Berücksichtigung von externen und internen DNA-Standardfragmenten bekannter Länge berechnet.

Monomorphe PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, um eventuelle Punktmutationen zu erfassen. Mit dem Computerprogramm HIBIO DNASIS (Version 2.5, HITACHI Software) wurden für jede cDNA-Sequenz die tatsächlichen und kryptischen Restriktionsorte bestimmt, um sequenzspezifische Enzyme zu verwenden. Es kamen folgende Restriktionsenzyme zum Einsatz: AluI, BspI, DraI, HaeIII, HhaI, HinfI, MspI, NdeII, RsaI, TaqI und XbaI (QUANTUM APPLIGENE, Heidelberg; MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot). Die Verdauungsreaktionen folgten den Empfehlungen des Herstellers. Es wurden 10µl PCR-Ansatz mit 5 Einheiten Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20µl verdaut. Die Restriktionsprodukte wurden in Abhängigkeit von ihrer Länge auf Agarose- oder Polyacrylamidgelen unter den hier beschriebenen Bedingungen untersucht.

Polymorphe PCR-Produkte zwischen einzelnen Fichtenbäumen fanden dann als EST-Marker Anwendung.

### **3.2.4 Vererbung der DNA-Marker und Test auf freie Rekombination zwischen den Loci**

#### **• Vererbung der Marker**

Die Knospenprobe eines Nadelbaums repräsentiert Zellen mit diploidem DNA-Gehalt. Die einzelnen Samen dieses Mutterbaumes enthalten in den Endospermgeweben jeweils die haploide genetische Information der meiotischen Segregationsprodukte. Bei Koniferen lässt sich daher durch Vergleich der PCR-Signale aus der Knospen-DNA-Probe mit den PCR-Produkten einzelner Megagametophyten des gleichen Baums der Vererbungsmodus eines DNA-Polymorphismus aufklären. Verfügt die diploide Knospenprobe nach der PCR über zwei unterscheidbare Markerfragmente, dann gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Spalten die Doppelsignale in den PCR-Reaktionen der Endospermproben dieses Baumes im Verhältnis 1:1 in die entsprechenden Einzelsignale auf, dann repräsentiert der DNA-Längenpolymorphismus einen Mendelgenort und unterscheidet beide Allele am heterozygoten Locus (kodominante Vererbung). Treten die Doppelsignale dagegen auch in den PCR-Proben der haploiden Endospermzellen auf, so müssen die polymorphen Reaktionsprodukte von zwei homologen Genorten im Genom abstammen (Multigenfamilie).

Als Bestätigung der kodominanten Vererbung der EST-Marker wurden parallel zum Knospen/Endosperm-Vergleich Untersuchungen an einer  $F_1$ -Nachkommenschaft einer kontrollierten Fichtenkreuzung durchgeführt (Material von Dr. I. SCOTTI, UNIVERSITÄT UDINE, Italien zur Verfügung gestellt). Anhand der PCR-Produkte der Elternbäume wurden bei den 86 Nachkommen die nach Mendel zu erwartende Aufspaltung der Bandenmuster prognostiziert und mit den tatsächlich beobachteten Ereignissen verglichen. Ein darauffolgender  $\chi^2$ -Test (SOKAL und ROHLF 1981), dessen Eingangshypothese ( $H_0$ ) die Existenz einer korrekten Spaltung der Marker ist, liefert die Bestätigung, ob es sich um einen kodominanten Marker handelt und somit die Marker-Banden Allele eines einzelnen Locus darstellen.

#### **• Test auf freie Rekombination zwischen den EST-Loci**

Die Hypothese einer zufällmässigen Rekombination zwischen Paaren von EST-Markern wurde an den oben genannten 86 Nachkommen einer Fichtenkreuzung überprüft. Es wurden solche Marker-Kombinationen verifiziert, bei denen mindestens eines der beiden Eltern doppelt-heterozygot war. Als statistisches Prüfverfahren wurde ein  $\chi^2$ -Test durchgeführt, dessen Eingangshypothese ( $H_0$ ) die Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen in der Nachkommenschaft ist (MÜLLER-STARCK 1993).

### 3.3 Populationsstudien

#### 3.3.1 Genetische Marker

Für die genetische Charakterisierung der Fichtenkollektive wurden drei verschiedene Markertypen eingesetzt. Zwei von ihnen, nämlich Isoenzym-Genmarker und EST-Marker erfassen die genetische Variation im diploiden Kerngenom. Der dritte verwendete Markertyp betrifft Mikrosatelliten im Chloroplastengenom (cpSSR). Sie erfassen die genetische Variation in den haploiden Plastiden. Ein Überblick über alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten molekularen Markern liefert *Tabelle 3.3-1*.

Tab. 3.3-1 Anzahl untersuchter molekularer Marker in den einzelnen Fichtenbeständen, nach Markertyp geordnet. Die gekennzeichneten Isoenzymuntersuchungen und die Genotypisierungen ( <sup>1</sup>, <sup>2</sup> ) wurden zum Teil von folgenden Arbeitsgruppen durchgeführt und für populationsgenetische Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt:

<sup>(1)</sup> Prof. Dr. L. PAULE, Technische Universität Zvolen, Slowakei

<sup>(2)</sup> Dr. M. KONNERT, Bayerische Landesanstalt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht, Deutschland

Standort / Belastung	Kerngenom		Chloroplastengenom
	Isoenzym-Genloci	DNA-Marker	Mikrosatelliten
Referenz Kranzberger Forst (vgl. Kap. 3.1.1)	18	7	3
Schwermetall- und SO <sub>2</sub> -Belastung in der Region Spiš (vgl. Kap. 3.1.2)	19 <sup>(1)</sup>	8	3
SO <sub>2</sub> -Belastung im Erzgebirge (vgl. Kap. 3.1.3)	-	8	3
Streusalzbelastung in Gunzenhausen (vgl. Kap. 3.1.4)	19	8	3
Hoch-/ Tieflagenfichten (vgl. Kap. 3.1.5)	13 <sup>(2)</sup>	8	3

##### 3.3.1.1 Isoenzym-Genmarker

Bei den ausgewählten Markersystemen (vgl. Tab. 3.3-2) handelt es sich ausschließlich um polymorphe, umweltunabhängige, enzymkodierende Genorte, deren kodominante Vererbung erwiesen ist (KONNERT 1995). Diese Enzyme wirken im Primär- und Sekundärstoffwechsel der Bäume, zum größten Teil katalysieren sie das Stoffwechselgeschehen im Umfeld des Zitronensäurezyklus und der Atmung.

Nach der Proteinextraktion wurden die Isoenzyme in Stärkegelelektrophoretisch aufgetrennt und anhand der korrespondierenden chromogenen Enzymsubstrate angefärbt (MÜLLER-STARCK 1995b, 1998). Zur Nomenklatur der einzelnen Allele an den untersuchten Markergenorten siehe KONNERT (1995).



Tab. 3.3-2 Analyisierte Isoenzym-Genmarker in den untersuchten Fichtenstandorten.

(1), (2) vgl. Tab. 3.3-1;

I = Referenz Kranzberger Forst (vgl. Kap. 3.1.1);

II = Unter Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung stehende Population in der Region Spiš (vgl. Kap. 3.1.2);

III = Unter Streusalzbelastung stehende Population bei Gunzenhausen (vgl. Kap. 3.1.4);

IV = Pilotstudie an Hoch- und Tieflagenfichten in Berchtesgaden (vgl. Kap. 3.1.5);

Enzym	Nomenklatur	Genorte	Standort			
			I	II <sup>(1)</sup>	III	IV <sup>(2)</sup>
Aconitase	E.C.4.2.1.3	ACO-A	*		*	*
Alanin-Aminopeptidase	E.C.3.4.11.2	AAP-B	*		*	
Aspartat-Aminotransferase	E.C.2.6.1.1	AAT-A	*	*	*	*
		AAT-B	*	*	*	*
		AAT-C	*	*	*	*
Fluorescent-Esterase	E.C.3.1.1.1	FEST-A		*		
Glutamat-Dehydrogenase	E.C.1.4.1.2	GDH-A	*	*	*	*
Isocitrat-Dehydrogenase	E.C.1.1.1.42	IDH-A	*	*	*	*
		IDH-B		*		
Leucin-Aminopeptidase	E.C.3.4.11.1	LAP-A	*	*	*	
		LAP-B	*	*	*	
Malat-Dehydrogenase	E.C.1.1.1.37	MDH-A		*		
		MDH-B		*	*	
		MDH-C	*	*	*	*
Menadion-Reduktase	E.C.1.6.99.2	MNR-B	*		*	*
		MNR-C	*		*	*
NADH-Dehydrogenase	E.C.1.6.99.3	NDH-B	*		*	*
Peroxidase	E.C.1.11.1.7	PX-A		*		
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	E.C.1.1.1.49	G6PD-A		*		
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	E.C.1.1.1.44	6PGDH-B	*		*	*
		6PGDH-C	*		*	
Phosphoglucose-Isomerase	E.C.5.3.1.9	PGI-A		*		
		PGI-B	*	*	*	*
Phosphoglucomutase	E.C.2.7.5.1	PGM-A	*	*	*	*
Shikimat-Dehydrogenase	E.C.1.1.1.25	SKDH-A	*	*	*	
		SKDH-B		*		

### 3.3.1.2 EST-Marker

Die Fichten wurden mit den in dieser Arbeit neu entwickelten kodominanten EST-Markern untersucht. DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation und Nachweis der Polymorphismen erfolgten nach den in *Kapitel 3.2* aufgeführten Methoden. Die Beschreibung der einzelnen eingesetzten EST-Marker, sowie deren spezielle Anwendungsbedingungen sind dem *Kapitel 4.1* der Ergebnisse zu entnehmen.

Zusätzlich wurde ein EST-Marker (PA0005) eingesetzt, der im Rahmen der laufenden Doktorarbeit von M. BOZHKO am LEHRBEREICH FORSGENETIK der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN entwickelt worden ist.

Die verschiedenen Allele der EST-Marker wurden mit Buchstaben gekennzeichnet. Die zugrundeliegende Allel-Nomenklatur ist im *Anhang 8.3* dokumentiert.

### 3.3.1.3 Chloroplasten-Mikrosatelliten

Für die Untersuchungen wurden drei Chloroplasten-Mikrosatelliten (cpSSR) ausgewählt, die ursprünglich bei *Pinus thunbergii* beschrieben worden sind (vgl. Tab. 3.3-3; VENDRAMIN *et al.* 1996). Die cpSSR-Marker *Pt26081*, *Pt63718* und *Pt71936* zeichnen sich durch variierende T-Mononukleotidwiederholungen aus, die eine hohe Variation sowohl innerhalb wie auch zwischen Fichtenpopulationen besitzen. Wegen ihrer unterschiedlichen Produktlängen konnten sie in einem gemeinsamen PCR-Ansatz amplifiziert werden (PCR-Bedingungen nach VENDRAMIN *et al.* 2000 aber als „Multiplex-PCR“ durchgeführt; vgl. Tab. 3.3-4 und 3.3-5).

Tab. 3.3-3 Verwendete Chloroplasten-Mikrosatelliten. Verändert nach VENDRAMIN *et al.* (1996; 2000).

Marker	Primer-Sequenzen	Gen / Position	Vorhandenes Repeatmotiv in <i>Pinus thunbergii</i>	PCR Produktgröße in <i>Picea abies</i> (bp)
<i>Pt26081</i>	5' CCC GTA TCC AGA TAT ACT TCC A 3' 5' Cy5-TGG TTT GAT TCA TTC GTT CAT 3'	<i>rpoB</i>	(T) <sub>14</sub>	112-127
<i>Pt63718</i>	5' CAC AAA AGG ATT TTT TTT CAG TG 3' 5' Cy5-CGA CGT GAG TAA GAA TGG TTG 3'	<i>rpl2</i>	(T) <sub>10</sub>	94-102
<i>Pt71936</i>	5' TTC ATT GGA AAT ACA CTA GCC C 3' 5' Cy5-AAA ACC GTA CAT GAG ATT CCC 3'	IRF169	(T) <sub>16</sub>	141-146

Tab. 3.3-4 Temperaturprofil des verwendeten PCR-Programms. Verändert nach VENDRAMIN *et al.* (1996).

Programm	Denaturierung	Primerbindung	Kettenverlängerung	Anzahl Zyklen
ERMIC#2	95°C / 5 Min.			1
	94°C / 1 Min.	55°C / 1 Min.	72°C / 1 Min.	25
			72°C / 8 Min.	1

Tab. 3.3-5 Ansatz zur Amplifikation von Chloroplasten-Mikrosatelliten (Multiplex-PCR).

Reagenzien	Volumen	Konzentration/ Stoffmenge	Quelle
DNA-Template	5 µl	ca. 40 ng	
Nukleotidmix (dATP:dCTP:dTTP:dGTP; 10 mM)	0,5 µl	je 0,1mM	AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µl	1,5 mM	GIBCO/BRL
spezifische Vorwärtsprimer (10 pmol/µl) ( <i>Pt26081</i> + <i>Pt63718</i> + <i>Pt71936</i> )	je 0,5 µl	5 pmol	MWG-BIOTECH
spezifische Rückwärtsprimer (10 pmol/µl) ( <i>Pt26081</i> + <i>Pt63718</i> + <i>Pt71936</i> )	je 0,5 µl	5 pmol	MWG-BIOTECH
Platinum <sup>®</sup> <i>Taq</i> DNA polymerase (5U/µl)	0,1 µl	0,5 U	GIBCO/BRL
10 x PCR-Reaktionspuffer	2,5 µl	-	GIBCO/BRL
steriles H <sub>2</sub> O	13,15 µl	-	
gesamtes Volumen	25 µl	-	

Zur Gewährleistung einer einheitlichen Nomenklatur (vgl. Anhang 8.3) der 1-Basenpaar-Längenpolymorphismen bei verschiedenen Elektrophoresegelen wurden den PCR-Produkten interne (60bp, 110bp und 150bp lang) sowie externe Standardfragmente zugesetzt. Zusätzlich wurde in jeder PCR-Reaktion und jedem Elektrophoreselauf die DNA-Proben von zwei Kontrollbäume als Standardreaktion mitgeführt.

### 3.3.2 Quantifizierung der genetischen Variation und statistische Prüfverfahren

#### • Genetische Variation

Genetische Variation in einer Population setzt den polymorphen Zustand von einzelnen Genloci im Kerngenom voraus. Die Quantifizierung dieser Variation muss demzufolge die Anzahl der Allele und deren Häufigkeiten am Genort berücksichtigen. Die Kombination der Allele zu Genotypen ergibt eine zweite Betrachtungsebene. Desweiteren kann die genetische Variation als Mittelwert aller Loci (Genpool) dargestellt werden.

ECHT *et al.* (1998) schlagen vor, das Chloroplastengenom als ein rundes haploides Chromosom zu betrachten. Variation in der DNA-Sequenz werden dann als unterschiedliche Allele an nichtrekombinanten Loci interpretiert. Demzufolge liegt ein Chloroplasten-Mikrosatellit an einem „Locus“ und Längenvarianten des gleichen gelten als „Allel“. Die gemeinsame Betrachtung von zwei oder mehreren Mikrosatelliten des Chloroplastengenoms spiegelt sich in Haplotypen wieder.

Die mit den einzelnen Markertypen (Isoenzyme, ESTs und cpSSR) berechneten genetischen Variationsmaße lassen sich in der folgenden Tabelle zusammenfassen:

Tab. 3.3-6 Berechnete Variationsmaße innerhalb und zwischen den Subpopulationen.

Variationsmaß	Ebenen	berechnet für:
<b>genetische Vielfalt</b>	Allele; Genotypen / Haplotypen	→ Genpool
<b>Häufigkeiten</b>	Allele; Genotypen / Haplotypen	→ Locus; Multilocus-Kombinationen
<b>Diversität (n)</b>		
<b>Differenzierung (d)</b>	Allele; Genotypen / Haplotypen	→ Locus; Multilocus-Kombinationen; Genpool
<b>Heterozygotie (H)</b>	Genotypen	→ Locus; Genpool
<b>genetischer Abstand (D)</b>	Allele; Genotypen / Haplotypen	→ Locus; Multilocus-Kombinationen; Genpool

Die **genetische Vielfalt** ist ein Parameter der genetischen Variation, welcher lediglich die Anzahl der genetischen Varianten (Allele; Genotypen) in einer Population oder einem Kollektiv berücksichtigt.

Die genetische **Diversität (n)** berücksichtigt nicht nur die Anzahl der verschiedenen genetischen Typen, sondern auch deren Häufigkeiten; die **Differenzierung (d)** (GREGORIUS 1987) normt diese genetische Diversität zwischen 0 und 1. Bei  $\delta = 0$  ist keine Differenzierung

(alle Typen sind gleich) vorhanden und  $\delta = 1$  deutet auf eine absolute genetische Verschiedenheit (alle Typen sind unterschiedlich).

Die **Heterozygotie** quantifiziert die individuelle genetische Variation. Die **beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ )** bezieht sich auf die tatsächlich ermittelten Individuen mit verschiedenen Allelen an einem Locus. Die **bedingte Heterozygotie ( $H_c$ )** hingegen normiert den beobachteten Heterozygotenanteil auf den maximal möglichen Wert. Mit dieser Normierung wird die Unabhängigkeit des Heterozygotiegrades von den zugrundeliegenden Allelhäufigkeiten erreicht (GREGORIUS *et al.* 1986). Zusätzlich wurde der **Fixierungsindex** ( $-1 \leq F_{IS} \leq +1$ ) nach WRIGHT (1965) berechnet.

Der **genetische Abstand (D)** (GREGORIUS 1974) erlaubt die Quantifizierung der Unterschiede in der allelischen oder genotypischen Struktur zwischen Populationen. Wie auch bei der Differenzierung bewegt sich der genetische Abstand zwischen 0 und 1. Der maximale Wert 1 liegt dann vor, wenn zwei (Sub-) Populationen keine gemeinsamen genetischen Typen haben. Der genetische Abstand ist Null bei völliger Übereinstimmung der genetischen Strukturen (Typen und deren Häufigkeiten).

Basierend auf der berechneten Abstandsmatrix wurde die **Clusteranalyse** nach dem UPGMA-Verfahren (unweighted pair group method with arithmetic average) durchgeführt, um die Beziehung zwischen den einzelnen Subpopulationen entsprechend der vorhandenen genetischen Abstände darzustellen. Jeder Clusteralgorithmus versucht Gruppen zu finden, die möglichst weit von einander entfernt sind, deren Mitglieder aber untereinander jedoch sehr nah beinander liegen (URBAN *et al.* 1992). Die Ergebnisse der einzelnen Fusionschritte wurden anschließend als **Dendrogramm** dargestellt.

#### - Statistische Prüfverfahren

Das Auftreten von Unterschieden in der genetischen Struktur zwischen zwei Populationen muss statistisch überprüft werden. Bei den in dieser Arbeit relevanten Allel- bzw. Genotyphäufigkeiten handelt es sich um nominalskalierte Daten, für die ein  **$\chi^2$ -Homogenitätstest** das geeignete Prüfverfahren ist. Liegen für mehrere Kollektive die jeweiligen Häufigkeitsverteilungen des selben Merkmals (Allel oder Genotypen eines Locus) vor, so kann mit dem Homogenitätstest geprüft werden, ob die vorgelegten Stichproben aus einer Grundgesamtheit stammen, die bezüglich des untersuchten Merkmals gleiche Verteilungen aufweisen (WEBER 1978). Damit kann die Eingangshypothese ( $H_0$ ) - zwei Kollektive unterscheiden sich nicht in ihrer genetischen Struktur - bestätigt oder abgelehnt werden.

Ein häufiges Auftreten unterbesetzter Allel- oder Genotypklassen (Häufigkeiten unter 5%) führt zur falschen Berechnung des  $\chi^2$ -Wertes. Um ein häufiges Auftreten solcher unterbesetzter Klassen zu vermeiden, wurden wenn möglich, Subpopulationen zusammengefasst. Die Bildung derartiger Großkollektive erfolgte in den einzelnen Studien dieser Arbeit wie in *Abbildung 3.3-1* schematisch dargestellt. Dabei lauten die Eingangshypothesen:

$H_{0-I}$  = die genetische Struktur des **sensitiven** Kollektivs A unterscheidet sich nicht von der des **sensitiven** Kollektivs B

$H_{0-II}$  = die genetische Struktur des **toleranten** Kollektivs A unterscheidet sich nicht von der des **toleranten** Kollektiv B

$H_{0-III}$  = das Großkollektiv **sensitiver** Fichten unterscheidet sich nicht von dem Großkollektiv **toleranter** Bäume

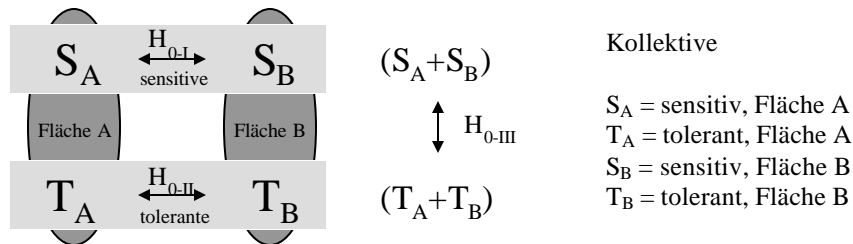


Abb. 3.3-1 Schematische Darstellung der Auswertung und Zusammenfassung von Subpopulationen.

Wenn  $H_{0-1}$  und  $H_{0-2}$  angenommen werden, konnten einerseits die sensitiven Kollektive der Flächen A und B und andererseits die toleranten Kollektive beider Flächen zusammengefasst werden. So entsteht ein Großkollektiv sensitiver und ein zweites Großkollektiv toleranter Fichten, an denen die Hypothese überprüft werden kann, ob sich sensitive Fichten von toleranten in ihrer genetischen Struktur unterscheiden.

Um Unterschiede in der genetischen Diversität zwischen sensitiven und toleranten Subpopulationen zu bestätigen, wurde der **Permutationstest** als Prüfverfahren eingesetzt. Hierfür wurden sensitive Kollektive der zwei Versuchsf lächen A und B zu einem Großkollektiv zusammengefasst. Analoges Vorgehen erfolgte mit den toleranten Teilkollektiven. Die Signifikanz der entsprechenden Unterschiede wurde anhand der Durchführung von 1000 Permutationen geprüft.

Desweiteren wurde für den Vergleich berechneter Mittelwerte ordinalskaliertes Daten der Student'sche **T-test** (KÖHLER *et al.* 1996) verwendet.

#### • Angewendete Computerprogramme

Die Berechnung der genetischen Variationsparameter wie auch die Durchführung des  $\chi^2$ -Homogenitätstest erfolgten mit dem populationsgenetischen Programmpaket **GSED 1.1** (GILLET 1994). Die Clusteranalysen wurden mit dem Computerprogramm **PHYLIP 3.5c** (FELSENSTEIN 1993) berechnet und als Dendrogramme mit Hilfe des Programms **TREE View 1.5.2** (PAGE 1996) dargestellt. Mit der Software **GDA&NT 1.0** (DEGEN 1998) wurden die Permutationstests durchgeführt, und der Student'sche **T-test** wurde mit MS-Excel 97 berechnet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Entwicklung polymorpher DNA-Marker

#### 4.1.1 Primerkonstruktion und PCR-Amplifikation

##### - Primerkonstruktion

Auf der Grundlage der in Tabelle 3.2.1 vorgestellten cDNA-Sequenzen wurden jeweils Oligonukleotidprimerpaare konzipiert, die als Startpunkt der PCR-gestützten enzymatischen Synthese von genomischen Markerfragmenten fungieren. Mit Ausnahme der cDNA-Klone pPA0006, pPA0023 und pPA0076 sind die Rückwärtsprimer so platziert worden, dass bei der PCR-Amplifikation aus genomischer DNA auch die 3' untranslatierte Genregion miterfasst wird.

Die synthetisierten Oligonukleotide bestehen aus Folgen von 19 bis 27 Basen (*vgl. Tab. 4.1-1*), deren Schmelztemperatur auf etwa 62°C abgestimmt wurde. Die erwartete Länge der Markerfragmente, die durch die Position der flankierenden Primer auf der cDNA-Sequenz gegeben ist, bewegt sich zwischen 119 - 850 Basenpaaren.

##### - PCR-Amplifikation

Die PCR-Reaktion von genomischen Nukleinsäureextrakten der Fichte wurden anhand von drei verschiedenen Temperaturprofilen durchgeführt. Für jedes Primerpaar ist dann letztlich jenes Programm ausgewählt worden (*vgl. Tab. 4.1-2*), welches reproduzierbar sowohl bei Knospenproben als auch bei Endospermmaterial ein spezifisches PCR-Fragment liefert. Die Charakterisierung der PCR-Produkte in Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen zeigt, dass alle konzipierten Primerpaare ein DNA-Markerfragment erwarteter Größe liefern. Lediglich das auf Grundlage der cDNA-Sequenz pPA0002 entwickelte Primerpaar hatte ein 190 Basenpaare längeres PCR-Produkt als erwartet zur Folge, was das Vorhandensein einer zusätzlichen Intronsequenz im genomischen PCR-Produkt vermuten lässt (*vgl. Tab. 4.1-2*).

Tab. 4.1-1 Konzipierte Primer für die PCR-gestützte Amplifikation von spezifischen Markerfragmenten im Kerngenom der Fichte. \* Die EST-Marker wurden nach der individuellen cDNA-Sequenz benannt, welche zur Entwicklung des Oligonukleotidprimerpaares herangezogen worden ist. \*\* Die DNA-Sequenz der Primer P3 und P4 sowie der Name des Markergenortes wurden aus der Arbeit von SCHUBERT *et al.* (1998) übernommen.

Markergenort	DNA-Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer	Erwartete PCR-Produktlänge (bp)
PA0002 *	5' TCT TGA CCC TAT GGT TCA CCC TT 3' 5' Cy5-CAC TCT CAT GGC TAA TAA TCC TCC 3'	590
PA0006 *	5' GAG CAA GAG AAA GCG TTT CAG T 3' 5' Cy5-ATT TGC TCG AGG GAA CGG ATT 3'	246
PA0011 *	5' GCT CCA CAG TTC TCA AAA CGT TGA G 3' 5' Cy5-CAG CAT GTT TCG CTG GCA CTAG GC 3'	214
PA0023 *	5' GGA GTT TTT GAC CAA AGG TCG CGA 3' 5' Cy5-CAC TTG GCA CAG AGG CCG CAT C 3'	119
PA0031 *	5' ATA TTC CAG TTT GAA GAT GC 3' 5' Cy5-CGA CAA ACA GAT ATG GAA C 3'	850
PA0034 *	5' AGG TCT GCT AAT GGT TCT G 3' 5' Cy5-ATA TCA AAC AAA CTG TGT TAG CTC 3'	228
PA0038 *	5' AAC GGC ATT TGG ACT CTA TCT C 3' 5' Cy5-TTA GAT GAT ATG CAA TGT AGA TTG A 3'	418
PA0043 *	5' AAA ACT GGA GGA CCT TCT GG 3' 5' Cy5-GTG AAC CTC TAC AGA AAC ACA A 3'	372
PA0052 *	5' GCG GTG GCA GAG TTT ACA TTA 3' 5' Cy5-ACT GTG CTT TAA CAT AAA TTC CAA GTC 3'	246
PA0053 *	5' AAC GAA GGT ACC AAG TCA CTC 3' 5' Cy5-TTA TTT CCT TCC GCA ACA TCA TTA AG 3'	356
PA0055 *	5' TTG GGT TTT AGG TCA TGA CTG C 3' 5' Cy5- TCC GAT TTA TTA TAT CAA AAC TGC CTC 3'	306
PA0066 *	5' CAA GCG GTT GGT TGG AGT TCG GTT G 3' 5' Cy5-GCA GCA AAA ACT GCA CCT CTC TTC TG 3'	161
PA0067 *	5' GGA AAG AAA TCT CAT GGC AAA C 3' 5' Cy5-AAT CCA GTA TCG TTT CTT ATA TGC 3'	380
PA0076 *	5' CAT AGA CGA ACA GAG ACC CAC A 3' 5' Cy5-AGC TAG GCT TTT CCT CAT GCT 3'	233
PA0078 *	5' AAG ATC GAG GAT GGA GAA ACT G 3' 5' Cy5-AGC CAT CCC TTC TAC CAA AAT 3'	313
Cad7 **	P3: 5' GAA AAA ATC TGC CTT CAG TAA AAC C 3' P4: 5' Cy5-CGA TGA AAC TCC CAG CTA TGC 3'	417

#### 4.1.2 Polymorphismen und Vererbung der Markerfragmente

Zunächst erfolgte die Identifizierung von DNA-Längenvariationen für jeden DNA-Marker anhand der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte aus 18 Fichtenindividuen des Kranzberger Forstes. Derartige Längenpolymorphismen offenbarten die Markergenorte PA0034, PA0043, PA0066, PA0076 und Cad7. An diploidem Gewebe heterozygoter Bäume weisen diese Markergenorte zwei PCR-Banden unterschiedlicher Größe auf (vgl. Abb. 4.1-1). Auf der Grundlage von DNA-Extrakten der korrespondierenden Megagametophyten, die bei Koniferen das haploide Produkt der Meiose darstellen, wurde die Vererbung der DNA-Polymorphismen aufgeklärt. Für Marker PA0034, PA0043, PA0066 und Cad7 traten in 12 untersuchten Endospermen von den zwei PCR-Fragmenten, die zuvor im diploiden

Individuum festgestellt wurden, alternierend im Verhältnis 1:1 immer nur eins der Signale auf (vgl. Abb. 4.1-1). Dieses entspricht der Erwartung einer kodominanten Vererbung eines einzelnen Locus. Deshalb sind die polymorphen PCR-Fragmente als Allele der oben genannte Markergenorte zu interpretieren (vgl. Tab. 4.1-2). Für den polymorphen Marker PA0076 hingegen konnten die im diploiden Material auftretenden zwei PCR-Fragmente (213bp und 233bp) auch gelegentlich zusammen in haploiden Megagametophyten nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um die PCR-Produkte zweier homologer Genorte einer Multigenfamilie. Während das 213bp lange PCR-Fragment immer vorhanden war, trat das 233 bp lange PCR-Fragment nur in 50% der untersuchten Megagametophyten eines heterozygoten Individuums auf. In den restlichen 50% war es abwesend (vgl. Abb. 4.1-1). Dies entspricht einem dominanten Vererbungsmodus bei Auftreten eines Nullamplifikations-alleles.

Die PCR-Amplifikation von Markergenort PA0023 ergab zwei monomorphe Fragmente, die auf eine Multigenfamilie hinweisen. Die restlichen EST-Marker, die einzelne Banden nach der PCR-Reaktion ergaben, aber keinen Längenpolymorphismus zwischen Fichten-Individuen lieferten, wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, um mögliche Punktmutationen zu erkennen. Die Auswahl dieser Enzyme erfolgte auf der Grundlage von tatsächlich vorhandenen oder kryptischen Erkennungssequenzen in der ursprünglichen cDNA-Sequenz. Das mit Marker-PA0002 erzeugte 780bp lange PCR-Fragment wird in einigen Fällen vom Enzym *HaeIII* in zwei Fragmente gespalten (480bp und 300bp). Gleiches ist bei Marker PA0055 zu beobachten - das ursprüngliche 306bp lange PCR-Fragment wird bei einigen untersuchten Genotypen durch das Enzym *DraI* einmal geschnitten (267bp und 39bp). Alle erzeugten Banden dieser beiden polymorphen Marker (PA0002 und PA0055) können auf Agarosegelen gut bestimmt werden, so dass auf die Verwendung eines Fluoreszenznachweissystemes verzichtet werden kann. Wie zuvor bei ungeschnittenen Markerfragmenten, die Längenpolymorphismen aufwiesen, wurde auch bei Restriktionspolymorphismen die Vererbung der erzeugten Bandenmuster untersucht. Analysen an Endospermen heterozygoter Individuen zeigten ein alternierendes Auftreten der Punktmutation in einem 1:1 Verhältnis und entsprachen somit den Erwartungen einer kodominanten Vererbung (vgl. Abb. 4.1-1).

Zusätzlich zu Marker PA0002 und PA0055 konnte auch bei Marker PA0038 Restriktionspolymorphismen identifiziert werden. Nach Verdau des EST-PA0038 Produkts mit *HinfI* traten zwischen den fluoreszierenden Fragmenten polymorphe Banden auf. Wegen der relativ geringen Längenunterschiede erfolgte für Marker PA0038 die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Banden immer in Acrylamidgelen (ALFexpress-Gerät). An Marker PA0038 werden zwei polymorphe Restriktionsorte von *HinfI* erkannt. Dadurch entstehen nach Verdau der PCR-Produkte (418) unterschiedlicher Individuen Banden in einer Länge von 186bp, 192bp oder 228bp. Untersuchungen an Megagametophyten bewiesen die eindeutig kodominante Vererbung dieser Fragmente (vgl. Abb. 4.1-1).



Tab. 4.1-2 PCR-Bedingungen, Produktlänge, genetische Variation und Vererbung der untersuchten DNA-Marker. Die unterstrichene Fragmentlänge entspricht der erwarteten Produktlänge aus der bekannten cDNA-Sequenz. Längenvariationen, die Allele darstellen, sind mit Buchstaben gekennzeichnet (A...O); n.e. = Vererbungsmodus ist nicht ermittelbar aufgrund fehlender Polymorphismen im Untersuchungsmaterial.

Marker- genort	PCR Programm	Länge der PCR Produkte (bp)	genetische Variation zwischen Individuen	Vererbung
PA0002	JAN1	780	polymorph nach <i>HaeIII</i> Schnitt (A)480+300; (B)780	kodominant
PA0006	RR3	<u>246</u>	monomorph	n.e.
PA0011	JAN1	<u>214</u>	monomorph	n.e.
PA0023	JAN1	94 <u>119</u>	monomorph	Multigenfamilie
PA0031	JAN1	<u>850</u>	monomorph	n.e.
PA0034	RR2	(A)212 ; (B)214 (C)226 ; (D) <u>228</u> ; (E)230	längenpolymorph	kodominant
PA0038	JAN1	<u>418</u>	polymorph nach <i>HinfI</i> Schnitt (A)186; (B)192; (C)228	kodominant
PA0043	RR3	(A)368 ; (B) <u>372</u> (C)389 ; (D)420	längenpolymorph	kodominant
PA0052	RR3	<u>246</u>	monomorph	n.e.
PA0053	RR2	<u>356</u>	monomorph	n.e.
PA0055	RR3	<u>306</u>	polymorph nach <i>DraI</i> Schnitt (A)267+39 ; (B)306	kodominant
PA0066	RR2	(A)154 ; (B) <u>161</u> (C)171 ; (D)178	längenpolymorph	kodominant
PA0067	RR2	<u>380</u>	monomorph	n.e.
PA0076	RR3	213 <u>233</u>	polymorph mit Nullamplifikationsallel	dominant Multigenfamilie
PA0078	RR3	<u>313</u>	monomorph	n.e.
Cad7	JAN1	(A)382; (B)387; (D)396; (G) <u>417</u> ; (I)428; (K)444; (N)513; (O)549;	längenpolymorph	kodominant

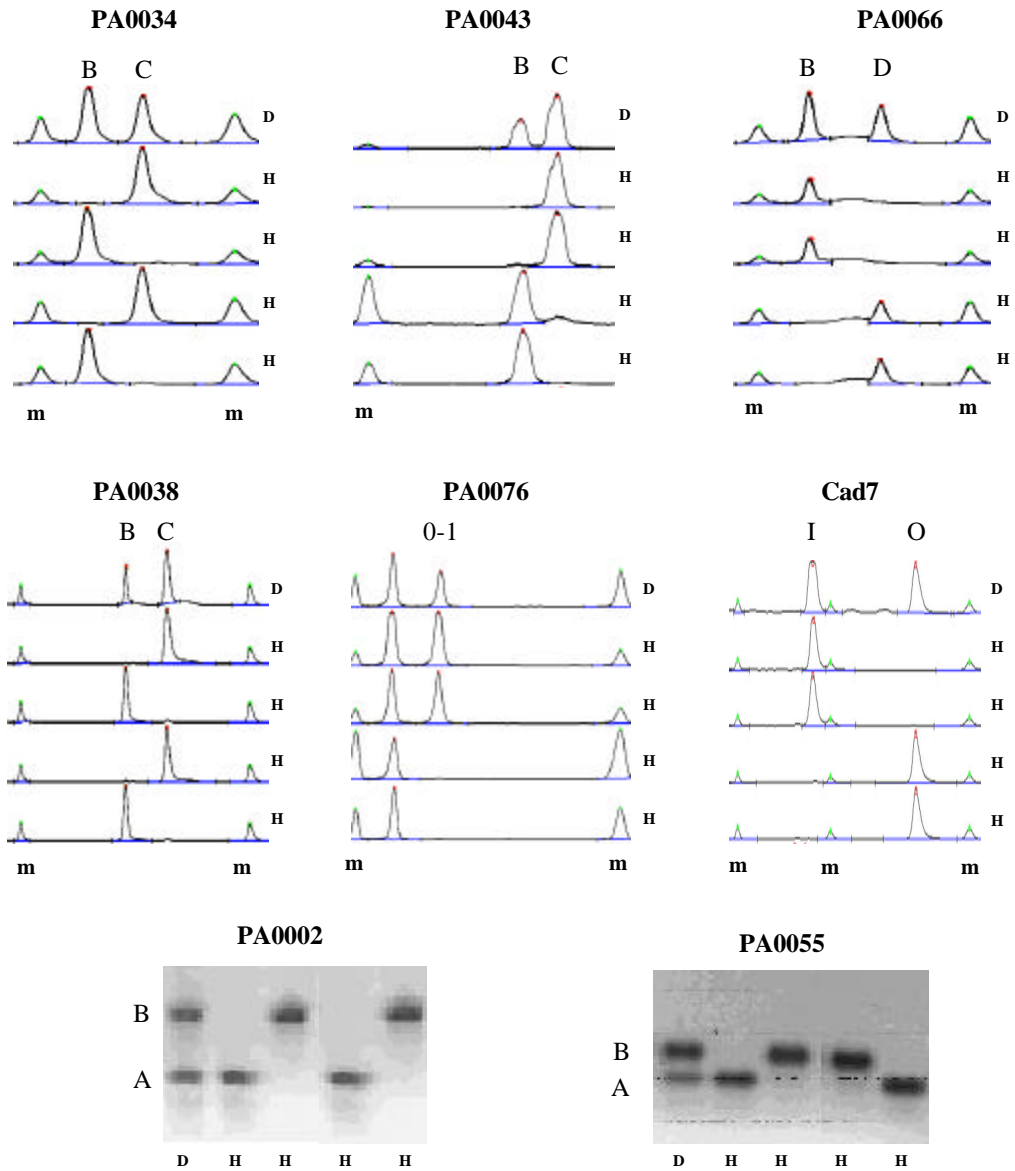


Abb. 4.1-1 Nachweis der Vererbung der neu entwickelten polymorphen DNA-Marker. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden in Polyacrylamidgelen bzw. Agarosegelen (PA0002 und PA0055) aufgetrennt. Den aus diploiden Knospen einer heterozygoten Fichte erzeugten DNA-Fragmenten (D) stehen korrespondierende Megagametophyten-Analysen (H) zum Vergleich gegenüber. Die Allele sind mit Buchstaben (A...O) bzw. Nummern (1-0) gekennzeichnet (vgl. Tab. 4.1-2). m = interne Standardfragmente zur Größenbestimmung der DNA-Marker.

### **4.1.3 Überprüfung der Aufspaltung einzelner Loci sowie der Rekombination zwischen den Loci in einer Kreuzungsnachkommenschaft**

#### **• Aufspaltung**

Alle 7 neu entwickelten kodominanten EST-Marker waren mindestens an einem der beiden Eltern im heterozygotem Zustand vorhanden, so dass für jeden Locus die Spaltung in der Kreuzungsnachkommenschaft statistisch überprüft werden konnte. Der als dominant identifizierte Marker PA0076 zeigte keine Variation und konnte deswegen nicht in diese Studie miteinbezogen werden.

Für die Marker PA0002, PA0034, PA0055 und PA0066 wurde entsprechend der Mendelschen Gesetze (ein Elternteil homozygot, der andere heterozygot) eine 1:1 Aufspaltung der einzelnen Genotypen in der F<sub>1</sub>-Nachkommenschaft erwartet. Für weitere zwei Marker, PA0038 und PA0043, bei denen beide Eltern die gleichen Allele im heterozygoten Zustand aufweisen, wurde eine 1:2:1 Spaltung erwartet. Auch für Marker Cad7 sind beide Eltern heterozygot, aber da sie unterschiedliche Allele tragen, ist in diesem Fall die erwartete Spaltung ein 1:1:1:1 Verhältnis.

Die ermittelten  $\chi^2$ -Werte in der *Tabelle 4.1-3* belegen, dass keinerlei signifikante Abweichungen zwischen den nach Mendel erwarteten Genotyphäufigkeiten und den tatsächlich in der F<sub>1</sub>-Nachkommenschaft vorhandenen Genotyphäufigkeiten vorhanden sind. Somit liegt für keinen der geprüften Markergenorte eine gestörte Segregation vor.

Tab. 4.1-3 Aufspaltung der 7 kodominanten DNA-Marker in einer Kreuzungsnachkommenschaft. N = Anzahl untersuchter Nachkommen;  $\alpha$  = Irrtumswahrscheinlichkeit; n.s. = nicht signifikant.

Markergenort	elterliche Genotypen		Genotypen innerhalb der F <sub>1</sub> -Nachkommenschaft		N	statistische Prüfgröße	
	P1	P2	Aufspaltung	beobachtete Häufigkeit		$\alpha$	n.s.
PA0002	BB	AB	BB:AB	45:36	81	0.32	n.s.
PA0034	BC	CC	BC:CC	45:40	85	0.59	n.s.
PA0038	BC	BC	BB:BC:CC	21:39:20	80	0.96	n.s.
PA0043	BC	BC	BB:BC:CC	30:35:19	84	0.07	n.s.
PA0055	AA	AB	AA:AB	41:43	84	0.83	n.s.
PA0066	BC	BB	BB:BC	39:47	86	0.39	n.s.
Cad7	DF	IJ	DI:DJ:FI:FJ	15:21:28:20	84	0.25	n.s.

**- Rekombination**

Die in *Tabelle 4.1-4* dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf Untersuchungen an einer Vollgeschwisterfamilie. Von 21 möglichen 2-Locus-Kombinationen (7 Loci) konnte innerhalb 17 Kombinationen die Verteilung der Genotypen überprüft werden. Bei dem analysierten Stichprobenumfang von 72-85 Nachkommen waren auch in Fällen, in denen die Kreuzungseltern doppelt heterozygot sind, alle 16 erwarteten Genotypsklassen mit mindestens 3 Individuen besetzt. Alle getesteten Marker-Kombinationen erwiesen Genotyphäufigkeiten, die von der Gleichverteilung nicht signifikant abwichen ( $\chi^2$ -Test). Die Rekombination zwischen den getesteten EST-Loci scheint zufallsmäßig zu verlaufen, so dass keine Kopplung zwischen den Markern besteht. Weil die Hypothese einer Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen nicht widerlegt werden konnte, lassen sich formal keine Rekombinationsraten berechnen.

Tab. 4.1-4 Übersicht der statistischen Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen. Unter der Diagonale ist die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $\alpha$ ) des  $\chi^2$ -Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt. Oberhalb der Diagonale ist die Anzahl untersuchter Nachkommen dargestellt. n.s. = nicht signifikant; n.e. = nicht ermittelbar.

<b>EST-Marker</b>	<b>PA0002</b>	<b>PA0034</b>	<b>PA0038</b>	<b>PA0043</b>	<b>PA0055</b>	<b>PA0066</b>	<b>Cad7</b>
<b>PA0002</b>	-	n.e.	72	76	76	n.e.	77
<b>PA0034</b>	n.e.	-	79	83	n.e.	85	84
<b>PA0038</b>	0,67 n.s.	1,00 n.s.	-	77	77	79	78
<b>PA0043</b>	0,37 n.s.	0,56 n.s.	0,80 n.s.	-	81	83	82
<b>PA0055</b>	0,58 n.s.	n.e.	0,94 n.s.	0,18 n.s.	-	n.e.	82
<b>PA0066</b>	n.e.	0,83 n.s.	0,96 n.s.	0,26 n.s.	n.e.	-	81
<b>Cad7</b>	0,13 n.s.	0,10 n.s.	0,94 n.s.	0,39 n.s.	0,19 n.s.	0,56 n.s.	-

## 4.2 Genetische Variation in der Referenzpopulation Kranzberger Forst

### 4.2.1 Quantifizierung genetischer Variation anhand der neu entwickelten DNA-Marker

Die sieben neu entwickelten kodominanten EST-Marker wurden an einer Fichtenpopulation getestet und charakterisiert. Der einzige dominant vererbte Marker PA0076 wurde in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Grund hierfür ist die geringere Information, die dominante Marker in Populationsstudien liefern (z.B. keine Heterozygotie; CRUZAN 1998).

Alle DNA-Marker zeigten in der Referenzpopulation von 100 Individuen die gleichen Allele, die auch schon zuvor in den 18 für die Markerentwicklung verwendeten Fichten einer Nachbarpopulation beschrieben worden sind. Einzige Ausnahme ist der Marker Cad7. In der Stichprobe von 18 Individuen waren 8 Allele vorhanden, dagegen waren bei den 100 Fichten 17 Allele nachweisbar. Damit ist dieser DNA-Marker mit Abstand der variableste aller hier untersuchten Loci (vgl. Abb. 4.2-1). Die Anzahl vorhandener Allele pro Locus ( $N_A$ ) liegt für die anderen 6 EST-Marker zwischen zwei (PA0002 und PA0055) und fünf (PA0034) (vgl. Tab. 4.2-1).

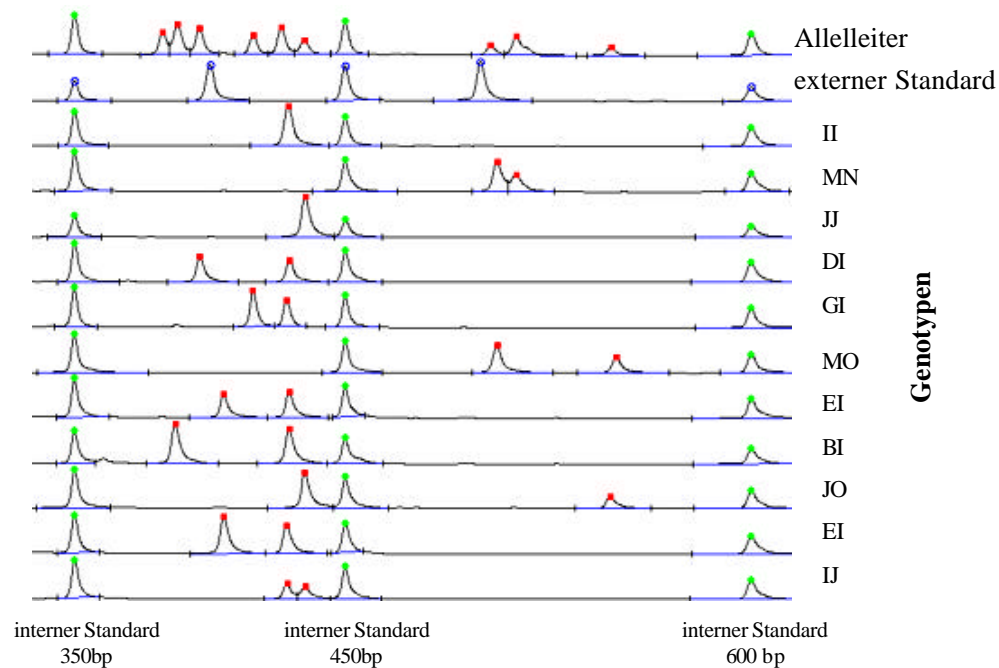


Abb. 4.2-1 Beispiel für die Identifizierung von Fichtengenotypen für den Markergenort Cad7. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden unter denaturierenden Bedingungen im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Standardfragmente bekannter Längen und eine Allelleiter (Mischung der PCR-Produkte verschiedener Genotypen) dienten der exakten DNA-Längenbestimmung. Die Allele sind mit Buchstaben gekennzeichnet (zur Nomenklatur siehe Anhang 8.3).

Nicht nur in der allelischen Vielfalt unterscheiden sich die DNA-Marker. Auch die Häufigkeit, mit der unterschiedliche Allele an einem Marker-Locus auftreten, ist von Fall zu Fall verschieden. Beispielsweise sind die zwei vorhandenen Allele vom Marker PA0002 mit gleicher Frequenz in den 100 Fichten zu finden (jeweils 50%). Nahezu alle anderen Marker zeigen ein dominantes Allel mit einer Frequenz >50%. Erneut stellt Marker Cad7 die einzige Ausnahme dar, weil er kein eindeutig dominantes Allel (häufigstes Allel in einer Frequenz von 21%) und auch keine gleiche Verteilung der Allele aufweist (vgl. Tab. 4.2-1).

Anzahl und Häufigkeiten der Allele fließen in die Berechnung der allelischen Diversität ( $v_A$ ) mit ein. Die allelische Diversität ( $v_A$ ) entspricht der Anzahl Allele ( $N_A$ ) bei einer Gleichverteilung der Allele. Dieser Fall tritt nur für Marker PA0002 ein, ein Wert von 2 steht sowohl für die Anzahl Allele pro Locus ( $N_A$ ), wie auch für die Diversität ( $v_A$ ). Mit einem Wert von 8,53 fällt die Diversität beim Marker Cad7 am höchsten aus, gefolgt von Marker PA0043 ( $v_A = 2,58$ ). Dem gegenüber steht Marker PA0066, der die geringste allelische Diversität mit 1,66 beschreibt, obwohl an diesem Locus genauso wie bei dem Marker PA0043 vier Allele nachgewiesen wurden.

Tab. 4.2-1 Genetische Variation in der Fichtenpopulation des Kranzberger Forstes auf der Grundlage von sieben neu entwickelten, kodominanten DNA-Markern.  $N_A$ = Anzahl Allele pro Locus ;  $v_A$ = allelische Diversität (GREGORIUS 1987) ;  $N_G$ = Anzahl Genotypen pro Locus;  $N_{Gmax}$ = maximal bildbare Genotypen;  $H_o$ = beobachtete Heterozygotie;  $H_c$ = bedingte Heterozygotie (GREGORIUS *et al.* 1986); Die unterschiedlichen Allele sind mit Großbuchstaben (A...O) gekennzeichnet (zur Nomenklatur siehe Anhang 8.3). Bei Marker Cad7 steht XX für die Frequenz von 10 zusammengefassten Allelen, deren Einzelhäufigkeiten unter 5% liegen.

EST Marker	Allelhäufigkeiten (%)	$N_A$	$n_A$	$N_G$	$N_{Gmax}$	$H_o$	$H_c$
PA0002	A 50 B 50	2	2,00	3	3	0,51	0,51
PA0034	A B C D E 5 7 71 5 12	5	1,90	10	15	0,46	0,80
PA0038	A B C 4 53 43	3	2,14	5	6	0,56	0,60
PA0043	A B C D 55 16 24 5	4	2,58	8	10	0,58	0,65
PA0055	A B 72 28	2	1,67	3	3	0,48	0,87
PA0066	A B C D 2 74 1 23	4	1,66	6	10	0,41	0,79
Cad7	A B D I J N O XX 8 15 8 21 6 9 4 3	17	8,53	54	153	0,86	0,86

Weitere Unterschiede zwischen den Markern liegen auch bei der beobachteten Anzahl an Genotypen ( $N_G$ ) vor (zwischen 3 (PA0002; PA0055) und 10 (PA0034) bzw. 54 (Cad7) Genotypen). Die Anzahl beobachteter Genotypen ( $N_G$ ) entspricht den maximal bildbaren Genotypen ( $N_{G_{max}}$ ) nur im Fall der weniger variablen Marker PA0002 und PA0055. Für alle anderen EST-Marker konnte in der untersuchten Referenzpopulation ein Defizit an Genotypen festgestellt werden. Eine nicht ausreichend große Stichprobe oder die Aktion genetischer Selektion gegen bestimmte Genotypen könnte die Ursache dafür sein.

Die beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ ), das Maß zur Quantifizierung der individuellen genetischen Variation, bewegt sich bei der untersuchten Population im Kranzberger Forst zwischen 41% für Marker PA0066 und 86% für Marker Cad7. Mit der bedingten Heterozygotie ( $H_c$ ) wird die Unabhängigkeit des Heterozygotiegrades von den zugrundeliegenden Allelhäufigkeiten erreicht. Bei dieser Art der Betrachtung der Heterozygotie nimmt die Streuung zwischen den Markern ab, die einzelnen Werte liegen zwischen 0,51 (PA0002) und 0,86 (Cad7).

#### **4.2.2 Gegenüberstellung von kernkodierten DNA- und Isoenzym-Genmarkern sowie Chloroplasten-Mikrosatelliten**

Die genetische Charakterisierung von 100 Fichten der Referenzpopulation Kranzberger Forst anhand von 7 DNA-Markern, 18 Isoenzym-Genmarkern sowie drei Chloroplasten-Mikrosatelliten erlaubt eine Gegenüberdarstellung der mit jedem Markertyp beschriebenen populationsgenetischen Variationsmaße.

##### **• EST-Marker im Vergleich zu Isoenzym-Genmarkern**

Der außerordentlich variable Marker Cad7 (17 Allele und 54 Genotypen bei 100 Bäumen) wurde von den folgenden Mittelwertberechnungen ausgeschlossen um eine bessere Vergleichbarkeit der Variationsparameter der EST-Marker und Isoenzym-Genmarker zu erreichen.

In der Beschreibung allelischer Vielfalt unterscheiden sich die sechs EST-Marker nicht wesentlich von dem als Referenz benutzten Isoenzym-Genmarker (vgl. Abb. 4.2-2). Die Mittelwerte der EST-Marker und Isoenzyme liegen bei 3,3 bzw. 3 Allele pro Locus. Mit einem Mittelwert von 5,43 Genotypen/Locus ist die an den EST-Marker nachgewiesene genotypische Vielfalt höher als die, die durch Isoenzyme ermittelt wird (4,17 Genotypen/Locus). Die ESTs zeigen insgesamt eine höhere Variation innerhalb der untersuchten Referenzpopulation. Dies ist gut an der allelischen Diversität zu erkennen - gemittelt über sechs EST-Marker liegt sie bei 1,95, hingegen erreicht der Mittelwert bei Isoenzymuntersuchungen nur 1,36.

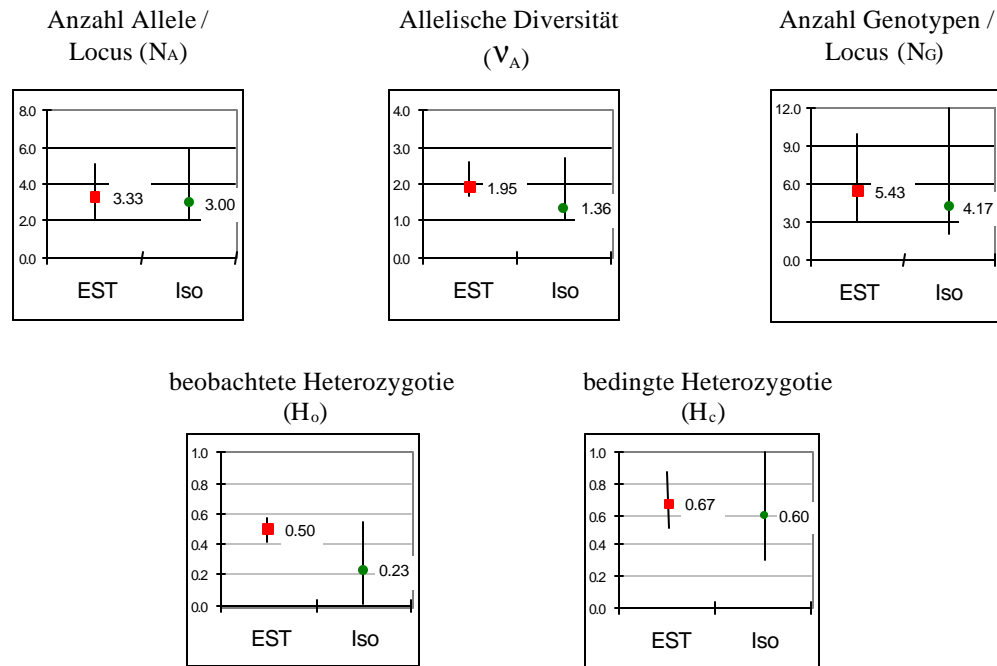


Abb. 4.2-2 Mindest-, Maximal- und Mittelwerte genetischer Variationsmaße der Referenzpopulation für sechs EST-Marker und 18 Isoenzym-Genloci (Iso). DNA-Marker Cad7 wurde wegen seiner Hypervariabilität und der damit verbundenen Extremwerte ( $N_A=17$ ;  $v_A = 8,53$ ;  $N_G=54$ ;  $H_a=0,86$ ;  $H_e=0,86$ ) nicht in diese Berechnungen miteinbezogen.

Mit einem gemittelten Anteil von 50% Heterozygotie beschreiben die EST-Marker im Schnitt eine doppelt so hohe individuelle genetische Variation der untersuchten Fichten als die Isoenzym-Genloci (vgl. Abb. 4.2-2). Im Gegensatz hierzu beträgt die bedingte Heterozygotie, die von den Allelhäufigkeiten unabhängig ist, im Schnitt 67% für die EST-Marker und liegt damit 7% Punkte über dem der Isoenzym-Genmarker. Der Mittelwert des Fixierungsindex ( $F_{IS}$ ) beträgt 1% für die sechs analysierten EST-Marker und 10% für acht Isoenzym-Genmarker (nur Marker deren vorherrschendes Allel Häufigkeiten unter 75% aufweist).

### - EST-Marker in Gegenüberstellung zu Chloroplasten-Mikrosatelliten

Die ausschließlich paternale Vererbung bei der Fichte sowie die Vererbung als eine einzige haploide Einheit machen einen direkten Vergleich zwischen Chloroplastenmarkern und nuklearen Markern nicht oder nur bedingt möglich. Wegen ihrer besonderen Vererbungseigenschaften (keine Rekombination) wurden die cp-Mikrosatelliten auf Einzel- und Multilocusebene betrachtet.

In *Tabelle 4.2-2* ist die genetische Variation des Chloroplastengenoms der Fichten des Kranzberger Kollektivs zusammengefasst und in *Abbildung 4.2-3* ist ein Beispiel der beschriebenen Längenpolymorphismen dieser Marker dargestellt.



Die drei im Kranzberger Forst angewendeten cpSSR zeigen bei den 100 untersuchten Fichten 3 bis 6 Längenvarianten je Marker (vgl. Tab. 4.2-2). Diese Varianten werden nachfolgend als „Allele“ bezeichnet (vgl. Kap. 3.3.2). Mit einem Mittelwert von 4 Allele pro Locus ist die von cpSSR detektierte allelische Vielfalt höher als die, die mit nuklearen Markern für den gleichen Bestand beschrieben wurde (3,3 bzw. 3,0 für EST-Marker bzw. Isoenzyme; vgl. Abb. 4.2-2). Die relativ zu den EST-Markern hohe Variation der Chloroplasten-Mikrosatelliten spiegelt sich nicht in der Diversität wieder. Die berechnete allelische Diversität für den Kranzberger Forst schwangt je nach cpSSR-Marker zwischen 1,30 (*Pt63718*) und 1,51 (*Pt26081*). Alle Diversitäts-Werte liegen unter dem des EST-Loci PA0066. Mit einer allelischen Diversität von 1,66 ist Marker PA0066 derjenige EST-Marker, der die geringste Diversität innerhalb der untersuchten Fichten anzeigt.

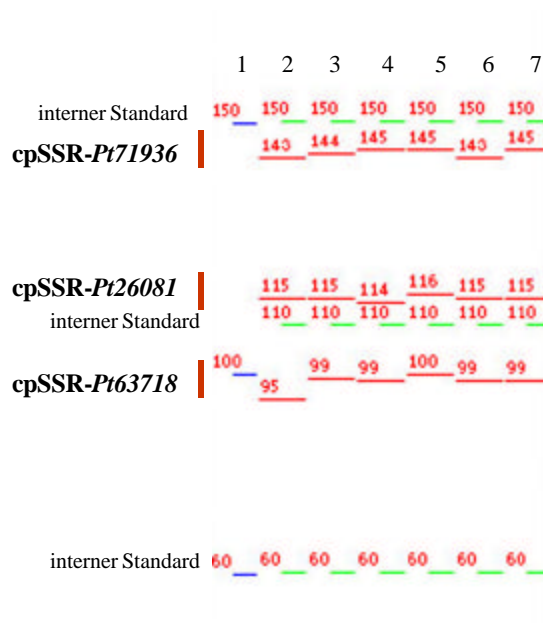


Abb. 4.2-3 Längenpolymorphismen der cpSSR. Das ALFexpress-Fluorogram zeigt alle drei Marker einer „Multiplex“-Reaktion; in der ersten Linie ist der externe Standard aufgetragen; Linien 2 bis 7 sind unterschiedlichen Haplotypen. Die Länge der Fragmente ist in Basenpaare (bp) angegeben.

Werden die Chloroplasten-Mikrosatelliten miteinander zu Haplotypen kombiniert, dann ist erwartungsgemäß ein Anstieg der Vielfalt und Diversität zu verzeichnen. Sie erreichen die Maximalwerte bei der gemeinsamen Betrachtung der drei untersuchten Chloroplastenmarker. In der 100 Bäume umfassenden Fichtenpopulation können 18 verschiedene 3-Locus-Haplotypen identifiziert werden. Elf dieser Haplotypen traten nur in einem Individuum auf. 61% der Fichten tragen den als „623“ (vgl. Abb. 4.2-4) bezeichneten (vgl. Anhang 8.3) vorherrschenden Chloroplastentyp. Auf der gleichen Ebene der Haplotypen wird für die angesprochene Population eine Diversität von 2,57 berechnet (vgl. Tab. 4.2-2).

Tab. 4.2-2 Genetische Variation in der Referenzpopulation Kranzberger Forst auf der Grundlage von drei Mikrosatelliten-Markern des haploiden Chloroplastengenoms.  $v$ = Diversität (GREGORIUS 1987).

cpSSR-Marker	Allele / Haplotypen	Diversität (n)
<b>Einzellocus</b>		
<i>Pt63718</i>	6	1,30
<i>Pt26081</i>	3	1,51
<i>Pt71936</i>	3	1,49
<b>Haplotypen ( 2- bzw. 3-Loci)</b>		
<i>Pt63718</i> + <i>Pt26081</i>	11	1,84
<i>Pt63718</i> + <i>Pt71936</i>	10	1,88
<i>Pt26081</i> + <i>Pt71936</i>	8	2,15
<i>Pt63718</i> + <i>Pt26081</i> + <i>Pt71936</i>	18	2,57

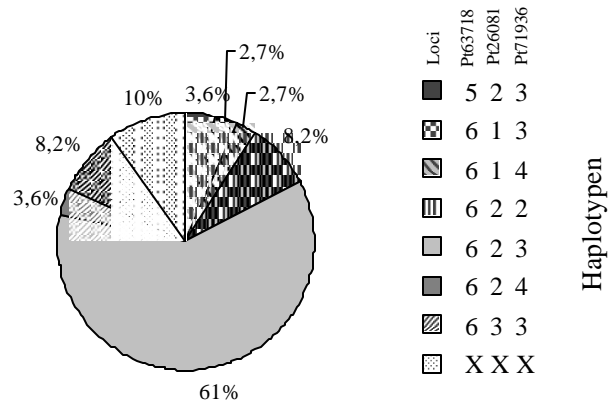


Abb. 4.2-4 Häufigkeit der identifizierten Haplotypen in der Population Kranzberger Forst. Die Bezeichnung XXX fasst Haplotypen mit Häufigkeiten unter 1% zusammen. Die Nomenklatur der Haplotypen ist in *Anhang 8.3* zu finden.

### 4.3 Genetische Untersuchungen in stark belasteten Fichtenpopulationen

#### 4.3.1 Sensitive und tolerante Kollektive gegenüber Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung

In der mit Schwermetall und SO<sub>2</sub> belasteten Spiš Region (Slowakei) wurden mit der Paarmethode auf zwei Versuchsflächen sensitive und tolerante Fichten für genetische Untersuchungen beprobt. An 12 der 26 auserwählten Paare der Fläche A und 11 Paaren der Fläche B wurden zusätzliche Untersuchungen zum Zustand der kutikularen Wachse durchgeführt (MANKOVSKA, persönliche Mitteilung).

Der in *Abbildung 4.3-1* dargestellte Schädigungsgrad der epicuticularen Wachsschicht macht deutlich, dass durch die vorherrschende Umweltbelastung die als tolerant eingestuften Individuen im geringeren Maße beeinträchtigt sind als die sensitiven. Mit Werten von 3,47 und 3,40 (Fläche A bzw. Fläche B) sind die Unterschiede zwischen den sensitiven Kollektiven beider Flächen sehr gering. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich von den entsprechenden toleranten Kollektiven. Die toleranten Fichten der Versuchsfläche B zeigen mit 2,64 einen geringeren Beschädigungsgrad auf als die toleranten Individuen der Fläche A mit 2,92.

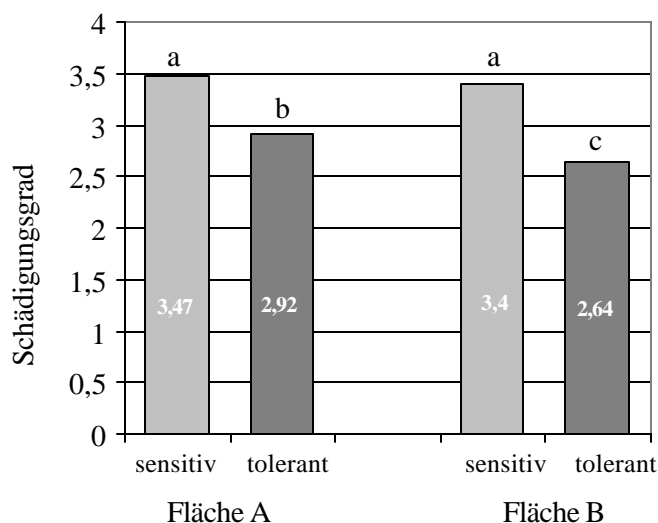


Abb. 4.3-1 Schädigungsgrad von sensitiven und toleranten Fichten, der am Zustand der epicuticularen Wachsschicht bestimmt ist. Die angegebenen Mittelwerte basieren auf die Untersuchung von 12 und 11 Paaren für Fläche A bzw. Fläche B (MANKOVSKA, persönliche Mitteilung). Mittelwerte, die sich statistisch nicht voneinander unterscheiden, sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet (t-Test).

#### • Quantifizierung genetischer Variation anhand von Kern-Markern

Alle 8 DNA-Loci, die in der genetischen Inventur eingesetzt wurden, zeigen in jedem der vier Teilkollektive Variation. Anders ist es im Fall der sich auf 19 Isoenzym-Genloci beziehenden

Referenzdaten. In den Teilkollektiven der beschädigten Bäume sind 17 bzw. 15 Loci polymorph. Das ist weit aus mehr als in den Teilkollektiven vitaler Bäume, wo nur 11 bzw. 10 Isoenzym-Genloci Variation zeigen (vgl. Tab 4.3-1).

Anhand der allelischen Vielfalt können deutliche Unterschiede zwischen toleranten und sensitiven Kollektiven nachgewiesen werden. Sowohl mit den DNA-Markern wie auch mit den Isoenzym-Genmarkern ist an den Kollektiven toleranter Fichten eine geringere Anzahl an Allelen zu beobachten. Diese Erkenntnisse werden in beiden untersuchten Beständen belegt (vgl. Tab. 4.3-1). *Abbildung 4.3-2* entstand durch Addition aller identifizierten Allele an den 27 analysierten nuklearen Loci. In ihr ist zu sehen, dass sich insgesamt unter den toleranten Individuen der Fläche A 65 Allelvarianten identifizieren lassen, d.h. 14 weniger als bei den 26 sensitiven Fichten. Auch im Kollektiv-B toleranter Fichten sind 65 Allelvarianten zu beobachten. Dies sind 11 Allele weniger als in dem sensitiven Kollektiv der gleichen Fläche.

Tab. 4.3-1 Genetische Variation (Genpool) in sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven auf der Basis von 8 DNA-Markern und Referenzdaten (19 Isoenzym-Genloci). Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 26 Individuen pro Kollektiv.

Variationsmaße	Marker	Fläche A		Fläche B	
		sensitiv	tolerant	sensitiv	tolerant
<b>Polymorphe Loci</b>	DNA	8	8	8	8
	Isoenzyme	17	<u>11</u>	15	<u>10</u>
<b>Allele / Locus (<math>N_A</math>)</b>	DNA	4,38	<u>3,62</u>	4,25	<u>4,13</u>
	Isoenzyme	2,32	<u>1,89</u>	2,21	<u>1,68</u>
<b>Genotypen / Locus (<math>N_G</math>)</b>	DNA	6,25	<u>5,63</u>	6,13	<u>6,00</u>
	Isoenzyme	2,53	<u>2,11</u>	2,26	<u>1,84</u>
<b>Diversität (<math>v_{Allele}</math>)</b>	DNA	1,87	<u>1,79</u>	1,81	<u>1,78</u>
	Isoenzyme	1,16	<u>1,12</u>	1,12	<u>1,09</u>
<b>Differenzierung (<math>d T_{Allele}</math>)</b>	DNA	0,47	<u>0,45</u>	0,46	<u>0,45</u>
	Isoenzyme	0,14	<u>0,11</u>	0,11	<u>0,09</u>
<b>Diversität (<math>v_{Genotypen}</math>)</b>	DNA	2,58	<u>2,36</u>	2,36	<u>2,35</u>
	Isoenzyme	1,27	<u>1,19</u>	1,21	<u>1,15</u>
<b>Differenzierung (<math>d T_{Genotypen}</math>)</b>	DNA	0,64	<u>0,60</u>	0,60	0,60
	Isoenzyme	0,22	<u>0,17</u>	0,19	<u>0,14</u>
<b>Beobachtete Heterozygotie (<math>H_o</math>)</b>	DNA	0,45	<u>0,43</u>	0,45	<u>0,42</u>
	Isoenzyme	0,14	<u>0,11</u>	0,11	<u>0,08</u>
<b>Bedingte Heterozygotie (<math>H_c</math>)</b>	DNA	0,75	<u>0,71</u>	0,70	<u>0,69</u>
	Isoenzyme	0,83	<u>0,80</u>	0,79	<u>0,70</u>
<b>Fixierungsindex (<math>F_{IS}</math>)</b>	DNA	0,05	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	0,08
	Isoenzyme	-0,03	<u>-0,04</u>	0,03	<u>0,02</u>

Die potentielle Anzahl von Genotypen in einer Population wird durch die Anzahl der Allele an den einzelnen Loci bestimmt. Entsprechend fällt in den untersuchten Beständen die genotypische Vielfalt bei den toleranten Kollektiven geringer als bei den sensitiven Kollektiven aus. Je nach der Versuchsfläche (A - B) konnten mit den DNA-Markern im Durchschnitt 6,25 - 6,13 Genotypen pro Locus in den toleranten Kollektiven und 5,63 - 6,00 Genotypen pro Locus in den sensitiven Kollektiven identifiziert werden.

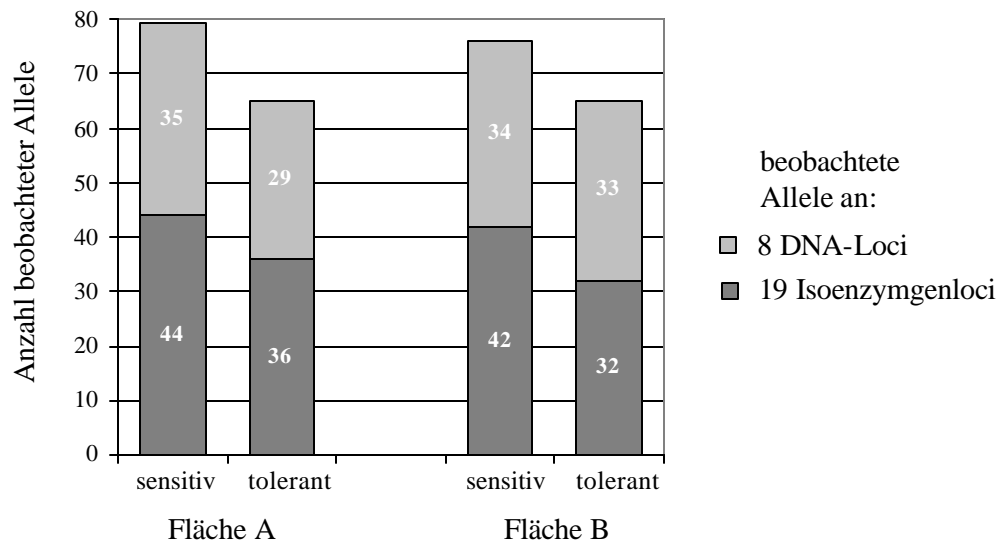


Abb. 4.3-2 Anzahl beobachteter Allelvarianten in sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven.

Die allelische Diversität, die ja nicht nur die allelische Vielfalt, sondern auch die Häufigkeiten des Auftretens der Allele berücksichtigt, zeigt nur geringe Unterschiede zwischen den Kollektiven. Diese sind jedoch gerichtet. Beide Markerklassen zeigen auf beiden Versuchsflächen eine Differenz zu Gunsten sensitiver Teilkollektive, in denen eine höhere Diversität vorzufinden ist. Dieser Trend ist auch an der Differenzierung der Kollektive auf Allelebene zu beobachten (vgl. Tab 4.3-1). Auf der höheren Ebene, die der Genotypen, sind auch in den sensitiven Kollektiven beider Flächen (A und B) die höheren Diversitätswerte und Differenzierungswerte zu finden. Dabei zeigen Isoenzyme größere Unterschiede als die DNA-Marker.

Wie schon zuvor bei der Vielfalt, Diversität und Differenzierung unterstützen auch bei der Beschreibung der individuellen Vielfalt (Heterozygotie) beide untersuchten Markertypen den gleichen Trend. Auch wenn sich die absoluten Heterozygotiewerte zwischen den DNA-Markern und den Isoenzym-Genloci sehr unterscheiden, weisen beide auf einen geringeren Heterozygotiegrad innerhalb der Fichten der toleranten Kollektive. Dies bedeutet in Zahlen ausgedrückt: Mit den DNA-Markern wurde ein Heterozygotiegrad von 45% in beiden sensitiven Kollektiven beschrieben, während die toleranten Kollektive (A-B) um 2%-3% Punkte darunter liegen. Isoenzym-Genmarker belegen einen Heterozygotiegrad von 14%-11%

bei den beschädigten Fichtenkollektiven (A-B). 3% Punkte darunter liegt der der gesunden Fichtenkollektive (A-B). Trotz Unterschieden zwischen DNA-Markern und Isoenzym-Markern bezüglich der Absolutwerte in der Heterozygotie zeigen beide Markertypen in allen Kollektiven Fixierungswerte ( $F_{IS}$ ), die nahe an Null liegen.

Es ist zu berücksichtigen, dass einzelne Loci bezüglich der beobachteten Heterozygotie gegengesetzte Ergebnisse liefern (vgl. Abb. 4.3-3). In *Abbildung 4.3-3* sind solche Marker dargestellt, die auf beiden untersuchten Flächen gleiche Trends zeigen. Marker PA0034, PA0043 und LAP-B zeichnen sich durch höhere Heterozygotiegrade bei den sensitiven Kollektiven aus. Im Gegensatz hierzu beschreiben Marker PA0038 und PA0066 bei den toleranten Kollektiven einen höheren Anteil an Heterozygoten. Besonders auffällig sind die uneinheitliche Werte von Marker PA0066. Während in der Fläche A im toleranten Kollektiv ca. 2,5 mal mehr heterozygote Individuen zu finden sind als im sensitiven Kollektiv, unterscheiden sich in der Fläche B die Kollektive nur geringfügig.

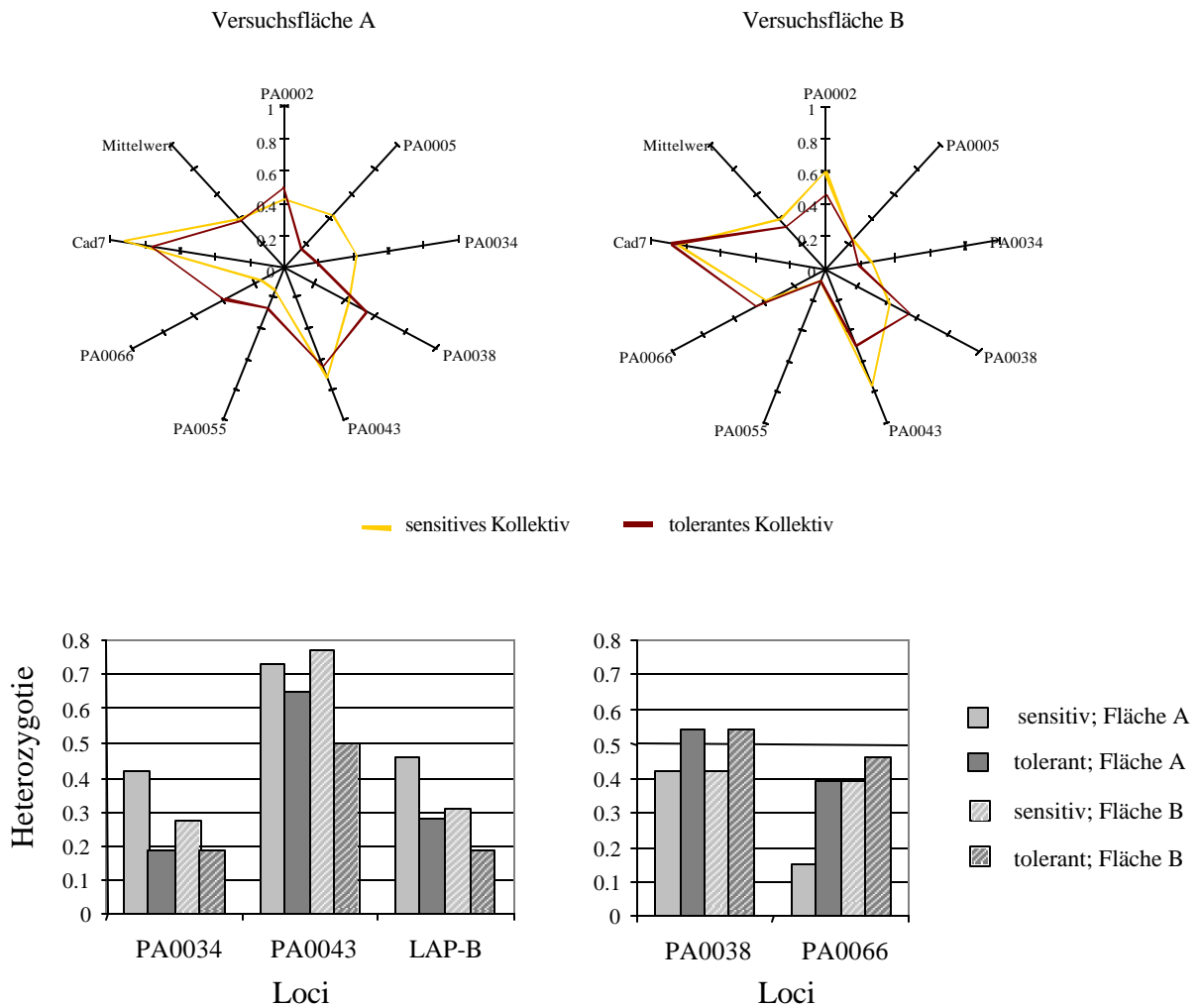


Abb. 4.3-3 Heterozygotenanteil in sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven gemessen an ausgewählten Markern.

Der mit den 8 DNA-Markern berechnete allelische Abstand (D) zwischen den Kollektiven beträgt zwischen 9% und 16%. Im Dendrogramm (vgl. Abb. 4.3-4) ist zu erkennen, dass keine besonderen Gruppen mit toleranten oder sensitiven Kollektiven gebildet werden. Vielmehr ist es das sensitive Kollektiv der Fläche A, das sich von den anderen untersuchten Teilkollektiven abgrenzt. Diese besondere Stellung des Kollektivs (sensitiv- Fläche A) gegenüber den restlichen Kollektiven wird auch von den 19 Isoenzym-Genmarkern getragen. Auch hier bilden drei Kollektive eine Gruppe, die sich von dem einen sensitiven Teilkollektiv der A Fläche eindeutig trennt (vgl. Abb. 4.3-4).

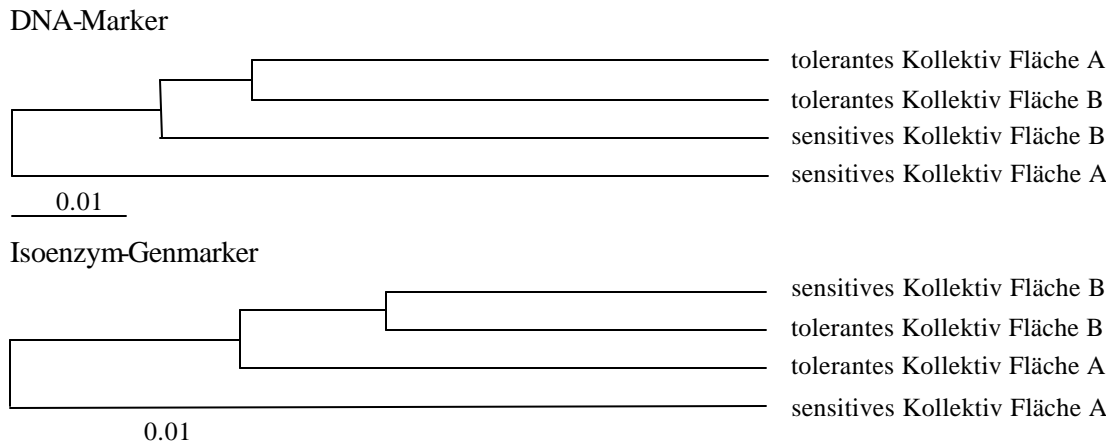


Abb. 4.3-4 Dendrogramme anhand der allelischen Abstände für 8 DNA-Loci und 19 Isoenzym-Genloci.

Die statistische Überprüfung ergab, dass an keinem der 27 untersuchten nuklearen Loci statistisch signifikante Unterschiede zwischen toleranten Kollektiven beider Versuchsflächen in der genetischen Struktur bestehen. Bei dem Vergleich beider sensitiver Kollektive zeigen lediglich Marker PA0038 und AAT-C signifikant voneinander abweichende allelische Strukturen. Aus diesem Grund wurden bei diesen beiden Markern die Flächen weiterhin getrennt betrachtet. Für die restlichen 25 Marker wurden beide Flächen zusammengefasst und das resultierende sensitive Großkollektiv mit dem resultierenden toleranten Großkollektiv einem neuen  $\chi^2$ -Test unterzogen. Keiner der 25 so untersuchten Marker zeigt bezüglich seiner genetischen Struktur Unterschiede zwischen dem sensitiven und dem toleranten Kollektiv. Von den für jede Fläche getrennt ausgewerteten Markern PA0038 und AAT-C zeigt nur der erste signifikante Unterschiede in den Allelhäufigkeiten. Allerdings ist dieser Unterschied nur zwischen den sensitiven und toleranten Kollektiven der Fläche A aufgetreten. Auf der Fläche B ist dieser Effekt nicht mehr zu finden. In *Abbildung 4.3-5* ist gut zu erkennen, dass das Kollektiv sensitiver Bäume der A Fläche dasjenige ist, das sich in ihrer Allelhäufigkeit von den drei weiteren Kollektiven distanziert. Allel B ist ca. 20% Punkte häufiger im Kollektiv sensitiv-A vertreten als in den restlichen 3 Kollektiven.

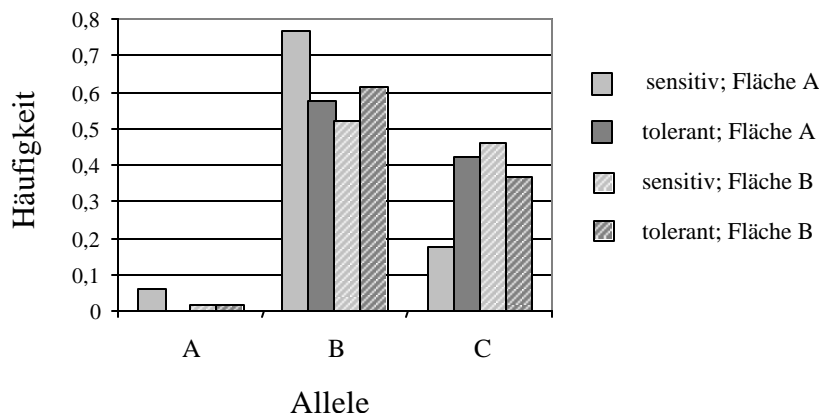


Abb. 4.3-5 Allelhäufigkeiten des EST-Markers PA0038.

Desweiteren zeigt bezüglich der Häufigkeiten der Genotypen keiner der 27 untersuchten nuklearen Marker Abweichungen zwischen toleranten und sensitiven Kollektiven.

Die Berechnung der Diversität von den Großkollektiven sensitiver und toleranter Individuen und der anschließende Permutationstest ergeben an keinem der einzelnen 8 DNA-Loci oder 19 Isoenzym-Genloci signifikante Unterschiede (vgl. *Anh. 8.4*). Aber die Betrachtung aller Isoenzym-Genmarker als Genpool erlaubt es, einen kleinen aber statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Großkollektiven zu identifizieren. Mit einem Diversitätswert von 1,14 liegt die Gruppe aller sensitiven Fichten über dem der toleranten mit nur 1,11.

#### • Quantifizierung genetischer Variation anhand von Chloroplastenmarkern

In den für diese Studie untersuchten 104 Fichten wurden 20 unterschiedliche Chloroplastentypen identifiziert. Nur sechs der Haplotypen, nämlich „223“, „613“, „614“, „622“, „623“ und „624“ werden von mehr als 5% der Fichten getragen. Über alle Kollektive hinweg betrachtet gehören mit 30% Haplotyp „623“ und mit 20% Haplotyp „614“ zu den am häufigsten auftretenden Typen.

Die globale Charakterisierung der einzelnen Kollektive, wie sie in *Tabelle 4.3-2* dargestellt ist, lässt keine bestimmten Trends zwischen gesunden und kranken Fichten erkennen. Die vorkommenden Unterschiede sind nicht gerichtet und widersprüchlich zwischen den zwei untersuchten Beständen. Diese Aussage trifft auf die Haplotypen-Vielfalt, aber auch auf die Diversität und Differenzierung zu. In der Versuchsfläche A wurden zwischen den sensitiven Fichten neun Haplotypen gefunden - einer weniger als unter den toleranten Bäumen. In der zweiten Versuchsfläche invertiert sich die Situation. Mit 11 Haplotypen war unter den toleranten Individuen ein Haplotyp weniger als im sensitiven Kollektiv zu finden. Diversität und Differenzierung sind gleichermaßen von ungleichen Tendenzen betroffen. In der Fläche A sind im toleranten Kollektiv die geringeren Werte vorzufinden, in der Fläche B im sensitiven Fichtenkollektiv. Vielfalt und Diversitätsmaße liegen insgesamt bei der Versuchsfläche A unter denen der B Fläche (vgl. *Tab. 4.3-2*).



Tab. 4.3-2 Durch Chloroplasten-Mikrosatelliten (*Pt26081+Pt63718+Pt71936*) nachgewiesene genetische Variation der untersuchten sensitiven und toleranten Fichtenkollektive. Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 26 Individuen pro Kollektiv.

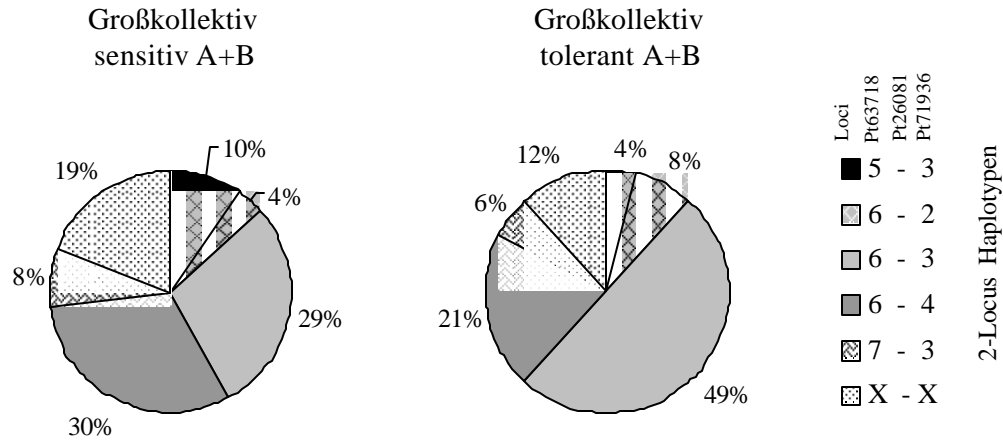
Variationsmaße	Fläche A		Fläche B	
	sensitiv	tolerant	sensitiv	tolerant
<b>Haplotypen</b>	<u>9</u>	10	12	<u>11</u>
<b>Diversität (<math>v_{\text{Haplotypen}}</math>)</b>	5,83	<u>4,57</u>	<u>5,83</u>	7,19
<b>Differenzierung (<math>d_{\text{T}_{\text{Haplotypen}}}</math>)</b>	0,86	<u>0,81</u>	<u>0,86</u>	0,90

Die Häufigkeiten, mit denen bestimmte Haplotypen in gesunden und kranken Fichten auftreten, unterscheiden sich statistisch nicht signifikant. Das gleiche Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Haplotypen-Diversität der beiden Großkollektive.

Dennoch, die Berechnungen der Diversität auf niedrigeren Ebenen, das heißt, einzelne cpSSR Loci oder die Kombination von nur zwei cpLoci, zeigen in einem Fall signifikante Unterschiede bezüglich der Diversität zwischen toleranten und sensitiven Großkollektiven. Bei Kombination der zwei Loci *Pt63718* und *Pt71936* zu Haplotypen ergibt sich folgendes Bild: das Großkollektiv sensitiver Fichten hat eine Diversität von 4,92 gegenüber den 3,23 des Großkollektivs toleranter Fichten. Die Differenz von 1,68 ist nach einem Permutationstest als signifikant ausgewiesen worden. In der *Abbildung 4.3-6* sind die Häufigkeiten der mit Loci *Pt63718* und *Pt71936* gebildeten Haplotypen zu sehen. In ihr ist zu erkennen, dass unter den toleranten Fichten der Haplotyp „6-3“ mit einem Anteil von 49% klar dominiert. Der nächst-häufige Typ in diesem Großkollektiv mit 21% ist Haplotyp „6-4“. Anders ist die Situation im Großkollektiv der sensitiven Fichten. Es gibt keinen dominierenden Typ, da „6-3“ und „6-4“ mit 30% bzw. 29% fast gleich häufig vorkommen.

Dass diese Veränderung der genetischen Struktur zwischen toleranten und sensitiven Kollektiven in beiden Versuchsflächen gleichermaßen stattfindet, kann von dem Dendrogramm in *Abbildung 4.3-6* abgeleitet werden. Der genetische Abstand, berechnet mit den zwei-Locus-Haplotypen, zeigt größere Abweichungen zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Schadensausprägung als zwischen den Flächen. Deshalb gruppieren sich einerseits sensitive Teilkollektive und andererseits tolerante Kollektiven miteinander.

Häufigkeit der 2-Locus-Haplotypen



Genetischer Abstand anhand der 2-Locus-Haplotypen

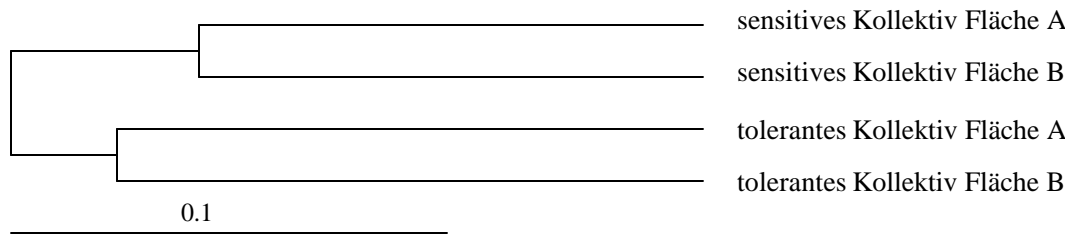


Abb. 4.3-6 Häufigkeit der 2-Locus-Haplotypen (*Pt63718* und *Pt71936*) sowie der als Dendrogramm dargestellte genetische Abstand zwischen den Fichtenkollektiven.

**4.3.2 Sensitive und tolerante Kollektive gegenüber SO<sub>2</sub>-Belastung**

Nach einer intensiven SO<sub>2</sub>-Belastung im Winter 95/96 wurden auf den Versuchsflächen Altenberg und Bärenfels Nadelverluste von ca. 50-60% (mittlere Nadelverluststufe = 2,82) über alle bonitierten Fichtenklone hinweg festgestellt. Zwischen den 24 am stärksten beschädigten (sensitiven) Klonen und den 24 vitalsten (toleranten) Klonen beider Versuchsflächen sind eindeutige Unterschiede bezüglich der durch SO<sub>2</sub>-Belastung verursachten Nadelverluste nachzuweisen (vgl. Abb. 4.3-7). In Bärenfels waren die Nadelverluste insgesamt etwas höher als in Altenberg.

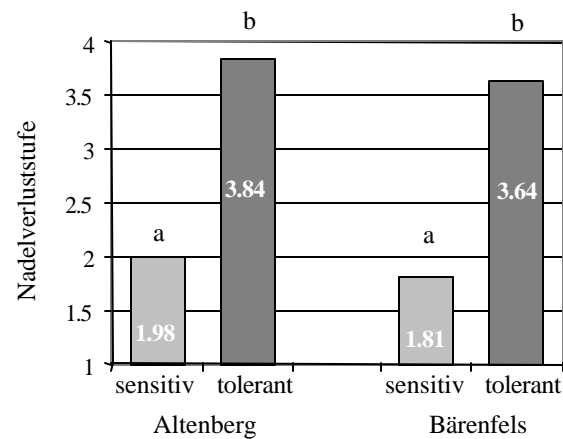


Abb. 4.3-7 Mittlere Nadelverluststufe von sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven. Nadelverluststufe : 4 = 0-25%; 3 = 26-50%; 2 = 51-75%; 1 = 76-100%; N= 26 Individuen pro Kollektiv; Mittelwerte, die sich statistisch nicht voneinander unterscheiden, sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet (t-Test).

#### • Quantifizierung genetischer Variation anhand von Kern-Markern

Betrachtet man die sensitivsten und tolerantesten Fichtenklone jeweils als Kollektive, so unterscheiden sie sich in ihrer genetischen Vielfalt nur geringfügig (vgl. Tab. 4.3-3). Diese Differenz sollte dennoch berücksichtigt werden, da es immer die toleranten Kollektive sind, die eine geringere allelische Vielfalt aufweisen. Auf der Versuchsfläche in Altenberg hat das tolerante Kollektiv im Durchschnitt 0,36 Allele pro Locus weniger. Etwas geringer fällt der Unterschied in Bärenfels (0,13 Allele pro Locus) aus. Die Kollektive toleranter Fichtenklone zeigen auch einen Verlust bei der genotypischen Vielfalt. Diese geringere Vielfalt beläuft sich in beiden Flächen auf 0,5 Genotypen pro Locus.

Bezüglich der Diversitäts- und Differenzierungsmaße unterscheiden sich sensitive und tolerante Kollektive. Allerdings sind auf beiden Versuchsflächen entgegengesetzte Tendenzen festzustellen. Während in der Versuchsfläche Altenberg die sensitiven Fichten eine höhere Diversität zeigen, sind es in der Versuchsfläche Bärenfels die toleranten Fichten, die eine höhere Diversität aufweisen. Die gleiche Tendenz ist sowohl auf Allel- wie auch Genotypenebene zu beobachten.

Als Mittelwert aller DNA-Marker-Loci beträgt der Unterschied zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven in der beobachteten Heterozygotie 7% Punkte in Altenberg und 1% Punkt in Bärenfels. Auf beiden Versuchsflächen sind die toleranten Individuen diejenigen, die eine geringere individuelle Multiplizität aufweisen. Der Fixierungsindex zeigt nur im Kollektiv der tolerante Fichten in Bärenfels einen leichten Homozygotenüberschuss von 10%.

Tab. 4.3-3 Genetische Variation (Genpool) in sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven auf der Basis von 8 DNA-Markern. Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 24 Individuen pro Kollektiv.

Variationsmaße	Altenberg		Bärenfels	
	sensitiv	tolerant	sensitiv	tolerant
Allele / Locus ( $N_A$ )	4,25	<u>3,89</u>	4,13	<u>4</u>
Genotypen / Locus ( $N_G$ )	6	<u>5,50</u>	6	<u>5,50</u>
Diversität ( $v_{Allele}$ )	2,01	<u>1,77</u>	<u>1,80</u>	1,99
Differenzierung ( $d T_{Allele}$ )	0,51	<u>0,44</u>	<u>0,45</u>	0,51
Diversität ( $v_{Genotypen}$ )				
Differenzierung ( $d T_{Genotypen}$ )	0,68	<u>0,61</u>	<u>0,60</u>	0,67
Beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ )	0,51	<u>0,44</u>	0,45	<u>0,44</u>
Bedingte Heterozygotie ( $H_c$ )	0,75	<u>0,74</u>	0,76	<u>0,63</u>
Fixierungsindex ( $F_{IS}$ )	0,02	<u>-0,01</u>	<u>0,03</u>	0,10

Die Betrachtung der beobachteten Heterozygotie an einzelnen Loci liefert ein sehr heterogenes Bild. Marker PA0002, PA0005 und PA0038 zeigen auf beiden Versuchsflächen eine geringere Heterozygotie in den toleranten Kollektiven. Alle anderen Markern liefern für Altenberg und Bärenfels entgegengesetzte Ergebnisse (vgl. Abb. 4.3-8).

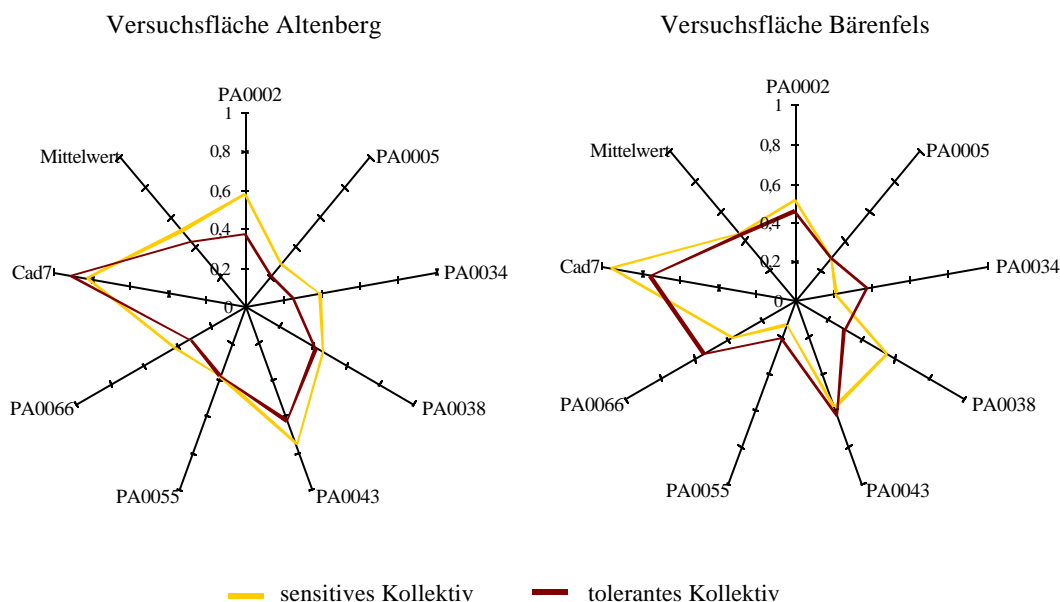


Abb. 4.3-8 Heterozygotenanteil in sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven.

Um mögliche Abweichungen der genetischen Struktur einzelner Genorte statistisch abzusichern, wurde der  $\chi^2$ -Test eingesetzt. Bei EST-Marker PA0034 und PA0055 konnten die entsprechenden Kollektive beider Flächen nicht für weitere Berechnungen ihrer

allelischen Strukturen zusammengefasst werden. Grund hierfür sind bei Marker PA0034 die toleranten Kollektive, die zwischen beiden Flächen signifikant voneinander abweichen. Bei PA0055 zeigen die sensitiven Kollektive beider Flächen eine signifikante Abweichung voneinander. Für diese beiden Marker wurden beide Versuchsflächen unabhängig voneinander ausgewertet, ohne dass signifikante Unterschiede in den Allelhäufigkeiten aufgetreten sind.

Von den weiteren 6 DNA-Markern zeigte nur PA0002 statistisch signifikante Häufigkeitsunterschiede der Allele zwischen den sensitiven und toleranten Großkollektiven. Auch bei den Genotyphäufigkeiten besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Großkollektiven. Aus *Abbildung 4.3-9* kann entnommen werden, dass der homozygote Genotyp AA in 9% aller sensitiven Fichten vorkommt. Dieser Anteil verdreifacht sich auf über 29% in den toleranten Fichten. Die Verschiebung der Häufigkeit des Auftretens des Genotyps AA wirkt sich auch auf den Heterozygotenanteil an diesem Locus aus. Er nimmt von 55% bei den sensitiven auf 42% bei den toleranten ab.

Auf die unterschiedlichen genetischen Strukturen am Locus PA0002 weist auch der genotypische Abstand hin. Ohne Berücksichtigung der Versuchsflächen beträgt der genotypische Abstand zwischen allen sensitiven und toleranten Individuen 20,7%. Die grafische Darstellung eines auf genotypischen Abständen basierenden Dendrogrammes (*vgl. Abb. 4.3-9*) zeigt, dass einerseits sensitive Kollektive und andererseits tolerante Kollektive beider Versuchsflächen Gruppen bilden. Die Differenzierung von sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven findet also sowohl in Altenberg wie auch in Bärenfels statt.

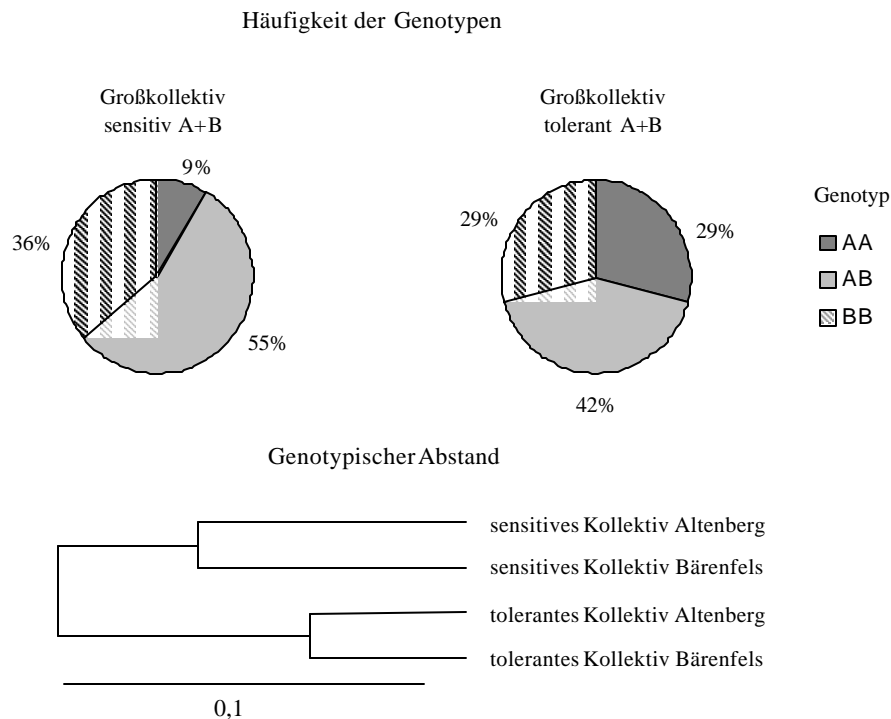


Abb. 4.3-9 Genotyphäufigkeiten des Markers PA0002 sowie die als Dendrogramm dargestellten genotypischen Abstände.

Die Berechnung der Diversität von den Großkollektiven sensitiver und toleranter Individuen und der anschließende Permutationstest ergeben nur für den angesprochenen Locus PA0002 statistisch signifikante Unterschiede (vgl. Anhang 8.4). Die Diversität der toleranten Fichten liegt an diesem Locus mit 2,00 über der Diversität der sensitiven Individuen mit 1,86.

• **Quantifizierung genetischer Variation anhand von Chloroplastenmarkern**

In den für diese Studie untersuchten 96 Fichten wurden 16 unterschiedliche Chloroplastentypen identifiziert. Nur drei der Haplotypen, nämlich „622“, „623“ und „624“ treten in Häufigkeiten von über 5% auf. Über alle Kollektive hinweg betrachtet ist Haplotyp „623“ mit 48% der am häufigsten auftretende Typ.

Die genetische Vielfalt wurde anhand des Auftretens verschiedener Haplotypen innerhalb der einzelnen Kollektive quantifiziert. Diesbezüglich ist kein eindeutiger Trend zwischen sensitiven und toleranten Klonkollektiven zu erkennen (vgl. Tab. 4.3-4). Im Gegensatz zur Haplotypenvielfalt sind an der Diversität und Differenzierung eindeutige Unterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven zu erkennen. Es sind die Kollektive der vitaleren Fichten, die eine höhere Diversität und Differenzierung aufweisen (vgl. Tab. 4.3-4).

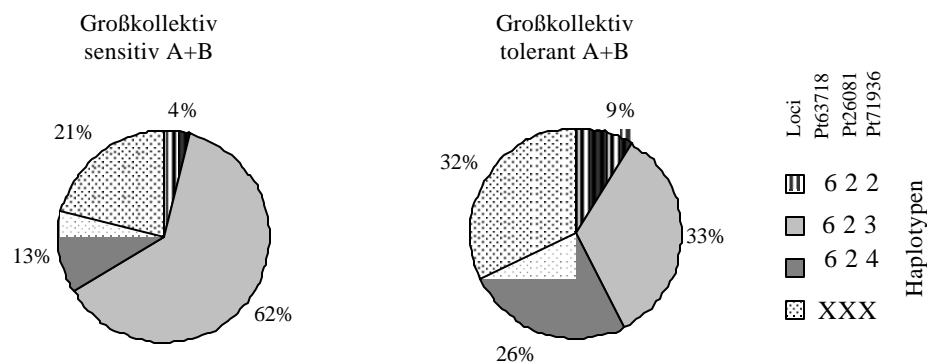
Die statistische Überprüfung der Haplotyphäufigkeiten ergab signifikante Unterschiede zwischen toleranten und sensitiven Großkollektiven. Wie im *Abbildung 4.3-10* zu erkennen ist, tragen 60% aller sensitiven Fichten den Haplotyp „623“. Als zweit häufigster Haplotyp tritt Haplotyp „624“ mit 13% auf. Demgegenüber tragen nur 34% der toleranten Individuen den Haplotyp „623“ und 26% den Typ „624“. Auch die weniger häufigen Typen nehmen bei den toleranten Fichten zu.

Tab. 4.3-4 Durch Chloroplasten-Mikrosatelliten (*Pt26081+Pt63718+Pt71936*) nachgewiesene genetische Variation der untersuchten sensitiven und toleranten Fichtenkollektive. Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 24 Individuen pro Kollektiv.

Variationsmaße	Altenberg		Bärenfels	
	sensitiv	tolerant	sensitiv	tolerant
<b>Haplotypen</b>	<u>8</u>	11	7	7
<b>Diversität (<math>v_{\text{Haplotypen}}</math>)</b>	<u>2,17</u>	5,69	<u>2,55</u>	3,69
<b>Differenzierung (<math>d T_{\text{Haplotypen}}</math>)</b>	<u>0,56</u>	0,86	<u>0,68</u>	0,76

Der genetische Abstand, berechnet anhand der Haplotypen, beträgt 41% zwischen dem Großkollektiv sensitiver und toleranter Fichten. Aus dem Dendrogramm in *Abbildung 4.3-10* geht hervor, dass sensitive Kollektive beider Versuchsflächen eine Gruppe bilden und die toleranten Kollektive sich in einer zweiten Gruppe zusammenfügen. Das verdeutlicht, dass die vorgestellten Befunde unabhängig von den Versuchsflächen sind.

## Häufigkeit der Haplotypen



## Genetischer Abstand anhand der Haplotypen

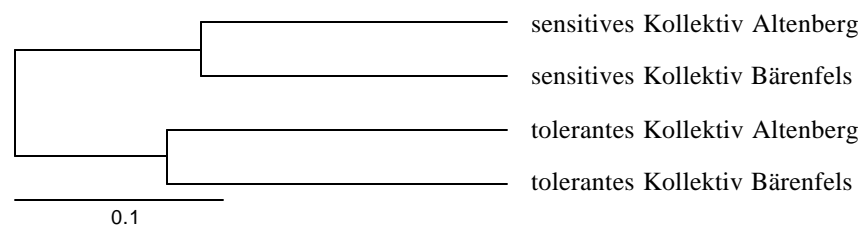


Abb. 4.3-10 Haplotyphäufigkeiten sowie der als Dendrogramm dargestellte genetische Abstand zwischen den Fichtenkollektiven anhand der Haplotypen.

Aus der Berechnung der Diversität der 3-Locus-Haplotypen beider Großkollektive ergeben sich Werte von 2,41 für die sensitiven und 4,90 für die toleranten Fichten. Die daraus resultierende Differenz von 2,49 ist statistisch hochsignifikant (Permutationstest;  $\alpha < 1\%$ ; vgl. Anhang 8.4). Auch an den 2-Locus-Haplotypen Kombinationen *Pt63718*+*Pt71936* und *Pt26081*+*Pt71936* sowie an dem Locus *Pt26081* lassen sich hochsignifikante bzw. signifikante Diversitätsunterschiede zwischen toleranten und sensitiven Großkollektiven erkennen (vgl. Anhang 8.4).

#### 4.3.3 Sensitive und tolerante Kollektive gegenüber Streusalzbelastung

In dem von erheblichen Salzschäden betroffenen Mönichswald wurden in zwei benachbarten Fichtenbeständen (Fläche ANA und ANB) je 35 Paare sensitiver und toleranter Individuen untersucht. Von den ausgewählten Bäumen wurden nicht nur Knospen für die genetischen Untersuchungen herangezogen, sondern auch Nadeln des letzten Jahrganges zur Analyse der Chloridbelastung.

Die für ein Kollektiv als Mischprobe untersuchten Nadeln ergeben eindeutige Unterschiede in ihrem Chloridgehalt. Zwar zeigen sowohl sensitive wie auch tolerante Fichtenkollektive gegenüber unbelasteten Bäumen einen erhöhten Chloridgehalt auf, (vgl. Abb. 4.3-11) aber bei den Nadeln der sensitiven Individuen lässt sich drei (Fläche ANA) bis vier ein halb (Fläche ANB) mal mehr CI als in den toleranten Bäumen feststellen. Nadeluntersuchungen, die an 10 Einzelbäumen der Fläche ANA erfolgten, belegen die Übereinstimmung der optischen Schadensansprache mit dem CI Gehalt der Nadeln. Während bei fünf Individuen, die klare Salzsadensymptome zeigen (sensitiv) zwischen 1,51mg/g bis 3,53mg/g CI nachweisbar sind, können bei den fünf vitalen Fichten lediglich 0,34 mg/g bis 0,77 mg/g CI in den Nadeln festgestellt werden (BAYERISCHEN LANDESANSTALT FÜR WALD UND FORSTWIRTSCHAFT - SACHGEBIET II).

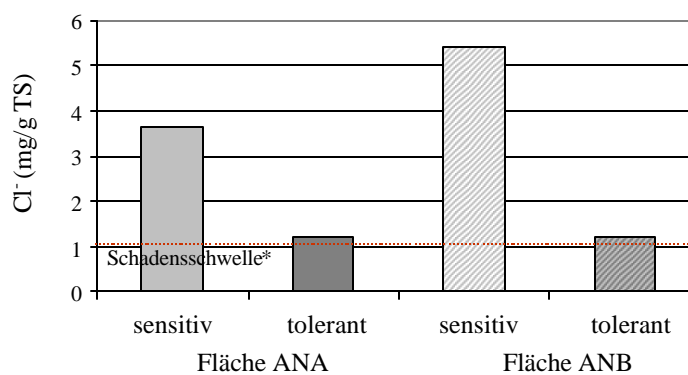


Abb. 4.3-11 Salzgehalt an Nadelmischproben sensitiver und toleranter Fichtenkollektive.  
\* BAYERISCHEN LANDESANSTALT FÜR WALD UND FORSTWIRTSCHAFT - SACHGEBIET II.

### • Quantifizierung genetischer Variation anhand von Kern-Markern

Wie schon in den Fallstudien zuvor kamen auch bei diesen Untersuchungen sowohl Isoenzym-Genmarker wie auch DNA-Marker zum Einsatz. *Tabelle 4.3-5* verschafft einen Überblick der Ergebnisse der durchgeführten genetischen Untersuchung. In ihr sind für jede Markerklasse und jeden Fichtenkollektiv die über mehrere Loci hinweg gemittelten Werte genetischer Vielfalt und Diversität aufgeführt. Bezüglich der genetischen Vielfalt ist zu bemerken, dass die Unterschiede zwischen den Teilkollektiven gering ausfallen. Die Anzahl Allele pro Locus in den zwei Versuchsflächen zeigt keinen einheitlichen Trend (vgl. *Tab. 4.3-5*). Anders hingegen ist es bei Betrachtung der vorhandenen Genotypen. Auch wenn die Differenz der genotypischen Vielfalt zwischen Kollektiven nur bei 1 bis 0,05 Genotyp/Locus liegt, sind diese Unterschiede gerichtet. Auf beiden Untersuchungsflächen sind es die Kollektive toleranter Fichten, in denen sich weniger Genotypen finden lassen. Dieses trifft sowohl für die Isoenzym- wie auch DNA-Marker zu.

Weitere Trends, die auch von beiden Markertypen gestützt werden, liegen in den Diversitätsmaßen vor. Die allelische und genotypische Diversität fällt auf Fläche ANA und



ANB für die toleranten Individuen geringer aus (vgl. Tab. 4.3-5). Diese Unterschiede werden auch von dem zwischen 0 und 1 genormten Differenzierungsmaß wiedergespiegelt. Lediglich auf der Fläche ANA wird mit Isoenzymen ein gleich hoher Grad an Differenzierung innerhalb der toleranten und sensitiven Kollektive beschrieben.

Tab. 4.3-5 Genetische Variation (Genpool) in sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven auf der Basis von 8 DNA-Markern und 19 Isoenzym-Genloci. Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 35 Individuen pro Kollektiv.

Variationsmaße	Marker	Fläche ANA		Fläche ANB	
		sensitiv	tolerant	sensitiv	tolerant
<b>Allele / Locus (<math>N_A</math>)</b>	DNA	<u>4,25</u>	4,38	4,38	<u>3,62</u>
	Isoenzyme	<u>2,37</u>	2,42	2,37	<u>2,37</u>
<b>Genotypen / Locus (<math>N_G</math>)</b>	DNA	7,50	<u>7,13</u>	7,38	<u>6,38</u>
	Isoenzyme	3,21	<u>3,16</u>	3,11	<u>3,00</u>
<b>Diversität (<math>v_{Allele}</math>)</b>	DNA	2,08	<u>1,91</u>	1,96	<u>1,87</u>
	Isoenzyme	1,31	<u>1,30</u>	1,32	<u>1,30</u>
<b>Diferenzierung (<math>d T_{Allele}</math>)</b>	DNA	0,53	<u>0,48</u>	0,50	<u>0,47</u>
	Isoenzyme	0,24	0,24	0,25	<u>0,24</u>
<b>Diversität (<math>v_{Genotypen}</math>)</b>	DNA	2,98	<u>2,56</u>	2,70	<u>2,48</u>
	Isoenzyme	1,51	<u>1,47</u>	1,50	<u>1,47</u>
<b>Diferenzierung (<math>d T_{Genotypen}</math>)</b>	DNA	0,68	<u>0,63</u>	0,65	<u>0,61</u>
	Isoenzyme	0,33	0,33	0,34	<u>0,33</u>
<b>Beobachtete Heterozygotie (<math>H_o</math>)</b>	DNA	0,48	<u>0,41</u>	0,48	<u>0,38</u>
	Isoenzyme	0,19	0,19	0,22	<u>0,21</u>
<b>Bedingte Heterozygotie (<math>H_c</math>)</b>	DNA	0,66	<u>0,65</u>	0,71	<u>0,57</u>
	Isoenzyme	0,56	<u>0,54</u>	0,64	0,64
<b>Fixierungsindex (<math>F_{IS}</math>)</b>	DNA	<u>0,06</u>	0,12	<u>0,01</u>	0,17
	Isoenzyme	<u>0,18</u>	0,21	<u>0,04</u>	0,11

In der Ermittlung der Heterozygotiemaße der vier verschiedenen Genpools ist ein unterschiedliches Verhalten der Markertypen (Isoenzyme gegenüber DNA-Marker) zu verzeichnen. Isoenzym-Genmarker zeigen nur eine geringe Variation der mittleren beobachteten Heterozygotie. Diese bewegt sich zwischen 19% für beide Teilkollektive der Fläche ANA und 21% bzw. 22% für die toleranten bzw. sensitiven Fichten der Fläche ANB. Damit unterscheiden sich die untersuchten Flächen ANA und ANB in ihrem mittleren Heterozygotiegrad stärker voneinander, als sensitive und tolerante Teilkollektive einer Versuchsfläche. Der Unterschied zwischen den Versuchsflächen ist auch am Fixierungsindex zu erkennen. Während in der Fläche A ein Homozygotenüberschuss von 18% bis 21% vorhanden ist, beträgt dieser in Fläche B nur 4% bis 11%.

Im Gegensatz zu den Isoenzym-Genmarkern weisen die mit DNA-Markern ermittelten Heterozygotienmaße zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen toleranten und sensitiven Fichtenkollektiven auf (vgl. Tab. 4.3-5 und Abb. 4.3-12). Es sind die toleranten Teilkollektive, die eine geringere individuelle genetische Variation vorweisen. Die vitalen Fichten der Fläche ANA liegen mit ihrem Mittelwert der beobachteten Heterozygotie von 41% um 7% Punkte unter dem der erkrankten Fichten ( $F_{IS} = 6\%$  vs.  $12\%$ ). Auf der zweiten Fläche (ANB) ist der Unterschied zwischen toleranten und sensitiven Kollektiven mit 10% Punkten noch markanter ( $38\%$  zu  $48\%$ ;  $F_{IS} = 1\%$  vs.  $17\%$ ; vgl. Tab. 4.3-5).

Die im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Ergebnisse können auch bei der Betrachtung der individuellen Heterozygotiegrade nachvollzogen werden. Aus der Abbildung 4.3-12 geht hervor, dass der Anteil an Fichten, die mehr als drei der acht untersuchten DNA-Loci im heterozygoten Zustand besitzen, bei den sensitiven Kollektiven höher als bei den toleranten Kollektiven ist. 57% der sensitiven Individuen auf Fläche ANA und 63% der beschädigten Fichten auf Fläche ANB weisen mehr als drei heterozygot besetzte Loci auf. Hingegen sind es unter den vitalen Bäumen nur 39% (ANA) bzw. 37% (ANB), die eine Mischerbigkeit an mehr als drei Loci zeigen. Die Betrachtung der gleichen Heterozygotiestufe (mehr als drei heterozygote Loci) bei den 19 Isoenzym-Genloci liefert den gleichen Trend hin zu einer geringeren Heterozygotie der toleranten Fichten (vgl. Abb. 4.3-12). Bei dem Vergleich der Versuchsflächen zeigt sich folgender Trend: Kollektive, die vom älteren Fichtenbestand stammen (ANA), haben einen Anteil von 51% bzw. 47% (sensitiver bzw. toleranter Kollektiv) an Fichten mit über drei heterozygoten Isoenzym-Genloci. Dieser Anteil erhöht sich in den Kollektiven des jüngeren Fichtenbestandes (ANB) auf 71% bzw. 63% (sensitiver bzw. toleranter Kollektiv).

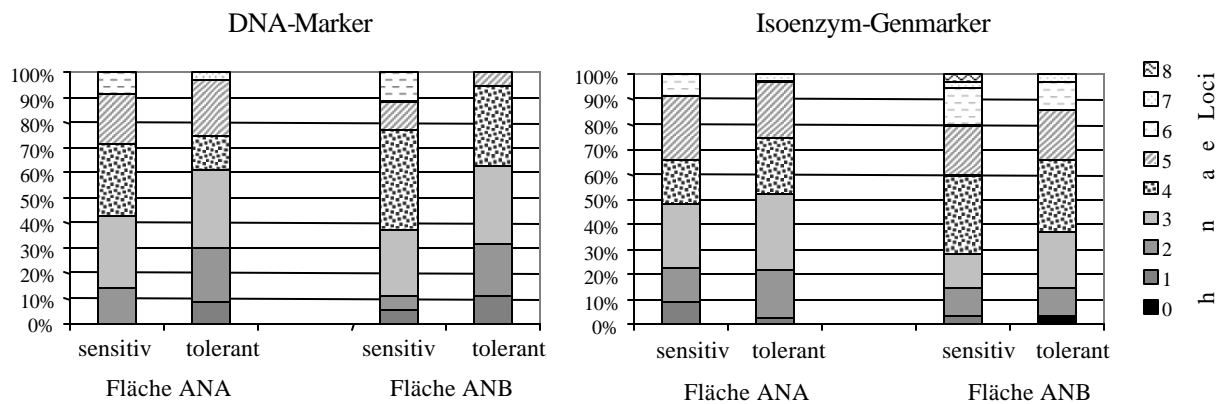


Abb. 4.3-12 Häufigkeitsverteilung der individuellen Heterozygotie in sensitiven und toleranten Kollektiven an 8 DNA-Markern bzw. 19 Isoenzym-Genmarkern.

Abbildung 4.3-13 erlaubt einen Einblick in die Heterozygotie an jedem einzelnen Locus. Bis auf eine Ausnahme (PA0055) werden in den toleranten Kollektiven mit keinem der DNA-Marker die Heterozygotiewerte der sensitiven Individuen erreicht. Sie unterstützen somit die

Aussage einer geringeren Heterozygotie innerhalb der toleranten Kollektive. Die erwähnte Ausnahme ist Marker PA0055, bei dem in beiden Versuchsflächen unter den toleranten Fichten höhere Heterozygotiegrade vorzutreffen sind (vgl. Abb. 4.3-13). Isoenzym-Genloci zeigen ein sehr uneinheitliches Bild. Einzelne Loci (LAP-A; SKD-H; NDH-B und AAT-C) zeigen eine erhöhte Heterozygotie bei den Kollektiven toleranter Fichten. Hingegen sind andere Loci (PGI-B, AAP-B und 6PGDH-C) bei den sensitiven Fichten häufiger mit zwei Allelen besetzt.

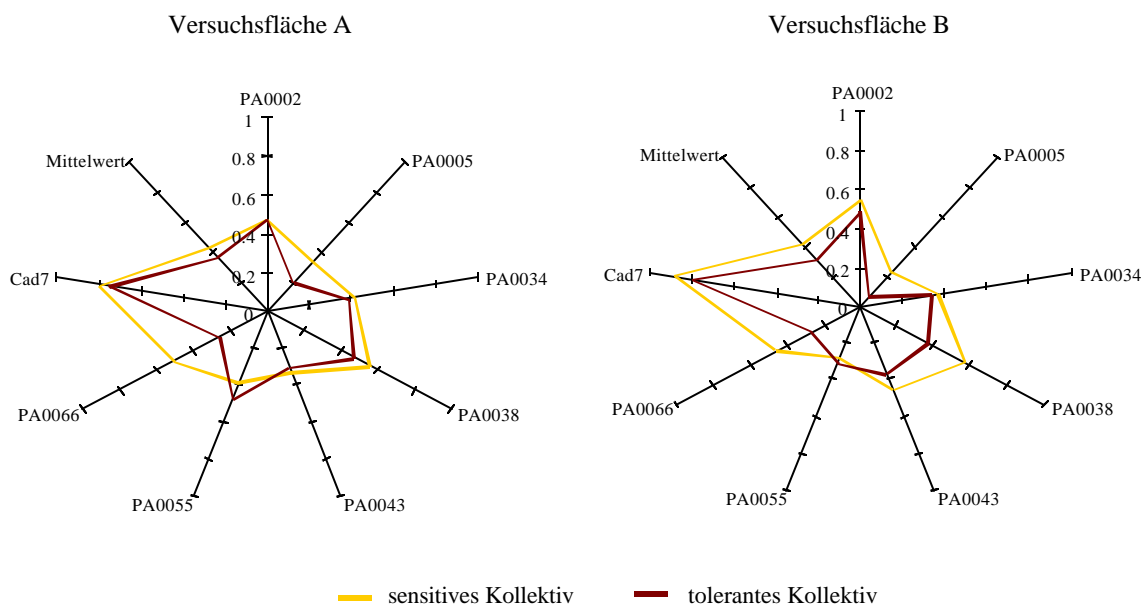


Abb. 4.3-13 Vergleich der Heterozygotenanteile zwischen sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven gemessen an den DNA-Markern.

Die statistische Prüfung der allelischen und genotypischen Häufigkeiten sensitiver und toleranter Kollektive ergeben für keinen der 19 untersuchten Isoenzym-Genmarker signifikante Differenzen. Ein anderes Bild bieten die acht verwendeten DNA-Marker. Hier zeigen zwei Marker, PA0005 und PA0066, signifikante Unterschiede in der Häufigkeit, mit der bestimmte Allele bei toleranten und sensitiven Großkollektiven auftreten. Die signifikanten Unterschiede setzen sich auf Genotypebene fort. Dass es zur Abweichung der Allel- und Genotyphäufigkeiten zwischen sensitiven und toleranten Teilkollektiven in beiden Versuchsflächen kommt, ist der *Abbildung 4.3-14* zu entnehmen. Die Häufigkeitsunterschiede steigen weiter an, wenn beide Loci gemeinsam als Multilocustypen ausgewertet werden. Unter der gemeinsamen Betrachtung der toleranten Kollektive beider Flächen (ANA+ANB) ist festzustellen, dass der doppelthomozygote AA-BB (PA0005-PA0066) mit einem 63% igen Anteil der eindeutig dominante Typ ist. Gefolgt wird er erst mit einem 17% igem Anteil von dem Multilocustypen AA-BD (PA0005-PA0066; vgl. *Abb. 4.3.15*). Im Gegensatz dazu

kommt im Großkollektiv der zusammengefassten sensitiven Kollektive der doppelhomozygote Typ AA-BB (PA0005-PA0066) nur in 31% der Fichten vor. Mit 27% Häufigkeit ist der Multilocusgenotyp AA-BD (PA0005-PA0066) der zweit häufigste Genotyp dieses Kollektivs.

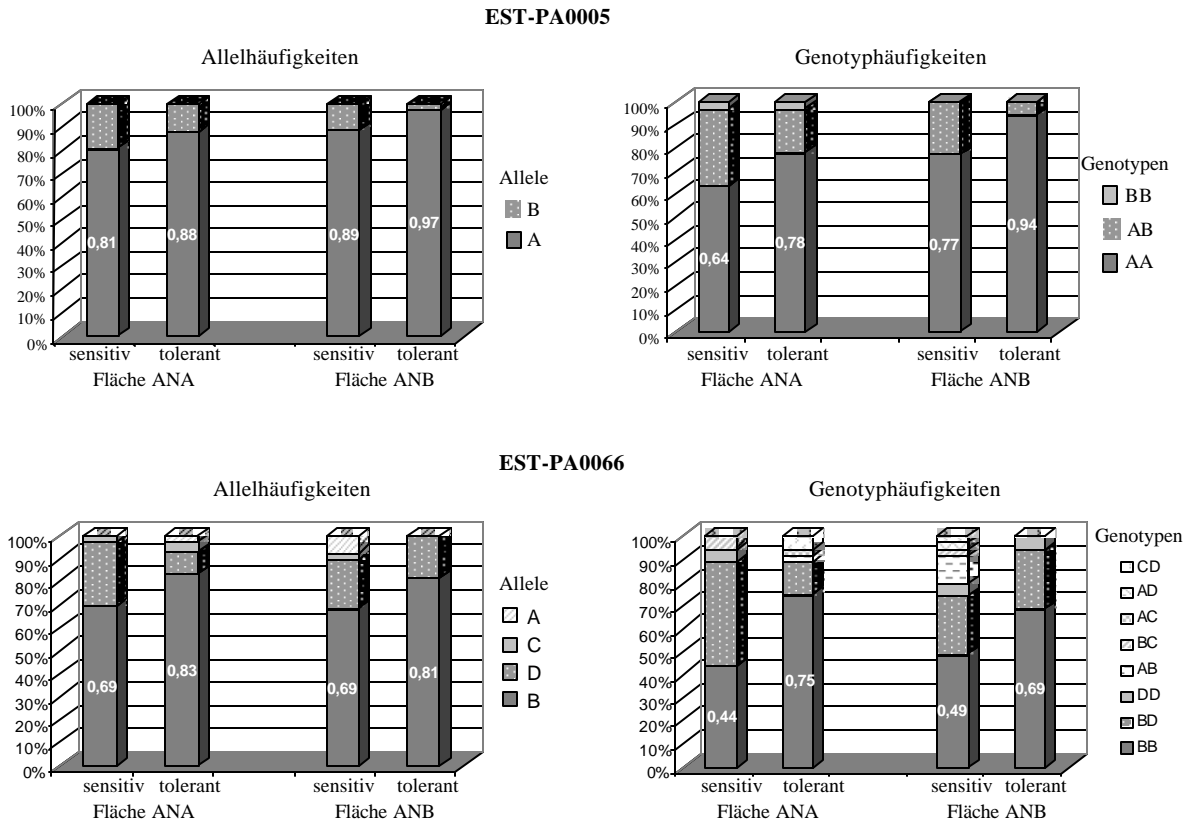


Abb. 4.3-14 Unterschiede in den Allel- und Genotyphäufigkeiten der DNA-Marker PA0005 und PA0066 zwischen toleranten und sensitiven Teilkollektiven.

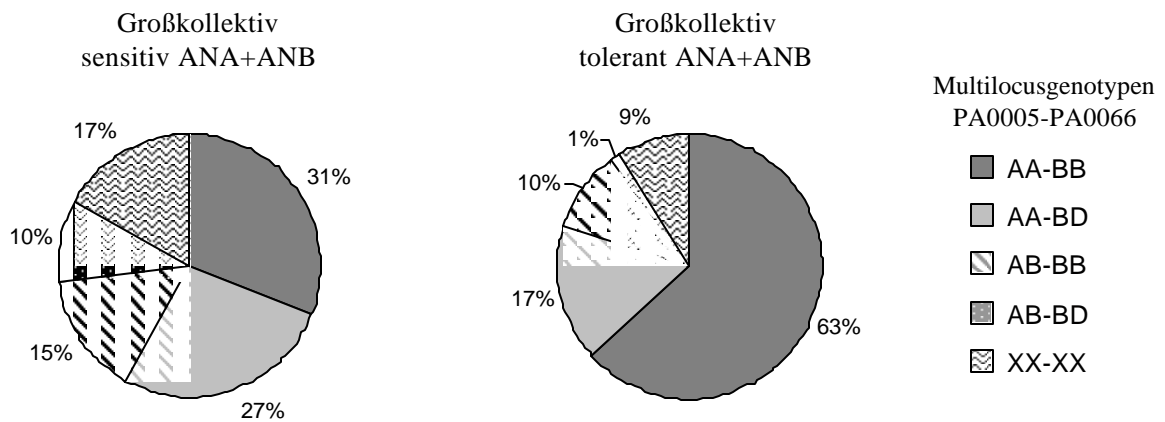


Abb. 4.3-15 Häufigkeit der Multilocusgenotypen (PA0005-PA0066) in den Großkollektiven sensitiver und toleranter Fichten. N= 70 Individuen pro Großkollektiv; Die Multilocusbezeichnung XX-XX fasst neun Genotypen mit Einzelhäufigkeiten < 5% zusammen.

Der hohe Anteil doppelhomozygoter AA-BB Typen unter den toleranten Individuen hat auch eine direkte Auswirkung über die Heterozygotie in den Kollektiven. Werden nur die Marker PA0005 und PA0066 ausgewertet, beträgt die Heterozygotie bei dem Großkollektiv sensitiver Fichten 38% und fällt bei den toleranten Großkollektiv auf 19% zurück.

Zur Quantifizierung der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen der Großkollektiven wird das Maß der genetischen Abstände (D) von GREGORIUS (1974) eingesetzt. Aus *Tabelle 4.3-6* geht hervor, dass auf Allel-Ebene der größte genetische Abstand zwischen beschädigten und vitalen Fichten vom Marker PA0066 nachgewiesen wird. An diesem Locus unterscheiden sich die allelischen Strukturen beider untersuchten Großkollektive zu 13,4%. Dieser liegt 5% Punkte über dem ermittelten Abstand anhand der restlichen sechs DNA-Markern und 10% Punkte über dem mit 19 Isoenzym-Genmarkern berechneten Genpoolabstand (*vgl. Tab. 4.3-6*). Bei Erhöhung der Betrachtungsebene auf Genotypen bzw. Multilocustypen nimmt der genetische Abstand erwartungsgemäß zu. Zwischen den analysierten Großkollektiven ist der größte genetische Abstand, nämlich 35,8%, bei der gemeinsamen Auswertung der Marker PA0005 und PA0066 als Multilocusgenotypen zu finden

Tab. 4.3-6 Genetische Abstände zwischen den Großkollektiven sensitiver und toleranter Fichten. N= 70 Individuen pro Großkollektiv; In der Berechnung des genetischen Abstandes des DNA-Loci Genpools sind alle Marker außer PA0005 und PA0066 berücksichtigt.

Marker	Betrachtungsebene	genetischer Abstand
<b>PA0005</b>	D <sub>(Allele)</sub>	7,7%
	D <sub>(Genotypen)</sub>	15,5%
<b>PA0066</b>	D <sub>(Allele)</sub>	13,4%
	D <sub>(Genotypen)</sub>	28,2%
<b>PA0005+PA0066</b>	D <sub>(Multilocus)</sub>	35,8%
<b>Genpool (19 Isoenzym-Genloci)</b>	D <sub>(Allele)</sub>	3,3%
<b>Genpool (6 DNA-Loci)</b>	D <sub>(Allele)</sub>	8,3%

Unter den Isoenzym-Genmarkern zeigt der Locus LAP-B den größten Diversitätsunterschied zwischen den sensitiven und toleranten Großkollektiven an. Das letztere ist dasjenige, das eine geringere Diversität besitzt (1,65 gegenüber 1,87; *vgl. Anhang 8.4*). Dieses Ergebnis, so wie auch alle weiteren Diversitätsunterschiede, die für jeden Isoenzym-Genloci berechnet werden, halten einem Permutationstest nicht stand und sind daher als nicht signifikant einzustufen (*vgl. Anhang 8.4*).

Beim Vergleich der Diversitätsunterschiede, die anhand der DNA-Marker nachgewiesen wurden, ergibt der Permutationstest im Fall der EST-Marker PA0005 und PA0066 signifikante ( $\alpha < 3\%$ ) bzw. hochsignifikante ( $\alpha < 1\%$ ) Unterschiede. Bedingt durch das stärkere Vorherrschen des häufigsten Allels in den toleranten Kollektiven, die zu Lasten anderer seltener Allele geht (*vgl. Abb. 4.3-14*), ist in dieser Gruppe von Bäume ein Diversitätsverlust

zu verzeichnen. Diese Aussage trifft auf beide angesprochenen Marker zu, auch wenn in unterschiedlichem Maße. Die geringere Diversität, die von Marker PA0005 in dem toleranten Großkollektiv beschrieben wird, beläuft sich auf 0,19 (von 1,36 auf 1,17). Mit 0,43 (von 1,86 auf 1,43) ist die von Marker PA0066 beschriebene Differenz zwischen toleranten und sensitiven Großkollektiven noch markanter.

Die gemeinsame Betrachtung aller 8 DNA-Loci, die durch die Genpooldiversität gegeben ist, weist auch einen signifikanten ( $\alpha < 4\%$ ) Unterschied zwischen den Großkollektiven nach. Die Genpooldiversität der Gruppe, in der alle stark beschädigten Bäume zusammengefasst sind, beträgt 2,03, dagegen beläuft sich das gleiche Maß für die Gruppe vitaler Fichten auf 1,90.

**• Quantifizierung genetischer Variation anhand von Chloroplastenmarkern**

Unter den 140 untersuchten Fichten in den Versuchsflächen des Mönichswaldes konnten durch Kombination der Varianten aller drei eingesetzten cpSSR 20 verschiedene Haplotypen identifiziert werden. Die meisten dieser Typen (85%) kommen nur mit einer unter 5% liegenden Häufigkeit vor. Die wichtigsten Befunde zu den einzelnen Teilkollektiven, die in dieser Studie mit den cpSSR analysiert werden, sind in *Tabelle 4.3-7* aufgeführt.

Bezüglich der haplotypischen Vielfalt ist auffallend, dass in den Kollektiven der sensitiven Fichten (ANA-S und ANB-S) weniger Haplotypen auftreten. Den neun bzw. acht gefundenen Haplotypen in den Gruppen beschädigter Fichten (ANA-S bzw. ANB-S) stehen elf bzw. zehn Haplotypen der gesunden Bäume (ANA-T bzw. ANB-T) gegenüber. Das an sensitiven Fichten erkannte geringere Maß an Variation der Chloroplasten setzt sich auch bei der Berechnung der Diversität und Differenzierung fort. Allerdings sind die Unterschiede zwischen toleranten und sensitiven Kollektiven auf der Versuchsfläche ANA größer als im Bestand ANB. Beispielsweise entspricht die Diversität von dem sensitiven Kollektiv der Fläche ANA nur zu 47% der Diversität, die im Teilkollektiv vitaler Fichten der gleichen Fläche festgestellt wird. Wenn der gleiche Vergleich auf der Fläche ANB durchgeführt wird, entspricht die Diversität der sensitiven zu 91% der der toleranten (*vgl. Tab. 4.3-7*).

Tab. 4.3-7 Durch Chloroplasten-Mikrosatelliten (*Pt26081+Pt63718+Pt71936*) nachgewiesene genetische Variation der untersuchten sensitiven und toleranten Fichtenkollektive. Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 35 Individuen pro Kollektiv.

Variationsmaße	Fläche ANA		Fläche ANB	
	sensitiv	tolerant	sensitiv	tolerant
<b>Haplotypen</b>	<u>9</u>	11	<u>8</u>	10
<b>Diversität (<math>v_{\text{Haplotypen}}</math>)</b>	<u>1,92</u>	4,10	<u>2,04</u>	2,23
<b>Differenzierung (<math>d_{\text{T}_{\text{Haplotypen}}}</math>)</b>	<u>0,49</u>	0,78	<u>0,52</u>	0,57

Nach Bestimmung der Häufigkeit, mit der einzelne Haplotypen von allen vitalen bzw. beschädigte Fichten getragen werden, können keine statistisch abgesicherten Unterschiede zwischen den Großkollektiven verschiedener Schadensausprägung festgestellt werden. Dennoch ist eine beachtliche Verschiebung der Häufigkeiten zu beobachten. Wie in *Abbildung 4.3-16* zu sehen ist, besitzen 72% aller sensitiven Bäume (entspricht 49 von 70 Individuen) den sogenannten Haplotyp „623“. Unter den toleranten Fichten sind nur noch 54% (entspricht 38 von 70 Individuen) der Bäume mit dem Haplotyp „623“ versehen.

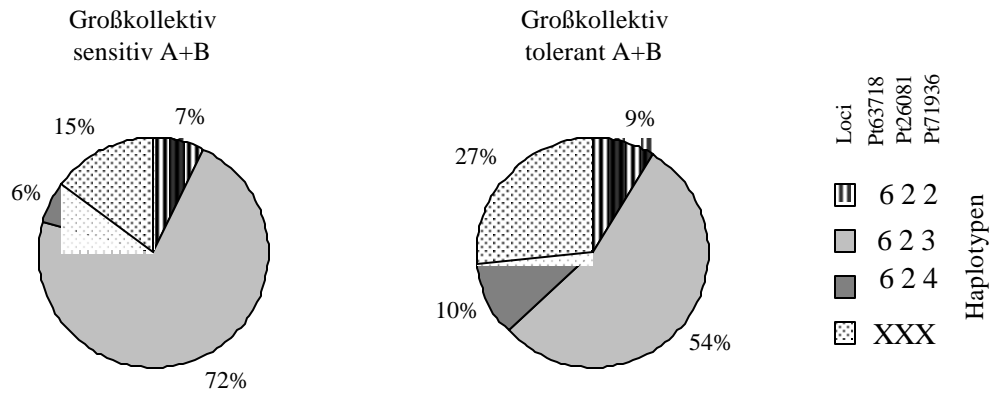


Abb. 4.3-16 Häufigkeit der Haplotypen in den Großkollektiven sensibler und toleranter Fichten. Die Bezeichnung XXX fasst Haplotypen mit Häufigkeiten unter 5% zusammen.

Die gezeigte geringere Vielfalt an Haplotypen in den sensitiven Teilkollektiven und die oben angesprochene Vorherrschaft des Haplotyps „623“ unter allen sensitiven Individuen steht in direkter Verbindung mit der für den Großkollektiv sensitiv berechneten niedrigen Diversität von 1,94. Entsprechende Berechnungen für den Großkollektiv toleranter Fichten liefern einen Diversitätswert von 3,06. Die stark kontrastierenden Werte ergeben einen signifikanten Unterschied, der von einem Permutationstest bestätigt wird ( $\alpha < 2\%$ ; vgl. *Anhang 8.4*).

### 4.4 Pilotstudie an Tief- und Hochlagenfichten in Berchtesgaden

Für die Untersuchung wurden innerhalb des Naturreservates Berchtesgaden zwei Populationen (je 48 Individuen) beprobt, die sich in ihrer Höhenlage um 1000 Meter unterscheiden.

• **Quantifizierung genetischer Variation anhand von Kern-Markern**

Die Ergebnisse der genetischen Untersuchung, dargestellt in *Tabelle 4.4-1* für die Genpools, zeigen eine große Übereinstimmung beider nuklearen Markerklassen. Bis auf die Anzahl-Genotypen pro Locus und der bedingten Heterozygotie werden alle Trends bezüglich genetischer Variationsmaße sowohl von Isoenzymen wie auch von den kodominanten DNA-Markern getragen (vgl. *Tab. 4.4-1*).

Tab. 4.4-1 Genetische Variation (Genpool) in Fichtenpopulationen der Tief- und Hochlagen auf der Basis von 8 DNA-Markern und 13 Isoenzym-Genloci. Jeweils die kleinsten Werte innerhalb einer Versuchsfläche sind unterstrichen; N= 48 Individuen pro Population.

Variationsmaße	Marker	Fichtenpopulation	
		Tieflage	Hochlage
<b>Allele / Locus</b>	DNA	4,25	<u>4,13</u>
	Isoenzyme	2,08	<u>1,85</u>
<b>Genotypen / Locus</b>	DNA	<u>7,38</u>	7,88
	Isoenzyme	2,54	<u>2,46</u>
<b>Diversität (<math>v_{\text{Allele}}</math>)</b>	DNA	<u>1,83</u>	1,91
	Isoenzyme	<u>1,26</u>	1,29
<b>Differenzierung (<math>d T_{\text{Allele}}</math>)</b>	DNA	<u>0,46</u>	0,48
	Isoenzyme	<u>0,21</u>	0,23
<b>Diversität (<math>v_{\text{Genotypen}}</math>)</b>	DNA	<u>2,59</u>	2,65
	Isoenzyme	<u>1,41</u>	1,43
<b>Differenzierung (<math>d T_{\text{Genotypen}}</math>)</b>	DNA	<u>0,63</u>	0,64
	Isoenzyme	<u>0,30</u>	0,31
<b>Beobachtete Heterozygotie (<math>H_o</math>)</b>	DNA	<u>0,44</u>	0,46
	Isoenzyme	<u>0,18</u>	0,24
<b>Bedingte Heterozygotie (<math>H_c</math>)</b>	DNA	0,80	<u>0,79</u>
	Isoenzyme	<u>0,58</u>	0,71
<b>Fixierungsindex (<math>F_{IS}</math>)</b>	DNA	<u>0,02</u>	0,05
	Isoenzyme	0,17	<u>-0,10</u>
<b>Genetischer Abstand (<math>D_{\text{Allele}}</math>)</b>	DNA		0,069
	Isoenzyme		0,044



Zu den angesprochenen Trends gehört die allelische Vielfalt. Insgesamt konnten in den 48 Tieflagenfichten 34 Allele mit den 8 DNA-Markern und 27 mit den 13 Isoenzym-Genloci identifiziert werden. Hingegen wurden in der hochgelegenen Population für die gleichen molekularen Marker ein bzw. drei (DNA-Markern bzw. Isoenzyme) Allele weniger nachgewiesen. Bezogen auf die Vielfalt auf Ebene der Genotypen zeigen einerseits Isoenzyme weniger Varianten unter den Hochlagenfichten und andererseits beschreiben die DNA-Marker in der gleichen Population mehr Genotypen als in den Tieflagenfichten (vgl. Tab. 4.4-1).

Bezüglich der Diversität und Differenzierung beider untersuchter Populationen weisen Tieflagen niedrigere Werte sowohl auf Allel- wie auch auf Genotypebene auf. Die Unterschiede zwischen beiden Flächen sind nicht groß, aber übereinstimmend für DNA- und Isoenzym-Genmarker. Dies ist bei der Differenzierung gut zu erkennen. Für beide Markertypen unterscheiden sich die Flächen auf Allelebene um 2% Punkte und auf Genotypebene um 1% Punkt.

Die beobachtete Heterozygotie, ermittelt an den acht DNA-Markern, beträgt 44% für die Tieflagenfichten und 46% für die Hochlagenpopulation. Die Differenz zwischen beiden Flächen ist gemessen an den Isoenzym-Genloci größer, sie bewegt sich zwischen 18% und 24% für Tief- bzw. Hochlagenfichten. Die Variation in der Heterozygotie kann auch in *Abbildung 4.4-1* nachvollzogen werden. In ihr ist die individuelle Heterozygotie grafisch für beide Populationen dargestellt. Der Anteil an Fichten, die mehr als zwei Isoenzym-Genloci im Heterozygotenzustand vorweisen, liegt mit 40% in der tiefen Lage weit unter den 67% der höheren Lage. Dieser Trend setzt sich in den DNA-Loci fort, wenn auch nicht so markant. 74% bzw. 81% (Tief- bzw. Hochlagenfichten) der untersuchten Bäume haben an mehr als zwei DNA-Loci verschiedene Allele (vgl. *Abb. 4.4-1*).

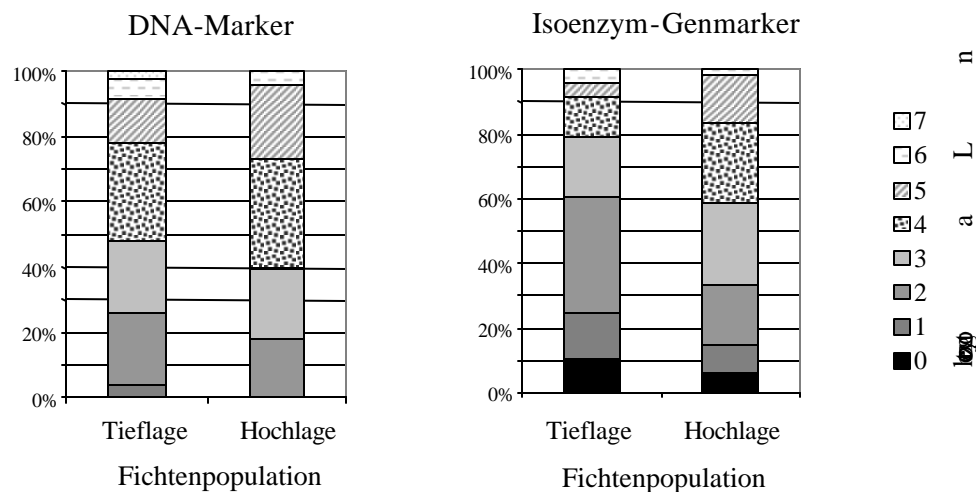


Abb. 4.4-1 Häufigkeitsverteilung der individuellen Heterozygotie in Fichtenpopulationen der Tief- und Hochlagen an 8 DNA-Markern bzw. 13 Isoenzym-Genmarkern.

Die bedingte Heterozygotie und der Fixierungsindex, berechnet für die DNA-Marker, unterscheidet sich nur unwesentlich zwischen den Populationen ( $F_{IS} = 2\%$  bzw.  $5\%$ ). Anders fällt die Berechnung bei den Isoenzym-Genmarkern aus (vgl. Tab. 4.4-1). Während in der tiefer gelegenen Population 58% ( $F_{IS} = 17\%$ ) der möglichen Heterozygoten gebildet wurden, sind es in der zweiten Population 71% ( $F_{IS} = -10\%$ ).

Anhand des auf Allelebene berechneten genetischen Abstandes ist festzustellen, dass die genetischen Strukturen der zwei untersuchten Populationen um 6,9% (DNA-Marker) bzw. 4,4% (Isoenzym-Genmarker) differieren (vgl. Tab. 4.4-1).

Beim direktem Vergleich der Allel- und Genotypen-Häufigkeiten zwischen den Populationen für jeden einzelnen nuklearen Marker zeichneten sich nur in einem Fall statistisch signifikante Unterschiede aus. Es handelt sich um Locus A vom Enzymsystem Aconitase (ACO-A). In Tieflagenfichten ist dieser Locus zu 25% von dem Allel  $A_1$  belegt, die restlichen 75% werden von Allel  $A_2$  besetzt. Im Gegensatz dazu verteilen sich die Allele in Hochlagenfichten homogener mit 49% für Allel  $A_1$  und 51% für Allel  $A_2$  (vgl. Abb. 4.4-2) Der signifikante Unterschied zieht sich bei den Genotyphäufigkeiten fort. Mit 56% der in tieferen Lagen wachsenden Fichten stellt der homozygote Genotyp  $A_2A_2$  den häufigsten Typen dar. Genotyp  $A_2A_2$  ist aber nur in 29% der Hochlagenfichten zu finden und fällt damit auf den Rang des zweithäufigsten Typen hinter dem heterozygoten  $A_1A_2$ , der von 43% der Hochlagenindividuen getragen wird (vgl. Abb. 4.4-2). Bei Berechnung der genetischen Abstände werden die Unterschiede zwischen den Populationen für den Loci ACO-A auf 25% (Allelebene) und 27% (Genotypenebene) quantifiziert.

**Isoenzymlocus ACO-A**

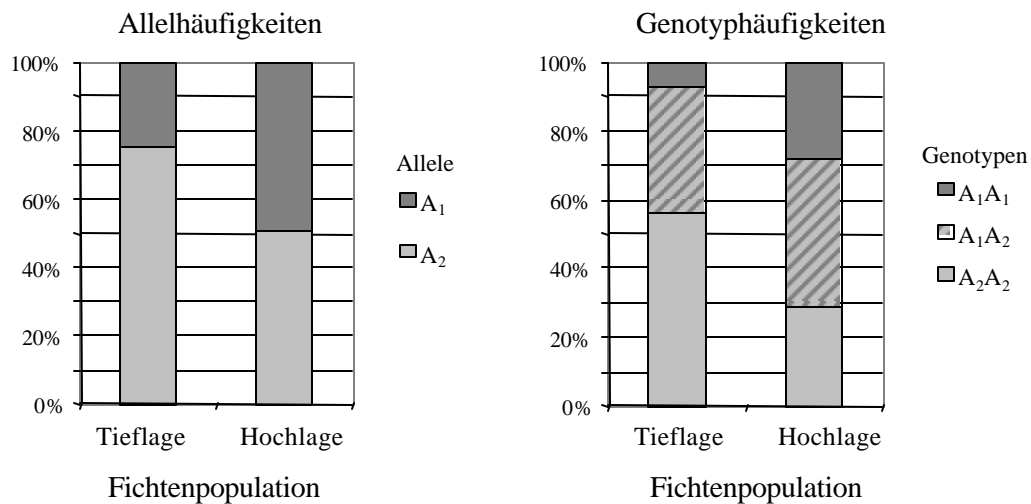


Abb. 4.4-2 Allel- und Genotyphäufigkeiten des Isoenzym-Genlocus ACO-A in Fichtenpopulationen der Tief- und Hochlagen.

In der Diversität ist erneut nur der Locus ACO-A auffällig. Die von den Tieflagenfichten gezeigte Diversität von 1,60 ist geringer und unterscheidet sich statistisch signifikant ( $\alpha < 0,1\%$ ) von der Diversität von 2,00, die in den Hochlagenfichten aufzufinden ist (vgl. Anhang 8.4).

• **Quantifizierung genetischer Variation anhand von Chloroplastenmarkern**

Unter den insgesamt 96 untersuchten Fichtenindividuen konnten 11 Haplotypen identifiziert werden. Sechs der Haplotypen treten in beiden Populationen auf, aber nur die Typen „622“, „623“ und „624“ mit Häufigkeiten von über 5%. Den häufigsten Haplotyp „623“ tragen 73% der Tieflagenfichten und 63% der Hochlagenfichten.

Der *Tabelle 4.4-2* ist zu entnehmen, dass die Haplotypenvielfalt in der Tieflagenpopulation geringer ist (8- gegenüber 9 Haplotypen). Auch die Diversität und Differenzierung dieser Population fallen gegenüber der Hochlagenpopulation niedriger aus. Die Diversität der unteren Population (1,84) entspricht 76% der der oberen Fichten (2,42). Kongruent hiermit verhält sich die Differenzierung, während innerhalb der Tieflagenfichten 47% der Individuen unterschiedliche Haplotypen tragen, sind es bei den Hochlagenfichten 67%.

Zwischen den zwei untersuchten Fichtenbestände beträgt der an den Haplotypen bestimmte genetische Abstand 16,7%.

Weder bei dem Vergleich der Häufigkeiten, mit der Haplotypen in den Populationen auftreten, noch in der Diversität, die von ihnen beschrieben wird, sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen Tief- und Hochlagenfichten des Transekts „Berchtesgaden“ zu finden.

Tab. 4.4-2 Durch Chloroplasten-Mikrosatelliten (*Pt26081+Pt63718+Pt71936*) nachgewiesene genetische Variation der untersuchten Fichtenpopulationen in Tief- und Hochlagen. Jeweils die kleinsten Werte sind unterstrichen; N= 48 Individuen pro Population.

Variationsmaße	Fichtenpopulation	
	Tieflage	Hochlage
Haplotypen	<u>8</u>	9
Diversität ( $v_{\text{Haplotypen}}$ )	<u>1,84</u>	2,42
Differenzierung ( $d T_{\text{Haplotypen}}$ )	<u>0,47</u>	0,60
genetischer Abstand ( $D_{\text{Haplotypen}}$ )	0,167	

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Entwicklung und Kopplungsanalyse von PCR gestützten DNA-Markern im Kerngenom der Fichte

#### • Entwicklung

Die Entwicklung von DNA-Markern ist eng mit den Anwendungszielen verbunden. So wird der zu entwickelnde Markertyp von dem Einsatzbereich und dem aktuellen Kenntnisstand bei der untersuchten Pflanzenart bestimmt. Der Bedarf zusätzlicher kodominanter Marker in codierenden Bereichen des Fichtengenoms und die zur Verfügung stehenden Gensequenzen aus einer stressinduzierten cDNA-Bank waren ausschlaggebend für die Entwicklung sogenannter EST-Marker.

Das Funktionsspektrum der Gene, dessen cDNA-Sequenzen als Grundlage der Marker-Entwicklung dienten, geht von der Codierung typischer Haushaltsproteine bis hin zu solchen Proteinen, die unter bestimmten Stresssituationen induziert werden (SCHUBERT *et al.* 2001). Um polymorphe Genorte zu erfassen, wurden in der vorliegenden Arbeit für 12 der 15 vorliegenden cDNA-Sequenzen spezifische Primer konzipiert, die einen Teil des proteincodierenden Genebereichs amplifizieren, aber auch einen Teil der variableren 3'untranslatierten Region (3'UTR) erfassen. Die Platzierung des Rückwärtsprimer in der 3'UTR erhöht zusätzlich die Spezifität der Marker, denn auch sehr uniforme Mitglieder einer Genfamilie unterscheiden sich an ihrer 3'UTR ausreichend, um mittels der PCR ein einziges Gen zu amplifizieren (PERRY und BOUSQUET 1998). Diese Strategie ist bei Koniferen von besonderer Bedeutung, weil in ihnen große Genfamilien häufig auftreten (AHUJA *et al.* 1994; KINLAW *et al.* 1994; PERRY und FURNIER 1996). Die eigene Erfahrung bestätigt die Vorteile dieses Ansatzes. Von den 3 entwickelten Primerpaaren, die nur den codierenden Bereich der Gensequenz erfassen, amplifizierten zwei, PA0023 und PA0076, Multigenfamilien. Im Gegensatz hierzu zeigten die restlichen 12 Marker, dessen Rückwärtsprimer in der 3'UTR liegen, keine Anzeichen dafür, dass sie mehr als die Sequenz eines Genes amplifizieren (*vgl. Tab. 4.1-2*).

Ausgehend von 15 neuen Primerpaaren konnte ohne weitere Manipulation der erzeugten PCR-Produkte für drei von ihnen (PA0034, PA0043 und PA0066) ein Längenpolymorphismus zwischen 18 Fichtenindividuen beschrieben werden. Für alle drei EST-Marker wurde nach der Analyse von 12 Endospermen eine kodominante Vererbung nachgewiesen. Nach TULSIERAM *et al.* (1992) reicht bereits die Untersuchung der Marker an fünf Samen eines Mutterbaumes aus, um den Vererbungsmodus festzustellen.

Die drei längenpolymorphen EST-Marker entsprechen 20% der ursprünglich zur Verfügung gestandenen cDNA-Sequenzen. PERRY und BOUSQUET (1998) konnten in *Picea mariana* mit vergleichbaren Methoden eine Erfolgsrate von 24% ausweisen. Ausgehend von 50 cDNA-Sequenzen konnten sie 12 in ihrer Länge variierende, kodominante Marker etablieren.

Durch die zusätzliche Suche nach Punktmutationen anhand von Restriktionsenzymen können weitere polymorphe Loci identifiziert werden (HARRY *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden mit dieser Strategie drei weitere kodominante EST-Marker etabliert (PA0002, PA0038 und PA0055). TSUMURA *et al.* (1997) entwickelte Marker aus kartierten cDNA-Klonen für die Koniferenspecies *Cryptomeria japonica*. Sie konnten nach Verdau mit Restriktionsenzymen von 66 PCR-Produkten für 16 Marker (24,2%) einen Polymorphismus nachweisen. Dabei unterschieden sich Marker, die nur codierende Genesequenzen amplifizieren und solche, in denen auch Introns mitamplifiziert wurden, erheblich. Während der Polymorphiegrad bei den erstgenannten Markerfragmenten bei 17% lag, stieg er bei den Marker-Sequenzen, die nicht codierende Introns mitamplifizieren, auf 47,4%. Es wird angenommen, dass Introns eine höhere Mutationsrate als die 3' untranslatierte Genregion haben. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass in solchen Bereichen Polymorphismen vorkommen (LI *et al.* 1985; GILPIN *et al.* 1997). Der einzige für die Fichte neu entwickelte EST-Marker, der einen möglichen Intron der genomischen DNA mitamplifiziert, ist PA0002. Das wäre die Erklärung dafür, dass das tatsächlich erzeugte PCR-Fragment um 190 bp länger ist, als das anhand der cDNA-Sequenz erwartete. Auch wenn PA0002 zu den polymorphen EST-Markern gehört, können hier im Zusammenhang mit der Polymorphismusrate keine Rückschlüsse gezogen werden, weil es sich um einen Einzelfall handelt.

Für einen weiteren Marker, PA0076, konnte im Anschluss an die PCR Amplifikation das Vorkommen eines Null-Allels und die damit verbundene dominante Vererbung nachgewiesen werden. Einem Null-Allel kann genauso wie bei anderen PCR-gestützten Markern durch eine Mutation an der Primerbindungs-Sequenz hervorgerufen werden (CALLEN *et al.* 1993). Ein Marker, der diese Eigenschaften aufweist, ist für Populationsstudien ungeeignet, weil es z. B. zur falschen bzw. zu keiner Berechnung der Heterozygotie kommen kann (LEHMANN *et al.* 1996; HARRY *et al.* 1998). Aus diesem Grunde wurde PA0076 von den weiteren Populationsstudien ausgeschlossen.

Betrachtet man Längenpolymorphismus und Punktmutationen gemeinsam, so konnte für 7 der 15 Gensequenzen Variation in Fichtengenotypen festgestellt werden. Sechs der variablen Sequenzen werden kodominant und eine dominant vererbt.

Aus einer vorausgegangenen Arbeit von SCHUBERT *et al.* (1998), in der Sie sich mit einem Cinnamylalcohol-Dehydrogenase Gen in der Fichte befassten, entstand ein PCR-Primerpaar (P3/P4), um ein Intron dieses Genes zu amplifizieren. Die Autoren konnten die Zielsequenz aus der genomischen Gesamt-DNA heraus amplifizieren und erhielten in der Regel zwei PCR-Produkte. Einer dieser Produkte (399bp) zeigte unter den von ihnen getesteten PCR-Bedingungen eine dominante Vererbung (anwesend/abwesend). Im Gegensatz hierzu zeigte der gleiche Marker in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine eindeutig kodominante Vererbung, die sowohl an den Endospermen wie auch Kreuzungsnachkommenschaften überprüft werden konnte (*vgl. Abb. 4.1-1*). Die Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der gleichen Primerpaare in den zwei Arbeiten dürfte an den veränderten PCR-Bedingungen liegen. Während in der Originalarbeit die Annealingtemperatur auf 63°C gesetzt wurde, lag sie in dieser Arbeit um 3°C niedriger. Darüber hinaus wurden verschiedene *Taq* DNA Polymerasen für die PCR-Amplifikation verwendet. Dieses

Beispiel bestätigt, wie sensitiv und sensibel PCR-gestützte Marker auf Veränderungen der Reaktionsbedingungen reagieren können.

Die Möglichkeit spezifische, für *Picea abies* entwickelte DNA-Marker auch auf andere verwandte Koniferenarten zu übertragen, ist denkbar. PERRY *et al.* (1999) konnte einen Teil der PCR-gestützten DNA-Marker, die aus *Picea mariana* cDNA-Sequenzen stammen, auch in *Picea abies* erfolgreich einsetzen. Auch spezifische, aus RAPDs stammende dominant vererbte SCAR-Marker, konnten bei mehreren verwandten *Picea*-Arten und zum Teil auch in *Pinus*-Arten amplifiziert werden (SCOTTI *et al.* 1998b). Durch Übertragung von DNA-Markern auf weitere Arten können der Entwicklungsaufwand bzw. die -kosten stark reduziert werden. Außerdem werden damit Homologien-Studien zwischen Genombereichen unterschiedlicher Arten vorangetrieben.

#### • Kopplungsanalyse

Kopplungskarten, die bislang für das Fichtengenom etabliert worden sind, basieren auf anonymen Sequenzen und repräsentieren noch nicht das ganze Genom (BINELLI und BUCCI 1994; BUCCI *et al.* 1997; PAGLIA *et al.* 1998). Mit diesem Hintergrund ist die Einbringung der neu entwickelten kodominanten DNA-Marker in eine Kopplungskarte von großer Bedeutung. Jeder der sieben neu etablierten DNA-Marker konnte für die Genotypisierung von Nachkommen einer gezielten Fichtenkreuzung eingesetzt werden. An dieser Population entsteht bei noch laufenden Arbeiten unter der Obhut von Dr. I. SCOTTI (UNIVERSITÄT UDINE, Italien) eine genetische Karte, die möglichst alle bisherig entwickelten Marker der Fichte zusammenfügt.

Die Rekombination zwischen den sieben neu entwickelten DNA-Markern scheint zufallsmäßig zu verlaufen, so dass keine Kopplung zwischen den Markern besteht. Entweder kartiert jeder Markerlocus auf einem anderen Fichtenchromosom oder die Markerloci sind auf dem gleichen Chromosom so weit voneinander entfernt, dass sie frei rekombinieren können.

Kopplungen zwischen Markern können in Populationsstudien von hohem Nutzen sein, denn eine Abweichung der erwarteten Rekombinationsrate zwischen zwei Markern kann als wichtiger Hinweis auf epistatische Effekte, Inzucht oder Migration gedeutet werden (HASTINGS 1990). Die frei rekombinierenden 7 DNA-Marker dieser Studie können nicht für solche Untersuchungen herangezogen werden. Kopplungsanalysen mit weiteren Markern erscheinen daher als sinnvoll.

## 5.2 Eignung von Isoenzym-, EST- und cpSSR-Marker für die Beschreibung von genetischer Variation innerhalb von Populationen

Die Eignung von drei verschiedenen Markertypen wurde zur Beschreibung der genetischen Variation innerhalb von 100 Fichten der Referenzpopulation Kranzberger Forst getestet.

### • Isoenzym-Genmarker

Der weitaus größte Teil der bisher durchgeführten genetischen Studien in Waldpopulationen basiert auf dem elektrophoretischen Nachweis von Genotypen an enzymcodierenden Genloci („Isoenzym-Genloci“; Übersicht in PAULE 1992). Aufbauend auf dieser breiten Basis an verfügbaren Informationen wurden die klassischen Isoenzym-Genmarker in der vorliegende Arbeit als Referenzmarker angesehen.

Die anhand 18 Isoenzym-Genloci nachgewiesene genetische Vielfalt im Kranzberger Forst beträgt 3 Allele- bzw. 4,17 Genotypen pro Locus. Diese Werte, sowie die mittlere beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ ) von 23% weisen den angesprochenen Fichtenbestand als „normale“ Population aus, da anhand gleicher Marker charakterisierte Fichtenbestände anderer europäischer Standorte ähnliche Variationsmaße besitzen (KONNERT und FRANKE 1990; BERGMANN 1991; MÜLLER-STARCK 1995a).

### • EST-Marker

In den 100 Fichten des Kranzberger Forstes sind je nach DNA-Marker 2 bis 17 Allele (PA0002 bzw. Cad7) nachgewiesen worden. Eine noch höhere Vielfalt als die am Loci Cad7 beschrieben, wurde bereits an österreichischen Fichtenpopulationen anhand von Mikrosatelliten-Markern nachgewiesen. In einer Stichprobe von 273 Individuen, die aus drei unterschiedlichen Populationen stammen, wurden 28 bis 38 Allele pro Mikrosatelliten-Locus belegt (GEBUREK *et al.* 1998).

Die sechs neu entwickelten EST-Marker (der hochvariable Marker-Cad7 ausgenommen) zeigen gegenüber den Isoenzym-Genmarkern nicht nur eine höhere Anzahl an Allelen (3,33 vs. 3,00) und Genotypen (5,43 vs. 4,17) pro Locus, sondern beschreiben auch eine höhere Diversität (1,95 vs. 1,36) in der Fichtenpopulation Kranzberger Forst. Die gezeigten Unterschiede zwischen den zwei Markerklassen beruhen hauptsächlich auf unterschiedlichen Polymorphismen. In der Fichtenpopulation des Kranzberger Forstes trifft die Definition eines klassischen Minorpolymorphismus (ein Allel mit über 80% Häufigkeit) bei 10 der 18 ausgewerteten Isoenzym-Genloci zu (AAP-A; AAT-A, B; GDH-A; IDH-A; MDH-C; MNR-A,B; PGM-A; SKDH-A). Weitere vier Isoenzym-Genmarker (ACO-A; LAP-A, B; PGI-B) zeigen eine Tendenz zum Minorpolymorphismus (ein Allel mit über 70% Häufigkeit).

Im Gegensatz hierzu beschreibt keiner der sieben DNA-Marker einzelne Allelhäufigkeiten von über 80%. Drei EST-Marker (PA0066, PA0034 und PA0055) tendieren lediglich zu einem Minorpolymorphismus mit einem prädominanten Allel, deren Erscheinungshäufigkeit bei über 70% liegt. Die vier weiteren DNA-Marker (PA0002, PA0038, PA0043 und Cad7) zeigen eine homogenerer Verteilung ihrer Allele, also einen Majorpolymorphismus (*vgl. Tab. 4.2-1*).

Ob ein Marker Major- oder Minorpolymorphismen aufweist, ist insbesondere bei Untersuchungen kleiner Populationsstichproben relevant. Bedingt durch eine homogenere Verteilung der Allele können genetische Prozesse wie Selektion, genetische Drift und Inzucht mit Markern, die einen Majorpolymorphismus aufweisen, eindeutiger nachgewiesen werden.

Die Art des Polymorphismus der einzelnen Marker wirkt sich auch stark auf die beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ ) aus. An Loci, in denen die Allele gleichmäßig verteilt vorkommen, können mehr heterozygote Typen gebildet werden, als in solchen, die einen Minorpolymorphismus aufweisen. Wieviele der möglichen bildbaren Heterozygoten realisiert wurden, kann anhand der bedingten Heterozygotie verdeutlicht werden (GREGORIUS *et al.* 1986). Wie es deshalb zu erwarten war, zeigen Marker, die zu einem Majorpolymorphismus tendieren (PA0002, PA0038, PA0043 und Cad7), eine geringe Abweichung der tatsächlich beobachteten Heterozygotie von der bedingten Heterozygotie. Für Marker PA0034, PA0055 und PA0066 wird hingegen wegen der dominierenden Häufigkeit eines einzigen Alleles (Tendenz zum Minorpolymorphismus) der Wert der beobachteten Heterozygotie bei der bedingten Heterozygotie stark nach oben korrigiert (*vgl. Tab. 4.2-1*).

Die im Kranzberger Forst beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ ) beträgt 0,50 im Mittel aller DNA-Marker (hochvariabler Marker-Cad7 ausgenommen). Damit liegt die mit DNA-Marker beobachtete Heterozygotie mehr als doppelt so hoch als die an den 18 Isoenzym-Genloci ( $H_o = 0,23$ ). Das Auftreten einer solch hohen beobachteten Heterozygotie hängt mit der gleichmäßigeren Allelverteilung bei den DNA-Markern zusammen. Dafür spricht der geringer ausfallende Unterschied zwischen DNA- und Isoenzym-Genmarkern bei dem bedingten Heterozygotie-Wert, was von den unterliegenden Allelhäufigkeiten unabhängig ist. Die bedingte Heterozygotie beträgt im Schnitt 67% für die sechs EST-Marker und liegt damit nur 7% Punkte über dem der Isoenzym-Genmarker. Dennoch besteht, im geringen Maße ein Überschuss an Homozygoten, der mit Isoenzym-Genmarker auf 10% und mit DNA-Markern auf 1% geschätzt wird.

PERRY *et al.* (1999) berichtet an den 12 von ihm aus cDNA-Sequenzen entwickelten Markern für *Picea mariana* eine mittlere beobachtete Heterozygotie von 0,26. Der Einsatz von einigen dieser Marker bei *Picea glauca* und *Picea abies* ergaben Heterozygotie-Werte von 0,37 bzw. 0,30, die vergleichbar mit entsprechenden isoenzymatischen Untersuchungen waren. Diese Heterozygotiegrade liegen weit unter denen, die mit EST-Markern im Kranzberger Forst beschrieben wurden. Dieser Unterschied dürfte sich mit der Art des Polymorphismus der Marker erklären lassen. Sechs der neun von PERRY *et al.* (1999) bei der Fichte eingesetzten Marker zeigen einen Minorpolymorphismus mit einem in der Häufigkeit vorherrschenden Allel (Häufigkeit >80%).

Obwohl bei allen berechneten genetischen Variationsparametern innerhalb der Referenzpopulation ( $N_A$ ;  $v_A$ ;  $N_G$ ;  $H_b$ ;  $H_c$ ) die Mittelwerte der EST-Marker höher liegen als bei Isoenzym-Genmarkern, werden die absoluten Mindest- und Maximalwerte für alle Parameter bei den Isoenzym-Genloci gefunden. Das heißt, die Enzymloci zeigen eine breitere Streuung bezüglich der von ihnen beschriebenen Variationsmaße (*vgl. Abb. 4.2-1*). Wird Marker-Cad7 mitberücksichtigt, so ist es dieser DNA-Marker, der die absoluten Höchstwerte für alle berechneten Parameter darstellt. Mit 17 verschiedenen Allelen im Kollektiv von 100 Bäumen und einer beobachteten Heterozygotie von



0,86 hat Marker Cad7 die Eigenschaften eines hoch polymorphen Markers. In der Regel werden Marker mit einer Heterozygotie über 0,7 als hoch polymorph bezeichnet (OTT 1992). Solch ein hoher Heterozygotiegrad an einzelnen Loci wurde bereits mit Mikrosatelliten-Markern an mehreren anderen Baumarten wie *Pinus contorta* (THOMAS *et al.* 1999) oder *Quercus* (STREIFF *et al.* 1998) nachgewiesen.

#### • Chloroplasten-Mikrosatelliten

Unter den Besonderheiten des Chloroplastengenoms ist ihr haploider Zustand und die paternale Vererbung bei der Fichte hervorzuheben (SPERISEN *et al.* 1999). Die Chloroplasten-DNA (cpDNA) agiert als eine Vererbungseinheit, ohne dass neue Rekombinationsmöglichkeiten bestehen. Diese Eigenschaften müssen bei der Analyse des Chloroplastengenoms immer beachtet werden (BURG *et al.* 1998).

Genetische Untersuchungen setzen den polymorphen Zustand von Loci voraus. VENDRAMIN *et al.* (2000) hat drei hoch polymorphe Mikrosatelliten im Chloroplastengenom der Fichte beschrieben. Sie zeichnen sich nicht nur wegen hoher Variabilität zwischen Populationen, sondern auch innerhalb von Populationen aus. Die aus Mononukleotiden-Wiederholungen bestehenden Mikrosatelliten *Pt26081*, *Pt63718* und *Pt71936* ließen sich mittels eines Multiplex PCR-Ansatz in einer gemeinsamen Reaktion gut amplifizieren. Diese Methode hat sich wegen dem hohen Probendurchsatzes und der Reproduzierbarkeit bewährt.

Den Markern *Pt63718*, *Pt26081* und *Pt71936* entsprechend wurden in 100 Fichten des Kranzberger Forstes 6, 3 und 3 unterschiedliche Längenvarianten nachgewiesen. Die Kombination aller 12 oben genannten Varianten ergab 18 unterschiedliche Haplotypen. Die Höhe der beschriebenen Haplotypen-Vielfalt wird beim Vergleich dieser Untersuchung mit der von VENDRAMIN *et al.* (2000) deutlich. In 1105 Individuen aus 97 über das komplette Verbreitungsgebiet der Fichte verteilten Provinzen, konnten VENDRAMIN *et al.* (2000) mit den gleichen Markern 7, 8 und 6 Längenvarianten identifizieren, die kombiniert 41 verschiedene Haplotypen ergaben. Die 18 Haplotypen des Kranzberger Forstes entsprechen somit 44% der im Verbreitungsgebiet der Fichte von VENDRAMIN *et al.* (2000) identifizierten Typen.

Von den 97 von VENDRAMIN *et al.* (2000) analysierten Fichtenherkünften (je Herkunft 5 bis 25 Individuen) zeigten nur drei keine Variationen im Chloroplastengenom. Mit 8 verschiedenen Typen wurde die höchste Anzahl an Haplotypen in einem 24 Individuen großen Kollektiv aus Italien gefunden. Der über ganz Europa hinweg häufigste Haplotyp mit 54% wurde von dieser Arbeitsgruppe als Haplotyp 01 (Fragmentlänge von Loci *Pt63718/Pt26081/Pt71936* = 100bp/116bp/144bp) bezeichnet. Auch im Kranzberger Forst ist ein dominanter Haplotyp zu finden. Der als „623“ bezeichnete Typ (Fragmentlänge von Loci *Pt63718/Pt26081/Pt71936* = 99bp/115bp/144bp) ist in 61% der Fichten vorhanden (vgl. Abb. 4.2-4;). Haplotyp 01 und „623“ dürften die gleichen sein. Der Unterschied von jeweils einem Basenpaar in der Fragmentlänge der Marker *Pt63718* und *Pt26081* kann an den unterschiedlich verwendeten Techniken bzw. Bedingungen der elektrophoretischen Auftrennungsmethoden sowie an den verwendeten Standards liegen. Um Fragmentlängen von mononukleotiden cpSSR-Markern vergleichen zu können, sind

Referenzproben als Standard unverzichtbar. Diese wurden innerhalb der jeweiligen Untersuchungen systematisch verwendet. Mit der Arbeitsgruppe von VENDRAMIN *et al.* (2000) lagen aber keine gemeinsamen Individuen als Referenzproben vor.

Elf der 18 verschiedenen Haplotypen traten unter den 100 Bäumen des Kranzberger Forstes nur einmal auf. Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass in einigen Fällen durch fehlerhafte Auswertung einzelner cpSSR-Loci neue Haplotypen entstehen. Nichtsdestoweniger ist bei einem hohen Vorkommen von seltenen Haplotypen (Häufigkeiten <1%) sehr wahrscheinlich, dass bei einem geringen Stichprobenumfang viele Typen zufallsgemäß nicht vorkommen. Deshalb sollte der Begriff von einem populationspezifischen Haplotyp (ECHT *et al.* 1998; VENDRAMIN *et al.* 2000) bei geringen auftretenden Häufigkeiten dieses Typen in der Population, vorsichtig angewendet werden. Bisherige Untersuchungen mit cpSSR an Koniferen wurden leider immer nur mit kleinen Stichproben aus Populationen durchgeführt (ECHT *et al.* 1998; VENDRAMIN *et al.* 2000; MORGANTE *et al.* 1998), so dass keine weiteren Referenzdaten über seltene Haplotypen innerhalb von großen Populationen vorliegen.

Die durch die cpSSR erfasste Diversität der Chloroplasten in den Fichten des Kranzberger Forst ist, soweit es sich vergleichen lässt, ähnlich hoch wie die von Isoenzym-Genmarkern im Kern-Genom. Dies soll keinen Vergleich der Variabilität des Kern- und Plastiden-Genomes darstellen, sondern lediglich verdeutlichen, dass mit den Chloroplasten-Mikrosatelliten variable Marker zur Verfügung stehen, die auch innerhalb von Populationen quantifiziert werden können. Ein Beispiel hierfür liefert die Arbeit von ECHT *et al.* (1998): innerhalb Populationen von *Pinus resinosa*, in denen keine Variation mit Isoenzym-Genmarkern festzustellen war, konnte mit Chloroplasten-Mikrosatelliten Variation nachgewiesen werden.

### 5.3 Genetische Unterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven

Mehrere Autoren bestätigen, dass Ergebnisse von Resistenzprüfungen im Labor in vielen Fällen nicht mit denen von Feldversuchen bzw. mit Feldtoleranz übereinstimmen (SCHOLZ 1983; KARNOSKY 1983, TZSCHACKSCH 1987; HANSEN *et al.* 1998). Deshalb sollen die Versuchsbedingungen, im wesentlichen die Art des Stresses, den verbreitet auftretenden und für die Zukunft prognostizierten Umweltbedingungen möglichst nahe kommen (HATTEMER *et al.* 2000). Um diesem gerecht zu werden, wurden für die Untersuchungen Freilandkollektive ausgewählt, die schon lange den besonderen Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Für die in den belasteten Versuchsflächen als sensitiv und tolerant eingestuften Fichten konnte anhand genauerer Laboruntersuchungen (Zustand der epicuticularen Wachsschicht bzw. Chloridgehalt der Nadeln) eine unterschiedliche Disposition gegenüber den jeweiligen Schadstoffen bestätigt werden.

Sieht man von einzelnen Ausnahmen ab, findet sich eine große Übereinstimmung in den genetischen Variationsmaßen der zwei Versuchsflächen, die jeweils an einem Standort untersucht wurden. Um einen besseren Überblick verschaffen zu können, werden in den folgenden Kapiteln beide Versuchsflächen eines Standortes zusammengefasst und gemeinsam bewertet.

#### 5.3.1 Auswirkungen auf das Kerngenom

##### • Genetische Vielfalt

Die 8 untersuchten DNA-Loci zeigen im Mittel aller untersuchten Kollektive eine Vielfalt von 4,11 Allele pro Locus. Bei getrennter Betrachtung von sensitiven und toleranten Großkollektiven, wie in *Abbildung 5.3-1* dargestellt, sind Unterschiede von 0,24 bis 0,44 Allele pro Locus zu erkennen. Diese Unterschiede sind nicht sehr markant, aber dennoch auffällig, da in allen drei Stressszenarien die Großkollektive toleranter Fichten eine geringere allelische Vielfalt aufweisen. Es ist dabei zu beachten, dass diese Werte maßgeblich von dem hochvariablen Cad7-Locus beeinflusst werden (13-17 Allele pro Kollektiv).

Isoenzym-Genloci, die insgesamt eine geringere Vielfalt als DNA-Loci in den untersuchten Fichten erkennen lassen (Mittel= 2,55 Allele pro Locus), liefern kein einheitliches Bild über alle Versuchsstandorte hinweg. In dem von Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung betroffenen slowakischen Standort spiegeln Isoenzym-Marker und DNA-Marker die gleiche Tendenz wieder: das Großkollektiv toleranter Fichten hat die geringere Anzahl an Allelen. In dem von Streusalzbelastung betroffenen Versuchsmaterial zeigen die Isoenzym-Genmarker hingegen keine Unterschiede.

Der Trend zu einer höheren Vielfalt in den sensitiven Kollektiven setzt sich auf Genotypebene fort. Beide Markerklassen zeigen in allen untersuchten Beständen unter den drei verschiedenen Stressszenarien eine höhere Anzahl an Genotypen pro Locus in den

sensitiven Großkollektiven. Gemessen an den DNA-Loci liegt über die Standorte hinweg die mittlere Anzahl der Genotypen pro Locus bei den sensitiven Kollektiven um 8,6% über denen der toleranten (6,54 vs. 6,02) und um 9,9% im Fall der Isoenzym-Genloci (2,78 vs. 2,53). Die ähnlichen Verhältnisse zwischen sensitiven und toleranten Großkollektiven auf Allel- und Genotypenebene sind ein Hinweis darauf, dass vergleichbare Anteile der allelischen Vielfalt auch in den Genotypen realisiert wurden.

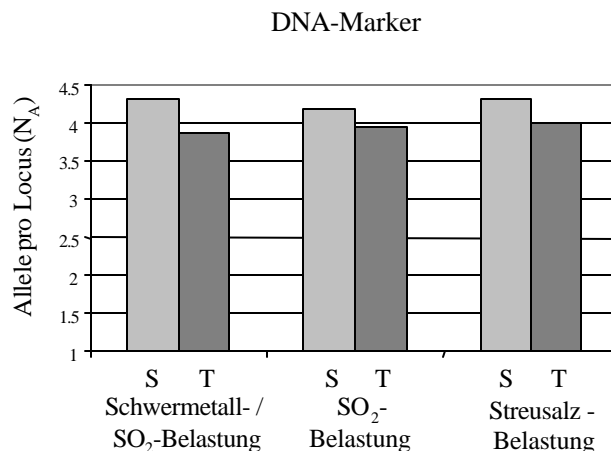


Abb. 5.3-1 Genetische Vielfalt an 8 DNA-Loci in toleranten und sensitiven Großkollektiven unter drei verschiedenen Stressszenarien.

HOSIUS (1994) stellte bei Fichten, die auf schwermetallbelasteten Böden überlebten, einen Verlust an Isoenzym-Allelvarianten fest. Der Autor geht davon aus, dass seltene Varianten, die unter normalen Bedingungen eventuell überlebt hätten, den Selektionsbedingungen der schwermetallkontaminierten Böden nicht gewachsen waren.

Ein dauerhafter Verlust an Vielfalt ist primär durch die ausschließlich in den sensitiven Kollektiven vorkommenden Allele zu befürchten. Im Durchschnitt aller Großkollektive der drei Standorte kommen 6,1% der Allele (DNA-Marker) nur bei den sensitiven, absterbenden Fichten vor. Dieser Anteil an Allelen kann durch den von Umweltstress ausgelösten Selektionsprozess verloren gehen, insofern sie nicht in der restlichen Population repräsentiert sind und die sensitiven Bäume nicht mehr an der Reproduktion teilnehmen. MÜLLER-STARCK (1993) quantifizierte die vom Verlust bedrohten Allele in sensitiven Kollektiven in umweltbelasteten Buchenbestände auf 5,1%, auch wenn in seiner Studie in den toleranten Kollektiven die höhere Vielfalt und Diversität nachgewiesen wurde. Die Einwirkung anthropogener Schadstoffe, aber auch die forstliche Bewirtschaftung können das Verlustrisiko noch verstärken. Hohe Allelverluste wurden beispielsweise durch waldbauliche Eingriffe, die die Populationsgröße reduzieren, nachgewiesen. In zwei Bestände von *Pinus strobus* verursachte die Ernte von ca. 88% der Individuen Allelverluste von 25% an Isoenzym-Genloci (BUCHERT *et al.* 1997) und von 26% an DNA-Mikrosatellitenloci (RAJORA *et al.* 2000). Bei den verlorengegangenen Allelen handelt es sich um seltene Varianten, die nur im

Falle eines ausreichenden Genflusses in der Verjüngung der untersuchten Populationen wieder zu finden sein werden.

Besonders unter dem Gesichtspunkt der Erhaltung der Genressourcen ist die allelische Vielfalt von hoher Bedeutung und ausschlaggebender als die genetische Diversität. In anderen Worten ausgedrückt ist der Erhalt aller Allelvarianten für spätere Anpassungsprozesse wichtiger als eine Gleichverteilung derselben (PETIT *et al.* 1998).

#### • Diversität

Die allelische Diversität, gemessen am Genpool der DNA-Marker, ist an jedem belasteten Standort in den sensitiven Großkollektiven höher als in den toleranten. Die Differenz zwischen Großkollektiven ist allerdings nicht in jedem Bestand gleich groß (zwischen 0,03 und 0,13) und nur am streusalzbelasteten Standort statistisch signifikant (*vgl. Abb 5.3-2*). Der Isoenzym-Genpool unterstützt diese Aussage, da auch hier eine geringfügig höhere Diversität in den sensitiven Großkollektiven zu verzeichnen ist (zwischen 0,01 und 0,03 höher).

Die Ansicht der *Abbildung 5.3-2* lässt erkennen, dass sich hinter den Genpool-Werten der DNA-Marker einzelne Loci befinden, die zum Teil sehr unterschiedliche Diversitätsmaße zeigen. Dies betrifft nicht nur die Absolutwerte sondern auch die Relation zwischen sensitiven und toleranten Großkollektiven. Statistisch signifikante Diversitätsunterschiede werden von Marker PA0066 in dem streusalzbelasteten Standort (sensitiv > tolerant) und Marker PA0002 in den SO<sub>2</sub>-belasteten Standorten (sensitiv < tolerant) gezeigt. Die gleichen Loci weisen aber in den anderen Stressszenarien kaum nennenswerte Unterschiede zwischen sensitiven und toleranten Großkollektiven auf. Anders verhalten sich Loci PA0005 und PA0043: unter den unterschiedlichsten Stressbedingungen kann an ihnen immer in den sensitiven Großkollektiven eine höhere Diversität nachgewiesen werden. In eine dem Genpool entgegengesetzte Richtung weist Marker PA0055 hin. In allen umweltbelasteten Standorten ist an diesem Locus eine höhere Diversität in den toleranten Großkollektiven vorzufinden.

Diese Befunde sprechen dafür, dass einige Loci, wie PA0066 und PA0002, bei bestimmten Stresseinwirkungen sehr stark betroffen werden. Andere Marker hingegen (PA0005; PA0043 und PA0055) zeigen sich bei sehr verschiedenen Stressszenarien gleichermaßen beeinflusst. Die restlichen Marker verhalten sich gegenüber den getesteten Umweltbedingungen eher neutral.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DNA-Marker zeigen untereinander eine freie Rekombination (*vgl. Kap. 4.1.3*) und liegen somit in unterschiedlichen Bereichen des Fichtengenoms. Die Annahme, dass unterschiedliche Genomabschnitte einem differenzierten Selektionsdruck unterliegen, gewinnt mit den dargestellten Ergebnissen an Kraft. Zusätzlich wird deutlich, dass das Maß der Genpool-Diversität aufgrund von Kompensationen der Loci entgegengesetzter Wirkung („average-effects“) sich nicht immer eignet, um Unterschiede zwischen Kollektiven aufzuspüren (HOSIUS 1994).

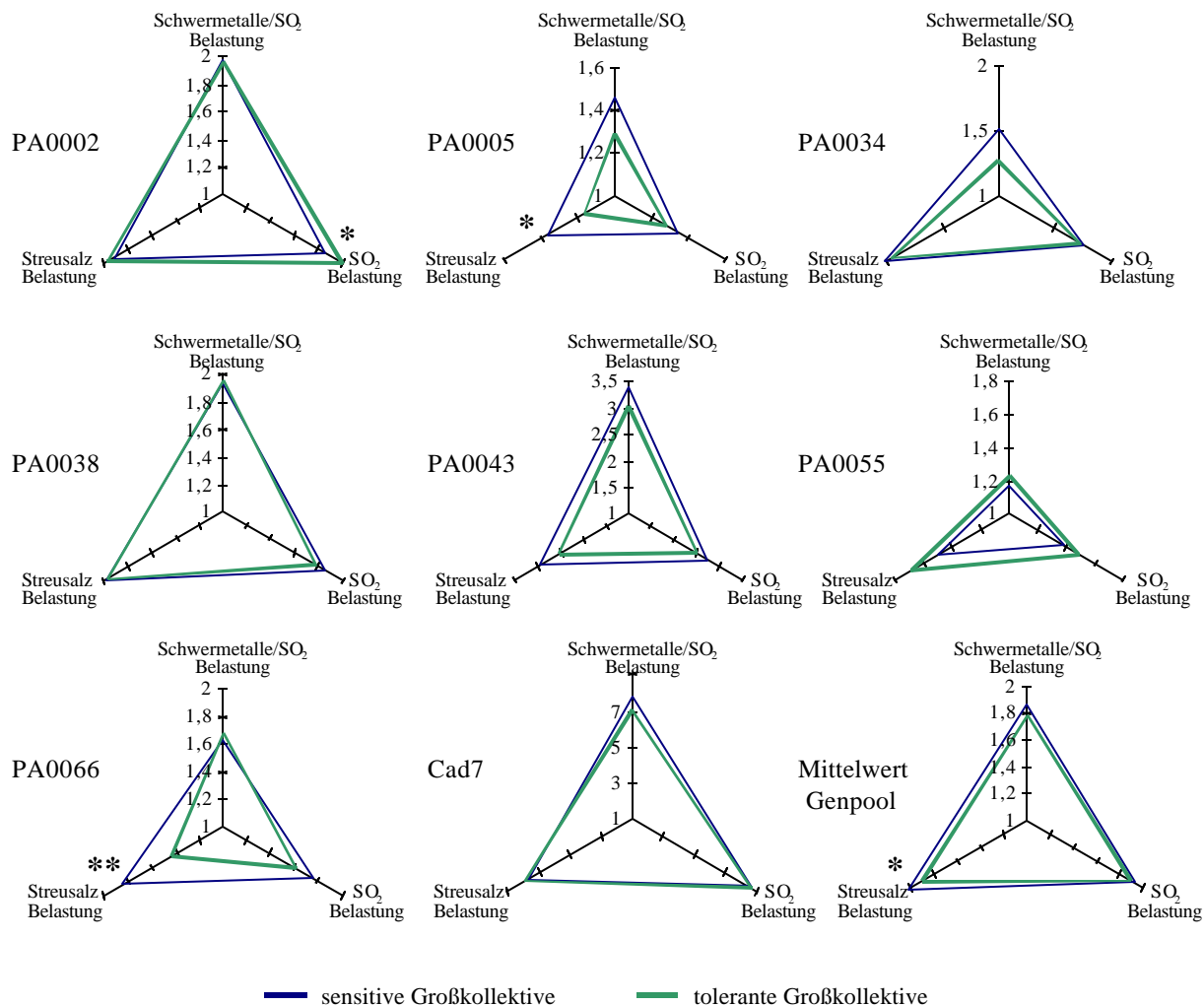


Abb. 5.3-2 Alleliche Diversität von sensitiven und toleranten Großkollektiven in drei verschiedenen Stressszenarien. Signifikante Diversitätsunterschiede: \* bei 5% bzw. \*\* bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit (Permutationstest);

Wie schon am Anfang des Kapitels dargestellt, zeigen DNA- und Isoenzym-Marker einen Diversitätsverlust in den toleranten Großkollektiven. Damit beruht diese Aussage auf insgesamt 26-27 untersuchte Loci. Innerhalb der Standorte und zwischen den darin untersuchten Kollektiven zeigt die Genpool-Diversität und Genpool-Differenzierung in allen Fällen die gleichen Tendenzen (siehe oben). Die zwischen Null und Eins definierte Differenzierung berücksichtigt unterschiedliche Populationsgrößen (GREGORIUS 1987) und erlaubt dadurch einen Vergleich zwischen den Beständen der drei Standorte. Im Mittel über alle Kollektive eines Standortes ist es der Mönichswald/Gunzenhausen ( $\delta$ -DNA-Marker= 0,49;  $\delta$ -Isoenzyme= 0,24), der die ausgeprägteste Differenzierung nachweist, gefolgt von den Klonen-Mischkollektiven aus dem Erzgebirge ( $\delta$ -DNA-Marker=0,48). Die in der slowakischen Spiš Region (Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung) untersuchten Bäume zeigen insgesamt die geringste Differenzierung ( $\delta$ -DNA-Marker = 0,46;  $\delta$ -Isoenzyme = 0,11).

Alle hier vorgestellten, auf Allele bezogenen Tendenzen in der Diversität und Differenzierung ziehen sich auf Genotypenebene fort.

In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wurde von SCOTTI *et al.* (1998a) anhand von DNA-Markern (SCAR-Technik) in einer italienischen schadstoff-exponierten Fichtenpopulation eine geringere Diversität nachgewiesen als in einem nicht exponierten Referenzbestand, der von der Umweltbelastung nicht betroffen war. Ein Diversitätsverlust unter den toleranten Fichten entspricht der Annahme, dass starker Umweltstress generell die Diversität des Genpools durch Selektionsvorteile spezialisierter Genotypen vermindert (HOSIUS 1994).

Im Gegensatz hierzu weisen die meisten mit Isoenzym-Markern durchgeführten Studien an Populationen unter komplexen Umweltstress eine höhere Diversität innerhalb toleranter Kollektive nach, die vor allem auf Verschiebungen in den Häufigkeiten genetischer Typen zurückgeht. Dieser eher unerwartete Befund gelang nicht nur bei Fichten (BERGMANN und SCHOLZ 1987; PRUS-GLOWACKI und GODZIK 1991; RADDI *et al.* 1994), sondern auch bei Kiefern (GEBUREK *et al.* 1987; OLEKSYN *et al.* 1994) und Buchen (MÜLLER-STARCK 1985, 1989, 1993).

Räumlich homogene und zeitlich konstant wirkende Umweltbedingungen können zu gerichteten Anpassungsprozessen führen. Der damit einhergehende Verlust an genetischer Diversität kann dann auch die Fähigkeit zur Anpassung an weiteren veränderten Umweltbedingungen einschränken. Anpassungspotentiale und damit auch Anpassungsfähigkeiten werden in diesem Falle aufgrund des Anpassungsprozesses verringert. Dagegen können räumlich und zeitlich variable Umweltbedingungen der Erhaltung der Anpassungsfähigkeit förderlich sein, indem sie diversifizierende Anpassungsprozesse auslösen, welche eher zur Erhaltung genetischer Variation führen (ZIEHE und GREGORIUS 1996). Demnach müsste der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Diversitätsverlust eher durch homogene und konstante Stressoren ausgelöst worden sein, was kaum vorstellbar ist, da es sich um Untersuchungen an Freilandpopulationen gehandelt hat, die unter komplexen Umweltbedingungen standen. Andererseits ist genauso wie bei homogenen Stresswirkungen ein Verlust an Diversität zu erwarten, wenn innerhalb dieser Komplexität die Belastung durch einen der Stressoren (Schwermetall, SO<sub>2</sub> oder Chlorid) so stark ist, dass nur spezielle Genotypen überleben können.

Eine weitere mögliche Erklärung für die mit DNA-Markern nachgewiesenen Diversitätsverluste stützt sich auf die Herkunft der benutzten Marker. Sie haben ihren Ursprung in Gensequenzen einer unter Pathogenstress induzierten cDNA-Bank. Unter Berücksichtigung pleiotropischer Effekte ist es denkbar, dass Gene, die unter Pathogenstress exprimiert werden, auch unter den hier studierten Stressszenarien besonders von gerichteten Anpassungsprozessen betroffen werden.

### • Heterozygotie

Das aus allen DNA-Loci hergeleitete Gesamtmittel (Genpool) zeigt unter allen Stessszenarien eine Tendenz zu einer geringeren Heterozygotie in den toleranten Kollektiven. Am deutlichsten wird dies im chloridbelasteten Bestand des Mönichswaldes. Die beobachtete Heterozygotie entspricht im toleranten Großkollektiv nur 80% der des sensitiven Referenzkollektives (vgl. Abb. 5.3-3). Der Fixierungsindex deutet mit 15% auf einen Überschuss an Homozygoten im Großkollektiv der toleranten Fichten hin, während sich die sensitiven Fichten mit  $F_{IS}=4\%$  dem Gleichgewicht zwischen Homo- und Heterozygoten nähern. In den mit Schwermetall- und  $SO_2$ -belasteten slowakischen Standort sowie in der mit  $SO_2$ -belasteten Versuchsflächen des Erzgebirges liegen die berechneten Fixierungsindices für die Fichtenkollektive mit Werten zwischen 0 und 6% nahe dem Gleichgewicht zwischen Homo- und Heterozygoten. Einen höheren oder gleich hohen Überschuss an Homozygoten-Individuen in den toleranten Großkollektiven gegenüber den sensitiven führt zum Schluss, dass die höhere Sensitivität gegenüber den entsprechenden Schadstoffen nicht Inzuchtdepression als Ursache haben kann.

Die analysierten Isoenzym-Genloci zeigen im Mittel keine oder nur sehr geringe Unterschiede in der beobachteten Heterozygotie, die sich aber der von DNA-Markern gezeigten Tendenz zu einer höheren Heterozygotie in sensitiven Großkollektiven anschließen. Der entsprechend berechnete Fixierungsindex weicht nur im streusalzbelasteten Bestand nennenswert von 0 ab. Beide Kollektive der Versuchsfläche A (sensitiv und tolerant) zeigen einen Überschuss an Homozygoten-Individuen (18% bzw. 21%) und unterscheiden sich somit von der Versuchsfläche B an diesem Standort (4% bzw. 11%).

Nur wenige der bisherigen Isoenzym-Untersuchungen, die sich mit der Auswirkung von Schadstoffen auf die genetische Zusammensetzung von Baumpopulationen befassten, konnten höhere Homozygotenanteile bei überlebenden bzw. vitalen Individuen wie in der vorgelegten Studie nachweisen (PRUS-GLOWACKI und GODZIK 1991; PRUS-GLOWACKI und NOWAK-BZOWY 1992). Im Gegenteil dazu zeigen die meisten der an umweltbelasteten Standorten durchgeführten genetischen Untersuchungen eine höhere Heterozygotie in toleranten bzw. überlebenden Baum-Kollektiven (BERGMANN und SCHOLZ 1987; BERGMANN und SCHOLZ 1989; MÜLLER-STARCK und ZIEHE 1991; MÜLLER-STARCK 1993; RADDI *et al.* 1994; PRUS-GLOWACKI und GODZIK 1995; BERGMANN und HOSIUS 1996; PRUS-GLOWACKI *et al.* 1998). Diese Erkenntnisse beziehen sich auf die Betrachtung der Isoenzym-Mittelwerte und führten zur Annahme, dass eine hohe Heterozygotie als vorteilhaft zu bewerten ist.

Mehrere Arbeiten an verschiedenen Baumarten (Fichte: BERGMANN und HOSIUS 1996; HOSIUS *et al.* 1996; Buche: MÜLLER-STARCK 1993; Tanne: LLAMAS 1998), die sich mit der Auswirkung der Heterozygotie auf die Anpassungsfähigkeit unter Umweltstress befassten, weisen daraufhin, dass einzelne Isoenzym-Genloci sehr unterschiedliche Trends zwischen toleranten und sensitiven Individuen zeigen. Gleiches konnte hier für die DNA-Marker bestätigt werden. Über alle Versuchsstandorte hinweg konnten die 8 DNA-Loci in folgende drei Kategorien eingestuft werden (vgl. Abb. 5.3-3): a) Der Heterozygotenanteil liegt in den



toleranten Großkollektiven unter dem der sensitiven Großkollektive (Cad7, PA0002, PA0005 und PA0043). b) Der Heterozygotenanteil in den tolerante Großkollektiven liegt über den der sensitiven Großkollektive (PA0055). c) Es gibt keine übereinstimmenden Trends über alle Standorte hinweg (PA0034, PA0038 und PA0066).

Besonders hervorzuheben sind zwei Marker: PA0055, der an einem Gen der  $\beta$ -Untereinheit des ATP-Synthasekomplexes liegt, zeigt gegen den Trend der restlichen DNA-Marker als einziger Marker an allen Standorten einen höheren Anteil an Heterozygoten bei den toleranten Individuen im Vergleich zu den sensitiven. Dies gilt trotz sehr unterschiedlicher Heterozygotieanteile an diesem Locus für verschiedene Standorte (zwischen 11,5% und 39,4%; vgl. Abb. 5.3-3). PA0066, der ein kälteinduziertes Gen identifiziert, zeigt extreme Gegensätze. Während sich auf dem mit Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-belasteten Standort Heterozygotie als vorteilhaft erweist (42,3% vs. 26,6%; vgl. Abb. 5.3-3), ist der gegenteilige Trend im streusalzbelasteten Mönichswald zu beobachten. Bei den toleranten Fichten sind nur 25,4% an diesem Locus heterozygot, während es im sensitiven Großkollektiv 47,9% sind.

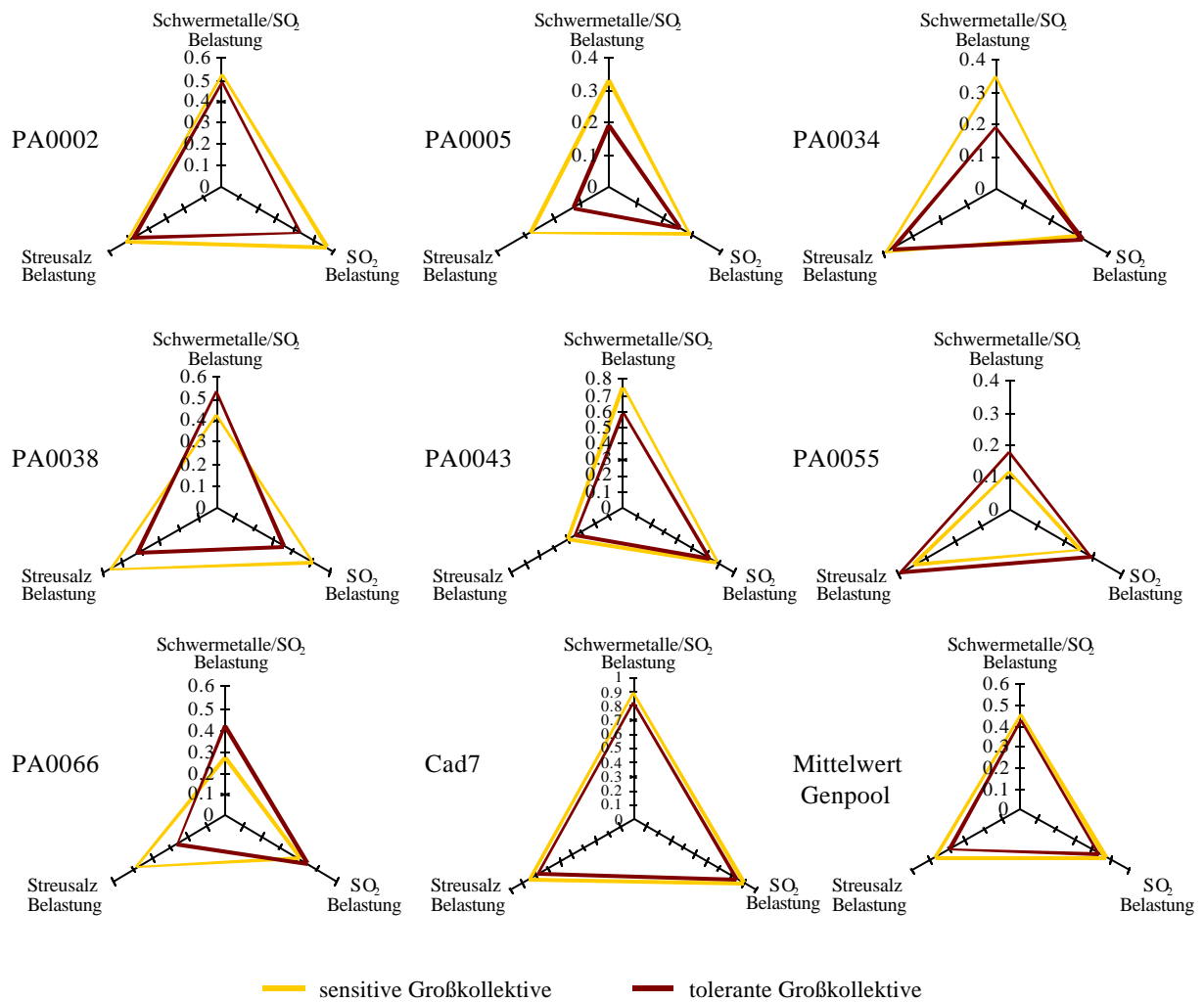


Abb. 5.3-3 Heterozygotenanteil ( $H_0$ ) in sensitiven und toleranten Großkollektiven in den drei verschiedenen Stressszenarien;

Die Frage, warum an einigen Loci Allele im heterozygoten und an anderen im homozygoten Zustand bevorzugt bei toleranten Individuen vorkommen, ist für Bäume noch nicht eindeutig geklärt. Im allgemeinen gilt für das gesamte Genom: höhere Heterozygotiegrade verschaffen bei komplexen, moderaten aber langanhaltenden Formen von Umweltstress einen Viabilitätsvorteil und bei spezifischen, sehr starken Belastungssituationen scheinen homozygote Individuen besser angepasst zu sein (GREGORIUS 1989; MÜLLER-STARCK 1993; PRUS-GLOWACKI und GODZIK 1995; SAVOLAINEN und HEDERICK 1995).

Die Unterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven in ihrer Genpool-Heterozygotie ist also sehr von den verwendeten Marker-Loci abhängig und erlaubt erst bei Betrachtung vieler Marker-Loci eine repräsentative Aussage. Als Ideal erscheint daher der Einsatz einer hohen Zahl an kodominanten Markern mit gleichmäßiger Verteilung über das komplette Genom. Anhand einer Kopplungskarte ließen sich dann die Bereiche des Genoms charakterisieren, die eine höhere bzw. geringere Heterozygotie aufweisen. Dieses Vorgehen scheidet im Moment noch an der geringen Anzahl verfügbarer kodominanter, nicht anonymer Marker.

#### • **Allel- und Genotyphäufigkeiten**

Bemerkenswert ist, dass an keinem der zwei Standorte, in denen Untersuchungen an Isoenzym-Genloci durchgeführt wurden, signifikante Allel- oder Genotypen-Häufigkeitsunterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven beobachtet werden konnten. An mehreren ähnlich durchgeführten Studien an Koniferen (MEJNARTOWICZ 1983; BERGMANN und SCHOLZ 1989; KONNERT 1992; RADDI *et al.* 1994; BERGMANN und HOSIUS 1996) traten signifikante Unterschiede an einigen Loci auf. Eine mögliche Erklärung mag in der Stichprobengröße liegen. Im Vergleich von Stichproben geringer Größe können Signifikanzen übersehen werden, die tatsächlich zwischen den Grundgesamtheiten bestehen, weil der  $\chi^2$ -Homogenitätstest für geringe Stichprobengrößen unscharf ist (HOSIUS 1994). Dieses dürfte vor allem bei Isoenzym-Genloci, die zu einem Minorpolymorphismus tendieren, eine Rolle spielen, da der Anteil an Individuen in einem Kollektiv, der überhaupt Variation zeigt, sehr gering ist. In solchen Fällen sind große Stichprobenumfänge notwendig, um Häufigkeitsverschiebungen zu bemerken und statistisch absichern zu können. Einer der limitierenden Faktoren für größere Stichproben ist durch die strengen Auswahlverfahren der Paare bzw. Kollektive sensitiver und toleranter Fichten gegeben, die die Anzahl der zu untersuchenden Individuen beschränken. Zum anderen ist die Charakterisierung des Materials mit den hier angewendeten DNA-Markern noch mit erheblichem experimentellen Aufwand verbunden, der große Stichprobenumfänge erschwert.

Im Gegensatz zu den Isoenzym-Genmarkern konnten an jedem untersuchten Standort mindestens an einem DNA-Marker unterschiedliche Häufigkeiten von Allelen oder Genotypen zwischen sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven statistisch gesichert nachgewiesen werden. Die auffallenden EST-Loci waren in jedem der drei untersuchten Stressszenarien andere (Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung-Fläche A: PA0038; SO<sub>2</sub>-Belastung: PA0002; Streusalz-Belastung: PA0005 und PA0066). Dieses wird als Hinweis auf

unterschiedliche Selektionsprozesse in den drei Stressszenarien gewertet. Die größte Verschiebung der Genotyp-Häufigkeiten zwischen toleranten und sensitiven Teilkollektiven ist in dem mit Chlorid belasteten Bestand Mönichswald vorzutreffen. Der für Marker PA0005 und PA0066 homozygote Multilocus-Genotyp AA-BB wird von 31% der sensitiven, aber von 63% der toleranten Fichten getragen. Untersuchungen beider Marker an einer Fichten-Nachkommenschaft belegen, dass keine Kopplung zwischen ihnen besteht (BOZHKO *et al.* in Vorbereitung). Es handelt sich daher um unabhängig voneinander rekombinierende Loci, die eine epistatische Genwechselwirkung vermuten lassen. Für die Schätzung der Anpassungskapazität der gesamten Population des Mönichswaldes gegenüber Streusalzeinwirkungen ist auch derjenige Anteil an Fichten, welcher über die untersuchten Paaren von Individuen nicht erfasst wurde, mitzubersichtigen (ZIEHE und GREGORIUS 1996).

Besonders interessant ist der Fall des mehrmals auffallenden EST-Marker PA0066 (vgl. auch Diversität und Heterozygotie). Er liegt an der 3' untranslatierten Region eines Genes, was Homologien zu einem unter Kältestress induzierten Gen bei *Brassica napus* aufweist und für das ribosomale Protein L13-2 kodiert (SAEZ-VASQUEZ *et al.* 1993). Die zusätzlichen allgemeinen Erkenntnisse, dass Toleranz gegenüber Schadstoffen oft auf Pleiotropie beruht, wie z. B. bei dem Zusammenhang zwischen O<sub>3</sub> und Kälteresistenz in *Pinus tadea* (CHAPPELKA *et al.* 1990) lassen vermuten, dass das von PA0066 markierte Gen selbst in den hier studierten Selektionprozessen involviert ist. Weitere Untersuchungen, beispielsweise an der Expression dieses Genes in der Fichte unter Stressbedingungen, könnten dieser Hypothese auf den Grund gehen.

Nicht alle DNA-Marker, die mit stressinduzierten Genen verbunden sind, verhielten sich auffällig. Beispielsweise hätte man sich für den EST-Marker PA0038, der an einem Gen gekoppelt ist, welches eine hohe Identität zu einem Halotoleranzprotein aufweist (SCHUBERT *et al.* 2001), eine Unterscheidung von toleranten und sensitiven Kollektiven in der streusalzbelasteten Fläche vorstellen können. Als weiteres Beispiel sei hier Marker Cad7 genannt. Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (CAD) ist ein Enzym, was in der Biosynthese von Lignin aber auch in den Abwehrmechanismen (MITCHELL *et al.* 1994; BERGMANN *et al.* 1996) der Pflanzen eine Rolle spielt. In Fichtenkeimlingen, die erhöhten O<sub>3</sub>-Konzentrationen ausgesetzt wurden, konnte eine verstärkte Expression des für CAD kodierenden Genes beobachtet werden (BAUER *et al.* 1993; GALLIANO *et al.* 1993). DNA-Marker Cad7 liegt in einem Intron eines solchen CAD-Genes. Bei den hier untersuchten Umweltstressszenarien konnten keine genetischen Unterschiede zwischen toleranten und sensitiven Individuen an diesem Locus nachgewiesen werden. Dies ist trotz oder vielleicht gerade wegen der hohen Variation dieses Markers der Fall. Stochastische Assoziationen bezüglich der Anpassungskapazitäten können nur aufgedeckt werden, wenn die beobachteten genetischen Typen auch in hinreichenden Häufigkeiten vertreten sind. Demzufolge bilden Genloci mit nur wenigen genetischen Typen und einer hohen Gleichverteilung der gleichen den Idealfall. Hingegen können hochpolymorphe genetische Marker wie Cad7 oder Mikrosatelliten für Untersuchungen an Stressmerkmalen ungeeignet sein (ZIEHE und GREGORIUS 1996).

Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Abwesenheit von Häufigkeitsunterschieden an den ausgewerteten Genloci nicht das Fehlen jeglicher Anpassungsprozesse bedeutet. Die Marker liegen zwar im Bereich der angesprochenen Gene, aber sie spiegeln nicht unbedingt die Variation am kodierenden Bereich dieses Genes wieder.

### 5.3.2 Auswirkungen auf das Chloroplastengenom

#### • Vielfalt

Auch wenn, wie in *Abbildung 5.3-4* zu sehen, unter verschiedenen Stressbedingungen in den toleranten Großkollektiven eine höhere Vielfalt an Haplotypen zu finden ist, sollte sie nicht überbewertet werden. Bedingt durch die hohe Anzahl an identifizierten Haplotypen und dem hohen Anteil (46%) an seltenen Haplotypen ist die Vielfalt stark abhängig von der Stichprobengröße. Trotz gleich großer Großkollektive (sensitiv vs. tolerant) innerhalb eines Standortes können sich die Verhältnisse der beobachteten Vielfalt bei Auswertung geringerer Stichprobenumfänge ändern.

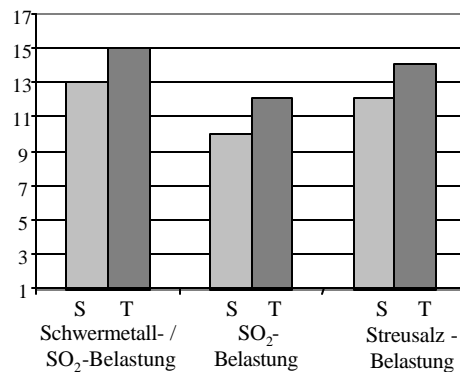


Abb. 5.3-4 Haplotypenvielfalt in den toleranten und sensitiven Großkollektiven in drei verschiedenen Stressszenarien.

Über den Vergleich sensibler und toleranter Kollektive hinaus ist zu beachten, dass bei drastischer Reduzierung der Populationsgröße, wie es in den Untersuchungsflächen wegen der starken Umweltbelastung der Fall ist, das Chloroplastengenom von genetischer Drift höher betroffen wird, als das Kerngenom. Die nicht vorhandenen Rekombinationsmöglichkeiten, bedingt durch den haploiden Zustand und die uniparentale Vererbung der Chloroplasten-DNA, reduzieren die effektive Populationsgröße zu einem Viertel im Vergleich zu der Kern-DNA (BLANCHARD und LYNCH 2000).

### • Diversität

Die Diversität der Haplotypen ist nicht so abhängig von der Stichprobengröße wie die Haplotypenvielfalt, weil in ihr die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Haplotypen mitberücksichtigt wird.

Wegen der hohen Variabilität der einzelnen cpSSR-Loci (4 bis 6 Varianten) kann, trotz Abwesenheit von Rekombination zwischen den Loci, eine hohe Anzahl an 3-Locus-Haplotypen gebildet werden. Die vielen unterschiedlichen Haplotypen, die auch noch zum Teil nur selten vorkommen, erschweren unter Umständen die Erkennung von Selektionseffekten am Chloroplastengenom. Aus diesem Grunde wurde die Diversität nicht nur an den 3-Locus-Haplotypen berechnet, sondern auch für jeden einzelnen Locus sowie für alle möglichen 2-Locus-Kombinationen.

Die in *Abbildung 5.3-5* dargestellte Diversität der Großkollektive beschädigter und vitaler Fichten an den drei umweltbelasteten Standorten verdeutlichen die zum Teil statistisch signifikanten Diversitätsunterschiede. Bei Betrachtung der Kombination aller drei analysierten cpSSR als 3-Locus-Haplotypen ist in allen Stressszenarien eine höhere Diversität bei den toleranten Großkollektiven vorzufinden. Während die Differenz zwischen Großkollektiven in dem mit Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-belasteten Standort nur geringfügig ausfällt, ist sie an den beiden anderen Standorten statistisch signifikant. Die Diversitätsunterschiede sind hauptsächlich dadurch gegeben, dass in toleranten Großkollektiven eine gleichmäßigere Verteilung der Haplotypen vorzufinden ist. Im Vergleich zu den sensitiven Großkollektiven ist die Häufigkeit des vorherrschenden Haplotyps „623“ bei den toleranten Fichten geringer, seltene Haplotypen werden entsprechend häufiger.

Weitere statistisch signifikante Diversitätsunterschiede zwischen sensitiven und toleranten Großkollektiven sind in dem SO<sub>2</sub>-belasteten Standort im sächsischen Erzgebirge bei Betrachtung des Locus *Pt26081* und der 2-Locus-Haplotypen „*Pt26081* + *Pt71936*“ nachzuweisen (vgl. *Abb. 5.3-5*). Diese Marker-Kombinationen zeigen an allen untersuchten Standorten eine höhere Diversität in den toleranten Großkollektiven

Interessant ist auch die Marker-Kombination „*Pt63718* + *Pt71936*“. An allen Versuchsstandorten sind statistisch signifikante Diversitätsunterschiede zu erkennen (vgl. *Abb. 5.3-5*). Während an zwei Standorten (Mönichswald und sächsisches Erzgebirge) die höhere Diversität in den toleranten Großkollektiven vorliegt, zeigt sich am dritten Standort (slowakische Spiš Region) die höchste Diversität im sensitiven Großkollektiv. Diese entgegengesetzten Ergebnisse machen darauf aufmerksam, dass Kollektive mit Fichten, die eine hohe Diversität in dem Chloroplastengenom aufweisen, nicht grundsätzlich besser auf Umweltstress vorbereitet sind.

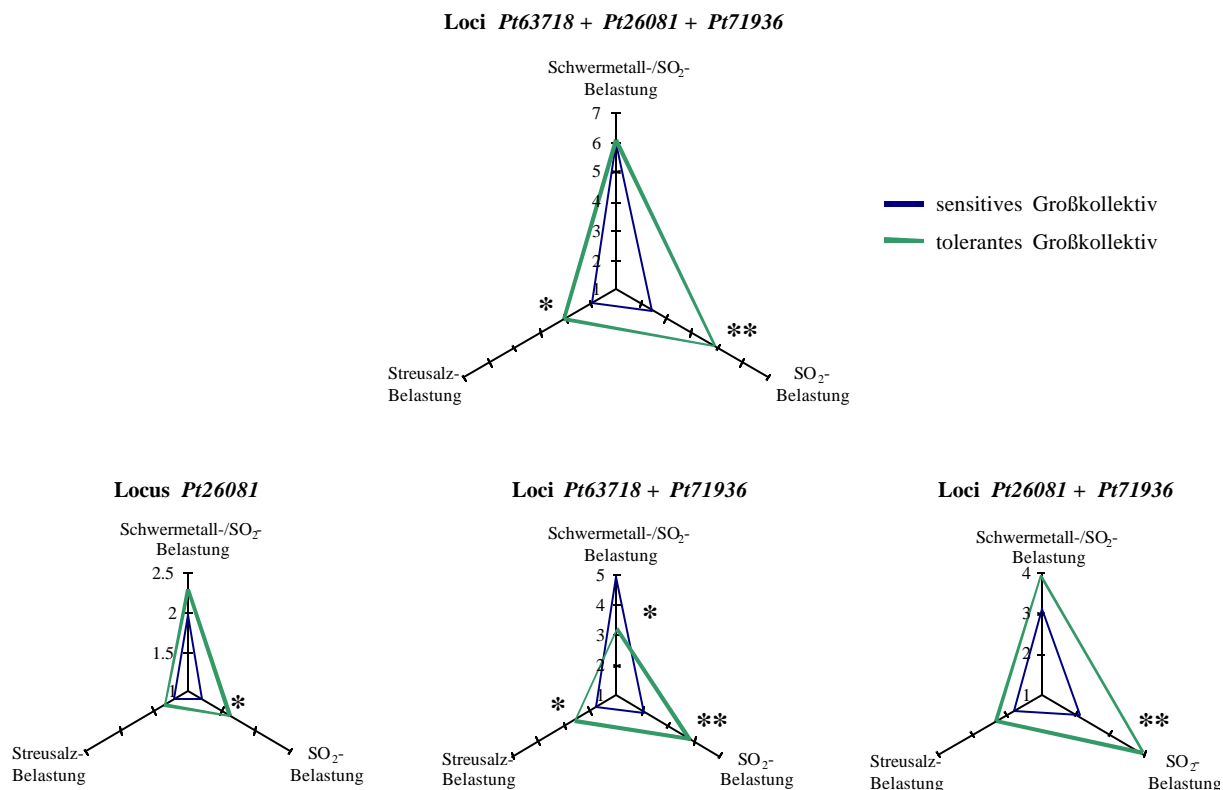


Abb. 5.3-5 Genetische Diversität anhand der Haplotypen in toleranten und sensitiven Großkollektiven in drei verschiedenen Stressszenarien. Dargestellt sind nur Loci-Kombinationen, an denen statistisch signifikante Diversitätsunterschiede nachgewiesen wurden (vgl. Anhang 8.4). Signifikante Diversitätsunterschiede: \* bei 5% bzw. \*\* bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit (Permutationstest);

Ergänzend sei hier noch einmal erwähnt, dass die Häufigkeit, mit der Haplotypen auftreten, sowie deren Diversität in dem Verbreitungsgebiet der Fichte stark schwanken (BUCCI und VENDRAMIN 2000). Wenn Kollektive, wie hier im Mönichswald und im sächsischen Erzgebirge, einen vorherrschenden Haplotyp besitzen (>62%), dann aber wegen genetischer Selektion ein seltener Haplotyp an Präsenz gewinnt, steigt die Diversität dieses Kollektivs. Ist aber die Ausgangssituation so, dass im Kollektiv eher eine Gleichverteilung der Haplotypen vorhanden ist, dann kann eine gerichtete Selektion auf einen oder mehreren dieser Haplotypen zu einem Diversitätsverlust führen. Wie das Beispiel zeigt, ist die gemeinsame Betrachtung der Häufigkeiten, mit denen die Haplotypen auftreten, und die Diversität sinnvoll.

#### • Häufigkeiten

In dem slowakischen Standort der Region Spiš kommt der ansonsten vorherrschende Haplotyp „623“ nicht so oft vor (vgl. Abb. 5.3-6). Dafür kommt der in den anderen Standorten seltene (<3%) Haplotyp „614“ im slowakischen Bestand mit Häufigkeiten von über 15% bzw. 25% (tolerant vs. sensitiv) vor. Diese Häufigkeitsunterschiede liegen mit großer Wahrscheinlichkeit an der geografischen Lage der untersuchten Fichtenbestände. Anhand

Untersuchungen mit den gleichen Chloroplasten-Mikrosatelliten in Fichtenprovenienzen des ganzen Verbreitungsgebietes, konnte eine Korrelation zwischen Haplotypen und Breiten- bzw. Längengrade festgestellt werden (VENDRAMIN *et al.* 2000). Die Autoren verbinden diese Ergebnisse mit den möglichen Migrationsruten nach der letzten Eiszeit, lassen aber auch die Möglichkeit eines kinalen Selektionsprozesses offen.

Nimmt man die von BUCCI und VENDRAMIN (2000) anhand Untersuchungen mit den gleichen Chloroplastenmarker postulierten genetischen Zonen für die Fichte als Referenz, so befindet sich der slowakische Versuchsstandort im „Center Carpathians“-Genpool, das sächsische Erzgebirge im „Center Europe“-Genpool und der Mönichswald im „Eastern Alps“- Genpool. Diese Genpools unterscheiden sich unter anderem hinsichtlich der Häufigkeit, mit welcher der von ihnen bezeichnete Haplotyp 01 vorkommt. Für Haplotyp 01, der dem hier als „623“ bezeichneten Haplotyp entspricht (*vgl. Kap. 5.2*), werden Häufigkeiten von 74% im „Eastern Alps“-Genpool, 64% im „Center Europe“-Genpool und mit 20% seltener im „Center Carpathians“-Genpool erwartet (BUCCI und VENDRAMIN 2000). Diese Erwartungs-Werte stimmen mit den Häufigkeiten des Haplotyps „623“ in den hier untersuchten Beständen überein (*vgl. Abb. 5.3-6*) und bestätigen eine geografische Differenzierung der Populationen.

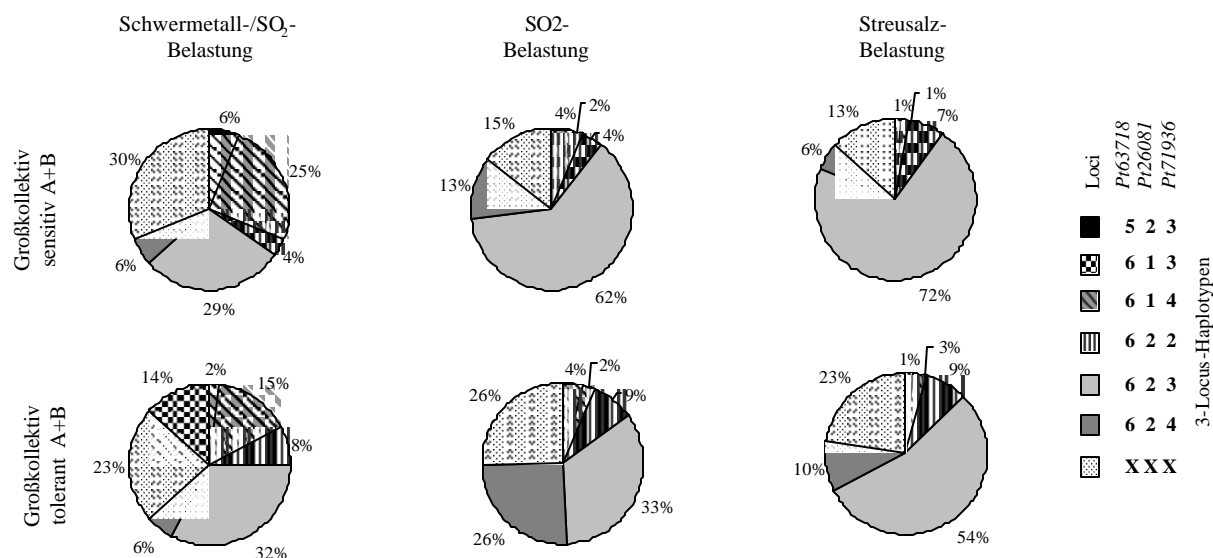


Abb. 5.3-6 Häufigkeit der 3-Locus-Haplotypen in den sensitiven und toleranten Großkollektiven in drei verschiedenen Stressszenarien.

Der Vergleich der Haplotyphäufigkeiten zwischen den sensitiven und toleranten Individuen eines Standortes liefert im Fall des mit SO<sub>2</sub> belasteten Standortes im Erzgebirge statistisch signifikante Unterschiede (*vgl. Abb. 5.3-6*). Der im sensitiven Großkollektiv vorherrschende Haplotyp „623“ (62%) nimmt im toleranten Großkollektiv um 29% Punkte ab. Nicht signifikant, aber eine starke Tendenz in die gleiche Richtung, konnte auf dem chloridbelasteten Standort nachgewiesen werden. Der gleiche Haplotyp „623“ nimmt von

sensitiven zu toleranten Großkollektiven bemerkenswert um 18% Punkte ab. Dass in den toleranten Großkollektiven fast alle selteneren Haplotypen proportionsgemäß häufiger auftreten, wird vorläufig als Zeichen einer gerichteten Selektion gegen Haplotyp „623“ gedeutet. Sowohl unter SO<sub>2</sub>-Belastung als auch bei Salzstress zeigen Fichten, die den Chloroplasten-Haplotyp „623“ tragen, eine geringere Anpassungsfähigkeit.

Im dritten untersuchten Standort ist festzustellen, dass Fichten, die Haplotyp „623“ tragen, offenbar nicht von der Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung differenziert betroffen werden. Dafür ist bei dem toleranten Großkollektiv eine Verringerung des Anteils an Haplotyp „614“ zu bemerken. Noch auffälliger ist das Vorkommen des Haplotyps „613“ (14%) bei den toleranten Fichten, da dieser Haplotyp bei den sensitiven Fichten nicht vorzufinden ist. Der auch an diesem Standort agierende Selektionsdruck auf das Chloroplastengenom wird bei Betrachtung der Häufigkeiten der 2-Locus-Haplotypen (*Pt63718* + *Pt71936*) deutlicher (*vgl. Kap. 4.3.1*). Haplotyp „6-3“ kommt in 29% der sensitiven aber in 49% der toleranten Fichten vor.

Eine gerichtete genetische Selektion des Chloroplastengenoms in Fichtenpopulationen ist denkbar, da in mehreren Kulturpflanzen der Einfluss von verschiedenen Genen aus dem Chloroplastengenom auf Herbizidresistenz, Hitzetoleranz, Antibiotikaresistenz und Sensitivität gegenüber Krankheiten und anderen physiologisch wichtigen Eigenschaften bereits bewiesen wurde (ROBERTSON und FREY 1984; OXTOBY und HUGHES 1989; DE BROUX *et al.* 1990; KAVANAGH *et al.* 1994; HECKATHORN *et al.* 1998). Die Fixierung solcher positiven Gene wird aber durch die Tatsache, dass alle Gene des Chloroplastengenoms miteinander gekoppelt sind, erschwert. Die phänotypische Auswirkung einer positiven Mutation kann leicht durch ein nachteiliges Gen überschattet werden (BLANCHARD und LYNCH 2000). Es ist auch zu beachten, dass bereits epistatische Effekte zwischen dem Chloroplasten- und Kern-Genom beschrieben wurden, die sich z.B. auf die Viabilität von Embryonen auswirken (CRUZAN und ARNOLD 1999). Bislang wurden keine ökologisch-genetischen Studien an Freilandpopulationen durchgeführt, die sich mit Selektionsprozessen im Chloroplastengenom beschäftigt hätten. Die Ergebnisse dieses ersten Ansatzes deuten auf Selektionsereignisse auf Chloroplastenebene, die durch starke Umweltbelastungen ausgelöst werden. Weitere Untersuchungen werden erforderlich sein, um das Ausmaß der genetischen Selektion zu beurteilen und genauere Beziehungen zwischen dem Chloroplasten- und Kerngenom in der Reaktion auf Umweltstress festzustellen.



## 5.4 Pilotstudie an Tief- und Hochlagenfichten

Bäume, die in hohen Gebirgslagen wachsen, müssen besonders gut an ihre Umwelt angepasst sein, da sie unter sehr spezifischen klimatischen Bedingungen leben. Im Vergleich zu tieferen Lagen haben Wälder in Hochlagen nicht nur eine kürzere Vegetationsperiode, sie sind auch mehr von Frostschäden, Schneebruch, Trockenheit und erhöhten Ozonkonzentrationen (PAFFRATH und PETERS 1988) betroffen. Die Fichte hat sich mit einem besonderen Wachstumshabitus an solche extreme Lagen anpassen können (SCHMIDT-VOGT 1977). Um die Anpassung von Fichten an Hochlagen auch in Form von Veränderungen genetischer Strukturen zu untersuchen, wurden zwei Populationen im Nationalpark Berchtesgaden in diese Pilotstudie einbezogen.

Die allelische Vielfalt an den 8 DNA-Loci und 13 Isoenzym-Genloci ist in der untersuchten Naturverjüngung von Hochlagenfichten etwas niedriger als in dem Altbestand der Tieflage. Im Gegensatz hierzu ist die genetische Diversität in dem hochgelegenen Bestand höher. Ein Grund für die Differenz in der Vielfalt, nicht aber in der Diversität, könnten die unterschiedlichen ontogenetischen Stadien der Populationen sein. Ein Vergleich der Naturverjüngung mit dem entsprechenden Altbestand der hier untersuchten Hochlage in Berchtesgaden ergab, im Gegensatz zu anderen Alpentransekten, eine höhere genetische Vielfalt und Diversität bei den älteren Fichten (MÜLLER-STARCK *et al.* 2000). Bei den Untersuchungen in Fichtenpopulationen auf drei Höhenstufen (1000-1200m ü. NN; 1400-1500m ü. NN; 1800-2000m ü. NN) in vier Transekten entlang der Alpen wurde die höchste genetische Diversität für die Fichte in dem mittleren Höhenbereich ermittelt. Die Autoren nehmen an, dass die Reduzierung der Variation innerhalb der Bestände an der Waldgrenze durch selektive Anpassungsprozesse im Zuge der meist extremen Umweltbedingungen verursacht wird und in Lagen um 1000m durch einen stärkeren menschlichen Einfluss im Zuge der Bewirtschaftung bedingt ist (MÜLLER-STARCK *et al.* 2000). Da in der hier vorgelegten Arbeit nur zwei Populationen aus extremen Höhenstufen untersucht wurden, kann zu dieser Annahme keine Stellung genommen werden.

Andererseits liegt die genetische Variation innerhalb einer Population, die mit Isoenzym-Markern an 20 Fichtenpopulationen der Schweizeralpen (1100 bis 1900m ü. NN) untersucht wurde, ähnlich hoch wie Referenzdaten von Tieflagen (MÜLLER-STARCK 1995a).

MÜLLER-STARCK *et al.* (2000) ermittelten einen genetischen Abstand (Isoenzym-Genloci) von 3,6% zwischen der von ihnen untersuchten Fichten in den tiefsten (1000m) und höchsten (1800m) Lagen des Nationalparks Berchtesgaden. Ein ähnlich hoher genetischer Abstand von 4,4% wurde anhand von Isoenzym-Genmarkern in der hiesigen Pilotstudie zwischen Tief- (800m) und Hochlagenfichten (1800m) ermittelt. Gemessen an den DNA-Markern fiel der Abstand mit 6,9% etwas höher aus.

Von den insgesamt 21 untersuchten Loci im Kerngenom unterscheidet sich die Häufigkeit der Allele zwischen Tief- und Hochlagen der Pilotstudie statistisch signifikant nur für den

Isoenzym-Marker ACO-A. Dennoch, ob die Unterschiede an diesem Locus mit einem Höhengradient korrelieren, muss in weiteren Studien in anderen Bergregionen überprüft werden. Ein Zusammenhang zwischen genetischen Merkmalen und morphologischer Variation entlang von Höhentransekten wurde besonders auffällig mittels des Enzymsystem der sauren Phosphatase (SAP)(BERGMANN 1978; RUETZ und BERGMANN 1989). Dieses Enzymsystem wurde wegen seiner gewebespezifischen Isoenzym-Muster im Rahmen der vorgestellten Pilotstudie nicht analysiert.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch innerhalb des Nationalparks Mitte des 19. Jahrhunderts mit nicht-autochthonen Saat- und Pflanzengut aufgeforstet wurde. Dies betrifft hauptsächlich tiefergelegene und leicht erreichbare Flächen (RUETZ und BERGMANN 1989).

Mit Hilfe von Chloroplasten-Mikrosatelliten können nicht autochthone Fichtenpopulationen in großräumigen Bereichen erkannt werden (BUCCI und VENDRAMIN 2000). Das Auftreten des Haplotyps „623“ mit Häufigkeiten von 73% und 63% in den Tief- bzw. Hochlagenfichten der Pilotstudie liegt den von BUCCI und VENDRAMIN (2000) erwarteten 74% für das entsprechende „Eastern Alps“-Genpool nahe (vgl. Kap. 5.3.2). Auch wenn eine künstliche Verjüngung für den tiefergelegeneren Bestand nicht ausgeschlossen werden kann, stammt das Ausgangsmaterial höchstwahrscheinlich aus dem bayerischen Raum.

An den anhand von drei Chloroplasten-Mikrosatelliten bestimmten Haplotypenhäufigkeiten und an der Diversität unterscheiden sich die untersuchte Tief- und Hochlagenpopulation nicht statistisch signifikant. Dennoch ist ein beachtlicher Diversitätsunterschied von 1,84 auf 2,42 zwischen den Populationen zu verzeichnen. Die höhere Chloroplasten-Diversität besteht in der Population, die an der Waldgrenze angesiedelt ist. Der Vergleich von Hochlagenfichten, die toleranter gegenüber mehreren Stressfaktoren (z.B. Trockenheit, Ozon; PAFFRATH und PETERS 1988) sein müssen, mit den Tieflagenfichten lässt eine gewisse Parallele zu dem Vergleich toleranter und sensitiver Kollektive in umweltbelasteten Standorten erkennen. Die Diversität in der Tieflagen-Population entspricht 76% der der Hochlagen-Population und in den untersuchten Stressszenarien entspricht die Chloroplasten-Diversität der sensitiven Fichten 49% (SO<sub>2</sub>-Belastung), 63% (Streusalzbelastung) und 98% (Schwermetall- und SO<sub>2</sub>-Belastung) der der toleranten Fichtenkollektive (vgl. Anhang 8.4). In wie weit es sich bei den hier nachgewiesenen Unterschieden zwischen Tief- und Hochlagenfichten um Selektionsprozesse, die das Chloroplastengenom betreffen, handelt, muss an weiteren Höhentransekten entlang der Alpen überprüft werden.

## 5.5 Schlussfolgerungen

Die ausgewählte Strategie für die Markerentwicklung erwies sich als erfolgreich, denn es konnten sechs neue, für Populationsstudien geeignete EST-Marker etabliert werden. Diese unter sich frei rekombinierenden Marker zeigen ein höheres Maß an genetischer Variation innerhalb einer Fichtenpopulation als klassische Isoenzym-Genmarker. Bedingt durch die im Vergleich zu Isoenzym-Genmarkern bessere Häufigkeitsverteilung der Allele weisen die EST-Marker nicht nur eine höhere Diversität, sondern auch höhere Heterozygotie-Werte auf. Diese Eigenschaften zeichnen die Eignung der neuen DNA-Marker aus, um Prozesse wie Selektion, genetische Drift und Inzucht in Fichtenpopulationen zu charakterisieren.

Die mit Kern-Markern durchgeführten genetischen Populationsstudien ergaben an allen untersuchten umweltbelasteten Standorten in toleranten Fichtenkollektiven eine geringere Vielfalt, Diversität und Heterozygotie als in sensitiven Kollektiven. In den meisten Fällen werden diese Tendenzen sowohl an den Mittelwerten der DNA-Marker als auch an denen der Isoenzym-Genmarker erkannt. Dieser eindeutige Verlust an genetischer Variation in den toleranten Kollektiven belegt auf DNA-Ebene gerichtete genetische Veränderungen in den Populationen, die durch anthropogene Schadstoffeinträge ausgelöst wurden. Ein solcher Verlust ist bei relativ homogenen und zeitlich konstant einwirkenden Umweltbedingungen oder bei starkem Vorherrschen eines Stressors zu erwarten. Der Fixierungsindex liegt bei den sensitiven Fichtenkollektiven unter dem der toleranten und belegt damit, dass die Kausalität des frühen Absterbens einiger Fichten nicht auf Inzuchtdepression beruht.

Es ist hervorzuheben, dass die einzelnen Loci eine sehr unterschiedliche Abhängigkeit gegenüber Selektionsereignissen zeigen. Einige DNA-Marker und damit die durch sie identifizierten Genombereiche werden unter den sehr unterschiedlichen Stressbedingungen der drei untersuchten Standorte gleichermaßen von dem Selektionsdruck betroffen. Hingegen sind an anderen DNA-Markern stark standortabhängige Diversitäts- bzw. Heterozygotieunterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven erkennbar. Eine stressorspezifische Antwort wird auch von der Tatsache unterstützt, dass die Marker, an denen Unterschiede in den Allel- bzw. Genotyphäufigkeiten nachgewiesen wurden, standortabhängig waren. Diese zum Teil erheblichen Häufigkeitsverschiebungen zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven verdeutlichen den hohen Informationsgehalt der neu entwickelten DNA-Marker für die ökologische Forstgenetik.

Die Chloroplasten-Mikrosatelliten zeigten ein hohes Maß an Variation innerhalb von Fichtenpopulationen. Dieses erlaubte die genetische Charakterisierung des Chloroplastengenoms von sensitiven und toleranten Kollektiven der Fichte in umweltbelasteten Beständen. Die auftretenden, statistisch signifikanten Unterschiede in der Diversität und in der Haplotypenhäufigkeit zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven werden als klare Hinweise auf Selektion im Chloroplastengenom gedeutet. Dieses Ereignis wurde zum ersten Mal anhand molekularer Marker in Freilandpopulationen von Waldbäumen nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den schadstoffbelasteten Standorten konnten in der Pilotstudie an Fichten der Tief- und Hochlagen weder mit DNA-Markern noch mit Chloroplasten-Mikrosatelliten eindeutige Unterschiede zwischen den Populationen festgestellt werden. Lediglich ein Isoenzym-Genlocus erlaubte die Unterscheidung beider Populationen.

Die durchgeführten Genomanalysen sind ein Beitrag zum Verständnis der genetischen Konsequenzen von Anpassungsprozessen in langlebigen Waldpopulationen. Darüber hinaus erlauben die neu erarbeiteten Kenntnisse einen ersten Schritt in Richtung einer Marker gestützten Selektion, die über das klassische Ziel, der Erhöhung der Schadstofftoleranz, hinausgeht. Vorstellbar ist, dass mit dieser Methode gezielt an einzelnen, adaptivitäts-relevanten Genloci auf eine hohe genetische Variation in Vermehrungsgut geachtet wird, die zukünftige Anpassungsprozesse der Population ermöglicht.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) gehört sowohl aus ökonomischer wie auch aus ökologischer Sicht zu den wichtigsten Baumarten Europas. Ihre Bestände sind nach wie vor von sogenannten neuartigen Waldschäden betroffen, auch wenn in den letzten Jahren anthropogene Schadstoffimmissionen abgenommen haben. Die Auswirkungen der Selektion in umweltbelasteten Beständen auf die genetische Zusammensetzung der Populationen wurden bislang mit Isoenzym-Genmarkern beschrieben. Die heutzutage gegebenen Möglichkeiten zur Erweiterung des genetischen Markerspektrums auf DNA-Ebene für das Kern- wie auch für das Organellengenom eröffnen neue Chancen, Anpassungsprozesse in Freilandpopulationen zu untersuchen.

Aus diesem Zusammenhang ergaben sich die Zielsetzungen der Arbeit: Zunächst sollten neue Kern-DNA-Marker entwickelt und auf ihre Eignung für populationsgenetische Studien getestet werden. Der zweite Schwerpunkt lag in der Anwendung dieser Marker sowie etablierter Chloroplasten-Mikrosatelliten zur Untersuchung der Auswirkungen von unterschiedlicher Umweltbelastung auf die genetische Struktur von Fichtenpopulationen. Klassische Isoenzym-Genmarker wurden zusätzlich als Referenzdaten herangezogen.

Ausgehend von 15 Gensequenzen und unterstützt von PCR-Techniken konnten sechs neue kodominante EST-Marker etabliert werden, die bisher nicht untersuchte Bereiche des Fichtengenoms identifizieren. Die Prüfung dieser locuspezifischen Marker in der Referenzpopulation Kranzberger Forst belegen ihre gute Eignung zum Nachweis und zur Quantifizierung genetischer Variation innerhalb von Populationen. Im Vergleich zu Isoenzym-Genmarkern zeigen sie eine gleichmäßigere Allelverteilung und lassen damit ein hohes Maß an genetischer Diversität und Heterozygotie erfassen. Ergänzende Überprüfungen der Rekombination erbrachten keine Hinweise auf Kopplungen zwischen den Loci der neuen Marker.

Für die ökologisch-genetischen Studien wurden Fichtenpopulationen aus drei verschiedenen Stressszenarien herangezogen. Hauptstressoren waren Schwermetalle und SO<sub>2</sub> an einem Standort in der slowakischen Spiš Region, SO<sub>2</sub> in einer Mischklonplantage im sächsischen Erzgebirge und Streusalz im bayerischen Mönichswald bei Gunzenhausen. An jedem Standort wurden in zwei Versuchsflächen jeweils die Individuen entgegengesetzter Merkmalsausprägungen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber den einwirkenden Schadstoffen (sensitiv vs. tolerant) bestimmt. Die genetische Struktur sensibler und toleranter Fichtenkollektive wurden anhand von acht DNA-Markern und 19 Isoenzym-Genloci für das Kerngenom sowie mit Hilfe von drei Mikrosatelliten für das Chloroplastengenom ermittelt.

Schadstofftolerante Fichten weisen im Vergleich zu sensiblen eine geringere genetische Variation auf. Dies betrifft alle Mittelwerte der auf Kern-Markern beruhenden Variationsmaße. Darüber hinaus wurden die DNA-Loci einzeln ausgewertet. Dabei war zu erkennen, dass die Marker in unterschiedlicher Weise vom Selektionsdruck erfasst werden. Während

einige Marker unter allen verschiedenen Stressbedingungen gleichermaßen betroffen sind, zeigen andere nur unter spezifischen Umweltbedingungen Unterschiede zwischen sensitiven und toleranten Kollektiven. Insgesamt konnten an keinem der Isoenzymgenloci aber an vier DNA-Markern statistisch signifikante Unterschiede in der Allel- und/oder Genotypenhäufigkeit zwischen Kollektiven nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen den hohen Informationsgehalt der neu entwickelten DNA-Markern.

Deutliche Häufigkeitsverschiebungen zwischen sensitiven und toleranten Fichtenkollektiven traten ebenfalls bei den Haplotypen des Chloroplastengenoms auf. Diese drücken sich auch in Diversitätsunterschieden aus, die an allen drei Stressszenarien statistisch abgesichert werden konnten. Die Ergebnisse sind als Hinweis eines durch Umweltstress ausgelösten Selektionsdruckes auf das paternal vererbte Chloroplastengenom zu interpretieren.

Weiterhin wurden zwei Fichtenpopulationen verschiedener Höhenlagen (800m vs. 1800m ü. NN), also klimatisch stark differierendem natürlichen Umweltstress entstammend, untersucht. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den mit anthropogenen Schadstoffen belasteten Flächen konnten in dieser Pilotstudie weder mit Kern-DNA noch mit Chloroplasten-Markern statistisch signifikante Unterschiede zwischen Populationen festgestellt werden.

Die Gesamtheit der genetischen Erhebungen an Fichtenpopulationen zeigt deutlich, daß der Forstgenetik mit den in der Arbeit neu entwickelten DNA-Markern vielversprechende molekulare Werkzeuge zur Verfügung stehen.

## 6 SUMMARY

Both, from an economical and ecological perspective, Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) is one of Europe's most important tree species. Forest stands are still being affected by the so-called novel forest die back, even though for the last years anthropogenetic pollutant emissions have been reduced. So far, the effects of selection in such polluted populations on the genetic composition of the populations have been described by isoenzyme gene markers. The possibilities of extending the range of gene markers available today to the DNA level for nuclear- as well as organelle genomes provide new prospects for investigating adaptation processes in field populations.

The objectives of the present study were based on the following context: First, new nuclear DNA markers had to be developed and tested for their suitability in population genetic studies. The second emphasis was put on the application of these markers in addition to established chloroplast microsatellites to investigate the effects of different environmental pollutions on the genetic structure of Norway spruce populations. As reference isoenzyme gene markers were used.

Starting from 15 gene sequences, and based on PCR-techniques, six new codominant EST-markers could be established, identifying areas of the spruce genome which have not been investigated so far. The analysis of these locus-specific markers in a reference population indicated their suitability for proving and quantifying genetic variation in populations. Compared to isoenzyme gene markers, they specify a more even allele distribution and enable the detection of a high degree of genetic diversity and heterozygosity. Analysis of recombination indicated no linkage among loci of the new markers.

Spruce populations from three different stress scenarios were taken for ecological genetic studies. The main stressors were heavy metals and SO<sub>2</sub> at a site close to Spiš (Slovakia), SO<sub>2</sub> in a clone plantation in the Saxonian Ore mountains and salt in the Mönichswald near Gunzenhausen (Bavaria). At each location, the individuals with opposite characteristics with regards to the sensitivity towards the affecting harmful substance, were identified in pairs and grouped (sensitive vs. tolerant). The genetic structure of sensitive and tolerant spruce collectives was studied by eight DNA markers and 19 isoenzyme gene loci for the nuclear genome as well as by three microsatellites for the chloroplast genome.

When compared to sensitive collectives, pollutant-tolerant individuals showed a lower genetic variation. This was indicated by all mean values of the variation estimators based on nuclear markers. The evaluation of single DNA loci revealed the fact that markers are indeed affected by pressure selection in different ways. While some markers are equally affected by different stress scenarios others showed differences between sensitive and tolerant collectives only under specific environmental conditions. In all, statistically significant differences in allele- and/or genotype frequencies between collectives could be verified in none of the

isozyme gene loci, but noteworthy, in four of the DNA markers. These results reflect the high potential of the newly developed DNA markers.

In addition, clear frequency shifts between sensitive and tolerant collectives of Norway spruce were indicated regarding the haplotypes of the chloroplast genome. These deviations are also expressed in terms of differences in diversity which could be statistically verified in all three stress scenarios. The results are interpreted as an indication for selection pressure triggered by environmental stress on the paternally inherited chloroplast genome.

Furthermore, two spruce populations from different altitudes, (800m vs. 1800m above sea level) which represent notorious different natural environments were investigated. In contrast to the studies of anthropogen stress conditions, statistically significant differences among populations could neither be identified with nuclear DNA, nor could with chloroplast markers.

This genetic survey of spruce populations clearly proves that the DNA markers developed within this study are promising molecular tools for the field of forest genetics.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- AHUJA-M., DEVEY M., GROOVER A., JERMSTAD K. und NEALE D. 1994: Mapped DNA probes from loblolly pine can be used for restriction fragment length polymorphism mapping in other conifers. *Theor. Appl. Genet.* 88: 279-282.
- BAKHTIYAROVA R., STAROVA N. und YANBAEV Y. 1995: Genetic changes in populations of Scots pine growing under industrial air pollution conditions. *Silvae Genetica* 44: 157-160.
- BARTELS H. 1971: Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta* 99: 283-289.
- BAUER S., GALLIANO H., PFEIFFER F., MEBNER B., SANDERMANN H. und ERNST D. 1993: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel-short-chain alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Plant Physiology* 103: 1479-1480.
- BERGMANN F. 1971: Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. *AFZ* 142: 278-280.
- BERGMANN 1978: The allelic distribution at an acid phosphatase locus in Norway spruce (*Picea abies*) along similar climatic gradients. *Theor. Appl. Genet.* 52: 57-64.
- BERGMANN F. 1991: Causes and consequences of species-specific genetic variation patterns in European forest tree species: Examples with Norway spruce and Silver fir. In: Müller-Starck G. und Ziehe M. (Hrsg.): *Genetic variation in European populations of forest trees*. Sauerländer's, Frankfurt am Main, S.192-204.
- BERGMANN F. und HOSIUS B. 1996: Effects of heavy metal polluted soils on the genetic structure of Norway spruce seedling populations. *Water-, Air- and Soil-Pollution* 89: 363-373.
- BERGMANN F. und LEINEMANN L. 2000: Nutzen molekularer Marker bei der Ausweisung von Genreservaten (Genressourcen). In: Finkeldey R., Bonfils P., Landolt R. (Hrsg.): *Forstliche Genreservate*. Swiss federal Research Institute WSL, Birmensdorf, S. 115-120.
- BERGMANN F. und SCHOLZ F. 1987: The impact of air pollution on the genetic structure of Norway spruce. *Silvae Genetica* 36: 80-83.
- BERGMANN F. und SCHOLZ F. 1989: Selection effects of air pollution in Norway spruce (*Picea abies*) populations. In: Scholz F., Gregorius H. und Rudin D. (Hrsg.): *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations*. Springer-Verlag, Berlin, S. 143-160.
- BERGMANN F., VORNAM B. und HOSIUS B. 1996: Coniferyl alcohol dehydrogenase, a multifunctional isozyme-gene-system in Norway spruce, affects the armillaria resistance of young trees. *Silvae Genetica* 45: 256-259.
- BINELLI G. und BUCCI G. 1994: A genetic linkage map of *Picea abies* Karst., based on RAPD markers, as a tool in population genetics. *Theor. Appl. Genet.* 88: 283-288.
- BLANCHARD J. und LYNCH M. 2000: Organellar genes. Why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics* 16: 315-320.
- BUCCI G., KUBISIAK T., NANCE W. und MENOZZI P. 1997: A population 'consensus', partial linkage map of *Picea abies* Karst. based on RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 643-654.
- BUCCI G. und MENOZZI P. 1995: Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. *Heredity* 75: 188-197.
- BUCCI G. und VENDRAMIN G. 2000: Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Mol. Ecol.* 9: 923-934.
- BUCHA T., MANKOVSKÁ B., MINOÁŠ J., MOLNÁROVÁ H., PAVLENDÁ P., PAJTÍK J. und RAŠI R. 2000: Zdravotný stav lesov Slovenska. [Health state of forests of Slovakia]. MP SR, Bratislava, LVÚ, Zvolen.
- BUCHERT G., RAJORA O. HOOD J. und DANCÍK B. 1997: Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada. *Conservation Biology* 11: 747-758.

- BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN 1993: Bundeswaldinventur 1986-1990. Band 1. Bonn.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN 2000: Waldzustandsbericht der Bundesregierung. Bonn.
- BURG K., FLUCH S. und VENDRAMIN G. 1998: cpDNA. In: Karp A., Isaac P., Ingram D. (Hrsg.): Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals. Chapman and Hall, London, S. 223-228.
- CALLEN D., THOMPSON A., SHEN Y., PHILLIPS H., RICHARDS R., MULLEY J. und SUTHERLAND G. 1993: Incidence and origin of "Null alleles" in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52: 922-927.
- CAMBEL S. 1986: Dejiny Slovenska I [History of Slovakia I]. Veda, Bratislava.
- CANO R., POINAR H., PIENIAZEK N., ACRA A. und POINAR G. 1993: Amplification and sequencing of DNA from 120-135-million-year-old weevil. Nature 363: 536-538.
- CATO S., GARDNER R., KENT J. und RICHARDSON T. 2001: A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. Theor. Appl. Genet. 102: 296-306.
- CHAPPELKA A., KUSH J., MELDAHL R. und LOCKABY B. 1990: An ozone-low temperature interaction in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). New Phytologist 114: 721-726.
- CRUZAN M. 1998: Genetic markers in plant evolutionary ecology. Ecology 79: 400-412.
- CRUZAN M. und ARNOLD M. 1999: Consequences of cytonuclear epistasis and assortative mating for the genetic structure of hybrid populations. Heredity 82: 36-45.
- DE BROUX S., GREEN D. und SHOEMAKER R. 1990: Effects of unique cytoplasms on agronomic and physiological traits of soybean. In: Bleile D. (Hrsg.): Proc. 3rd Biennial Conf. Mol. Cell. Biol. Soybean. Iowa, S. 8.
- DEGEN B. 1998: GDA&NT Genetic Data Analysis and Numerical Tests. Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Grosshansdorf.
- DEGEN B. und SCHOLZ F. 1998: Ecological genetics in forest ecosystems under stress as analysed by the simulation model eco-gene. Chemosphere 36: 819-824.
- DENGLER A. 1980: Waldbau. 5. Auflage, erster Band, neubearbeitet von E. Röhrig. Hamburg und Berlin: Parey.
- DOYLE J. und DOYLE J. 1989: Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1: 13-15.
- ECHT C., DEVERNO L., ANZIDEI M. und VENDRAMIN G. 1998: Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. Mol. Ecol. 7: 307-316.
- ECHT C., MAY-MARQUARDT P., HSEIH H. und ZAHORCHAK R. 1996: Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. Genome 39: 1102-1108.
- FELSENSTEIN J. 1993: PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- GALLIANO H., CABANÉ M., ECKERSKORN C., LOTTSPEICH F., SANDERMANN H., UND ERNST D. 1993: Molecular cloning, sequence analysis and elicitor/ozone – induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). Plant Mol. Biol. 23: 145-156.
- GEBUREK T. 2000: Effects of environmental pollution on the genetics of forest trees. In: Young A., Boshier D. und Boyle T. (Hrsg.): Forest conservation genetics: principles and practice. CSIRO Publishing, Collingwood and CABI Publishing, Wallingford, S. 135-157.
- GEBUREK T., MÖTTINGER-KROUPA S., MORGANTE M. und BURG K. 1998: Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Austria. II microspatial patterns derived from nuclear sequence tagged microsatellite sites. Forest Genetics 5: 231-237.
- GEBUREK T., SCHOLZ F., KNABE W. und VORNWEG A. 1987: Genetic studies by isozyme gene loci on tolerance and sensitivity in an air polluted *Pinus sylvestris* field trial. Silvae Genetica 36: 49-53.
- GILLET E. 1994: GSED. – Genetic Structure from Electrophoresis Data. User's Manual. Göttingen.

- GILPIN B., MCCALLUM J., FREW T. und TIMMERMAN-VAUGHAN G. 1997: A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 95: 1289-1299.
- GLAUBITZ C. und MORAN G. 2000: Genetic Tools: The use of biochemical and molecular markers. In: Young A., Boshier D. und Boyle T. (Hrsg.): *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO Publishing, Collingwood and CABI Publishing, Wallingford, S. 39-59.
- GOVINDARAJU R. und CULLIS C. 1991: Modulation of genome size in plants: the influence of breeding system and neighbourhood size. *Evol. Trends Plants* 5: 43-51.
- GREGORIUS H. 1974: Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung: Genetischer Abstand zwischen Populationen. *Silvae Genetica* 23: 22-27.
- GREGORIUS H. 1987: The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* 74: 397-401.
- GREGORIUS H. 1989: The attribution of phenotypic variation to genetic or environmental variation in ecological studies. In: Scholz F., Gregorius H. und Rudin D. (Hrsg.): *Genetic effects of air pollutants in forest tree populations*. Springer-Verlag, Berlin, S. 3-15.
- GREGORIUS H. 1991: Limitations of gene markers as applied to the characterization of plant mating systems. In: Fineschie S., Malvolti M., Cannata F. und Hattemer H.: *Biochemical markers in the population genetics of forest trees*. SPB Academic Publishing. S. 129-141.
- GREGORIUS H., KRAUHAUSEN J. und MÜLLER-STARCK G. 1986: Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* L. *Heredity* 57: 255-262.
- HANSEN J., SAXE H., RAEBILD A., NIELSEN C., SIMONSEN J., LARSEN J. und WELLENDORF H. 1998: Decline and physiological response to foliar-deposited salt in Norway spruce genotypes: a comparative analysis. *Can. J. For. Res.* 28: 1879-1889.
- HARRY D., TEMESGEN B. und NEALE D. 1998: Codominant PCR-based markers for *Pinus taeda* developed from mapped DNA clones. *Theor. Appl. Genet* 97: 327-336.
- HASTINGS A. 1990: The interaction between selection and linkage in plant populations. In: Brown A., Clegg M., Kahler A. und Weir B. (Hrsg.): *Plant population genetic, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates Inc. Sauerland, Massachusetts, S. 163-180.
- HATTEMER H., ZIEHE M., GEHLE T. und FROMM M. 2000: Genetische Aspekte der Erhaltungsbiologie von Holzpflanzen. In: Finkeldey R., Bonfils P. und Landolt R. (Hrsg.): *Forstliche Genreservate*. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, S. 9-28.
- HECKATHORN S., DOWNS C., SHARKEY T. und COLEMAN J. 1998: The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiology* 116: 439-444.
- HIPKINS V., MARSHALL K., NEALE D., ROTTMANN W. und STRAUSS S. 1995: A mutation hotspot in the chloroplast genome of a conifer (Douglas-fir: *Pseudotsuga*) is caused by variability in the number of direct repeats derived from a partially duplicated tRNA gene. *Current Genetics* 27: 572-579.
- HOSIUS B. 1994: Auswirkungen von Schwermetallstress auf die genetischen Strukturen verschiedener Fichtenprovenienzen. *Göttinger Forstgenetische Berichte* 17. Göttingen.
- HOSIUS B., BERGMANN F. und HATTEMER H. 1996: Physiologische und genetische Anpassung von Fichtensämlingen verschiedener Provenienzen an schwermetallkontaminierten Böden. *Forstarchiv* 67: 108-114.
- HUNTLEY B. und BIRKS H. 1983: *An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 years ago*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KARNOSKY D. 1983: Variation in Air Pollution Responses of Hardwood Trees. *Aquilo. Ser. Bot.* 19: 183-188.
- KARP A., ISSAC P. und INGRAM D. 1998: *Molecular Tools for Screening Biodiversity. Plants and animals*. Chapman and Hall. London.

- KAVANAGH T., O'DRISCOLL K., McCABE P. und DIX P. 1994: Mutations conferring lincomycin, spectinomycin and streptomycin resistance in *Solanum nigrum* are located in three different chloroplast genes. *Molecular and General Genetics* 242: 675-680.
- KINLAW C., GERTTULA S. und CARTER M. 1994: Lipid transfer protein genes of loblolly pine are members of a complex gene family. *Plant Mol. Biol.* 26: 1213-1216.
- KÖHLER W., SCHACHTEL G. und VOLESK P. 1996: Biostatistik. 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin.
- KONNERT M. 1992: Genetische Untersuchungen in geschädigten Weißtannenbeständen (*Abies alba* Mill.) Südwestdeutschland. Mitt. der Forstl. Vers. und Forschungsanstalt Baden-Württemberg, Freiburg, Heft 167.
- KONNERT M. 1995: Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und Weißtanne (*Abies alba* Mill.) – Anleitung zur Trennmethode und Auswertung der Zymogramme. Aus der Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Erhaltung forstlicher Genressourcen“. Bayerische Landesanstalt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht.
- KONNERT M. und FRANKE A. 1990: Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald: Genetische Differenzierung von Beständen. *Allg. Forst- u. J.- Ztg.* 162: 100-106.
- LEHMANN T., HAWLEY W. und COLLINS F. 1996: An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* 144: 1155-1163.
- LIEBOLD E. und DRECHSLER M. 1991: Schadenszustand und -entwicklung in den SO<sub>2</sub>-geschädigten Fichtengebieten Sachsens. *AFZ* 46: 492-494.
- LI W., LUO C. und WU C. 1985: Evolution of DNA sequences. In: MacIntyre R. (Hrsg.): *Molecular evolutionary genetics*. Plenum, New York, S. 1-92.
- LLAMAS L. 1998: Populationsgenetische Untersuchungen bei der Weißtanne (*Abies alba* Mill.) in Sachsen. Dissertation, Technische Universität Dresden.
- LÖCHELT 1994: Bestimmung genetischer Merkmale von Fichten (*Picea abies* [L.] Karst.) mit unterschiedlich ausgeprägten Schadsymptomen auf badenwürttembergischen Dauerbeobachtungsflächen. *AFZ* 165: 21-27.
- LONGAUER R., GÖMÖRY D., PAULE L., KARNOSKY D., MANKOVSKÁ B., MÜLLER-STARCK G., PERCY K. und SZARO R. 2001: Selection effects of air pollution to gene pools of Norway spruce, European silver fir and European beech. *Environmental Pollution*, in Druck.
- MANKOVSKÁ B. 2000: Chemical composition of forest tree species, mosses and humus as environmental indicator in Slovakia. In: Lomský B. und Šrámek V. (Hrsg.): *Ore Mountains 2000*, in Druck.
- MEJNARTOWICZ L. 1983: Changes in genetic structure of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) population affected by industrial emission of fluorid and sulphur dioxide. *Genetica Polonica* 24: 41-50.
- MITCHELL H., HALL J. und BARBER M. 1994: Elicitorinduced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology* 104: 551-556.
- MORGANTE M., FELICE N. und VENDRAMIN G. 1998: Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: Karp A., Isaac P. und Ingram D. (Hrsg.): *Molecular tools for screening biodiversity*. Plants and animals. Chapman and Hall, London, S. 407-412.
- MÜLLER-STARCK G. 1985: Genetic differences between "tolerant" and "sensitive" beches (*Fagus sylvatica* L.) in an environmentally stressed adult forest stand. *Silvae Genetica* 34: 241-247.
- MÜLLER-STARCK G. 1989: Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L. In: Scholz F., Gregorius H.-R. und Rudin D. (Hrsg.): *Genetic Aspects of Air Pollutants in Forest Tree Populations*. Springer-Verlag, Berlin, S. 127-142.
- MÜLLER-STARCK G. 1993: Auswirkungen von Umweltbelastungen auf genetische Strukturen von Waldbeständen am Beispiel der Buche (*Fagus sylvatica* L.). [Impacts of Environmental Stress on Genetic Structures of Forest Stands as Exemplified by European Beech (*Fagus sylvatica* L.)]. Sauerländer's Verlag, Frankfurt a. M.
- MÜLLER-STARCK G. 1994: Die Bedeutung der genetischen Variation für die Anpassung gegenüber Umweltstress. *Schweiz. Z. Forstwes.* 145: 977-997.

- MÜLLER-STARCK G. 1995a: Genetic variation in high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genetica* 44: 356-362.
- MÜLLER-STARCK G. 1995b: Genetic variation under extreme environmental conditions. Proceedings of the International Symposium on Population Genetics and Gene Conservation of Forest Trees. August 1992. Carcans, Frankreich.
- MÜLLER-STARCK G. 1998: Isozymes. In: Karp A., Isaac P. und Ingram D. (Hrsg.): Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals. Chapman and Hall, London, S. 75-81.
- MÜLLER-STARCK G., KONNERT M. und HUSSENDÖRFER E. 2000: Empfehlungen zur genetisch nachhaltigen Waldbewirtschaftung – Beispiele aus dem Gebirgswald. In: Finkeldey R., Bonfils P. und Landolt R. (Hrsg.): Forstliche Genreservate. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, S. 29-50.
- MÜLLER-STARCK G. und SCHUBERT R. 2000: Genetic markers as a tool for bioindication in forest ecosystems. In: Young A., Boshier D. und Boyle T. (Hrsg.): Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. CABI Publ., Oxford, S. 227-237.
- MÜLLER-STARCK G. und ZIEHE M. 1991: Genetic variation in populations of *Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. in Germany. In: Müller-Starck G. und Ziehe M. (Hrsg.): Genetic variation in european populations of forest trees. Sauerländer's Verlag, Frankfurt a. M., S. 125-140.
- MULLIS K. und FALOONA F. 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyze chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- NAGEISKY B. 1999: Identifizierung von Genen aus einer elicitor-induzierten cDNS Bibliothek der Gemeinen Fichte [*Picea Abies* (L.) Karst.]. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- OLEKSYN J., PRUS-GLOWACKI W., GIERTYCH M. und REICH P. 1994: Relation between genetic diversity and pollution impact in a 1912 experiment with east European *Pinus sylvestris* provenances. *Can. J. For. Res.* 24: 2390-2394.
- OTT J. 1992: Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 283-290.
- OXTOBY E. und HUGHES M. 1989: Breeding for herbicide resistance using molecular and cellular techniques. *Euphytica* 40: 173-180.
- PAFFRATH D. und PETERS W. 1988: Betrachtung der Ozonvertikalverteilung im Zusammenhang mit den neuartigen Waldschäden. *Forstw. Cbl.* 107: 152-159.
- PAGE R. 1996: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- PAGLIA G., OLIVIERI A. und MORGANTE M. 1998: Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Molecular and General Genetics* 258: 466-478.
- PAULE L. 1992: Bibliography: Isozymes and forest trees (Part 2). Techn. Univ. Zvolen.
- PAULE L., GÖMÖRY D., KARNOSKY D. und LONGAUER, R. 2001: Genetic effects of industrial pollution in Norway spruce. In: Lomský B. und Šrámek V. (Hrsg.): Ore Mountains 2000. In Druck.
- PERRY D. und BOUSQUET J. 1998: Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics* 149: 1089-1098.
- PERRY D. und FURNIER G. 1996: *Pinus banksiana* has at least seven expressed alcohol dehydrogenase genes in two linked groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the united States of America* 93: 13020-13023.
- PERRY D., ISABEL N. und BOUSQUET J. 1999: Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: the amount and nature of variation revealed in Norway spruce. *Heredity* 83 : 239-248.
- PETIT R., EL MOUSADIK A. und PONS O. 1998: Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.

- POWELL W., MACHRAY G. und PROVAN J. 1996: Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci* 1: 215-222.
- PRETZSCH-H., KAHN M. und GROTE R. 1998: The mixed spruce-beech forest stands of the forest research program "Growth or parasite defence?" in the Kranzberger forest district. *Forstw. Cbl.* 117: 241-257.
- PROVAN J., POWELL W. und HOLLINGSWORTH P. 2001: Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *TREE* 16: 142-146.
- PRUS-GLOWACKI W. und GODZIK S. 1991: Changes induced by zinc smelter pollution in the genetic structure of pine (*Pinus sylvestris* L.) seedling populations. *Silvae Genetic* 40: 184-188.
- PRUS-GLOWACKI W. und GODZIK S. 1995: Genetic structure of *Picea abies* trees tolerant and sensitive to industrial pollution. *Silvae Genetica* 44: 62-65.
- PRUS-GLOWACKI W. und NOWAK-BZOWY R. 1992: Genetic structure of a naturally regenerating Scots pine population tolerant for high pollution near a zinc smelter. *Water-, Air- and Soil-Pollution* 62: 249-259.
- PRUS-GLOWACKI W., OLEKSYN J. und REICH P. 1998: Relation between genetic structure and susceptibility to air pollution of European *Pinus sylvestris* populations from a IUFRO-1982 provenance experiment. *Chemosphere* 36: 813-818.
- RABEN G., ANDRAE H. und LEUBE F. 1996: Schadstoffbelastungen in sächsischen Waldökosystemen. *AFZ/Der Wald* 51: 1244-1248.
- RABEN G., ANDRAE H. und SYMOSSEK F. 1998: Consequences of reduced immissions on the ecochemical conditions of forest ecosystems in saxony (Germany). *Chemosphere* 36: 1007-1012.
- RADDI S., STEFANINI F., CAMUSSI A. und GIANNINI R. 1994: Forest decline index and genetic variability in *Picea abies* (L.) Karst. *Forest Genetics* 1: 33-40.
- RAJORA O., RAHMAN M., BUCHERT G. und DANCIK B. 2000: Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Mol. Ecol.* 9: 339-348.
- ROBERTSON L. und FREY K. 1984: Cytoplasmic effects on plant traits in interspecific matings of *Avena*. *Crop Science* 24: 199-204.
- RÖHLE H. 1995: Zum Wachstum der Fichte auf Hochleistungsstandorten in Südbayern. *Mitteilungen aus der Staatsforstverwaltung Bayerns* 48.
- RUETZ W. und BERGMANN F. 1989: Möglichkeiten zum Nachweis von autochthonen Hochlagenbeständen der Fichte (*Picea abies*) in den Berchtesgadener Alpen: *Forstw. Cbl.* 108: 164-174.
- SAEZ-VASQUEZ J., RAYNAL M., MEZA-BASSO L. und DELSENY M. 1993: Two related, low-temperature-induced genes from *Brassica napus* are homologous to the human tumour *bbc 1* (Breast basic conserved) gene. *Plant Mol. Biol.* 23: 1211-1221.
- SAVOLAINEN O. und HEDERICK P. 1995: Heterozygosity and fitness: no association in Scots pine. *Genetics*. 140: 755-766.
- SCHEEPERS D., ELOY M. und BRIQUET M. 1997: Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theor. Appl. Genet.* 94: 480-485.
- SCHMIDT-VOGT 1977: Die Fichte. Band I. Taxonomie-Verbreitung-Morphologie-Ökologie-Waldgesellschaften. Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- SCHMIDT-VOGT H. 1989: Die Fichte. Band II/2. Krankheiten-Schäden-Fichtensterben. Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- SCHÖMIG M. 1988: Das Wachstum von Fichten-Kiefern-Beständen unter dem Einfluss von im Grundwasser angereicherten Straßenaufsalzen im Forstamt Gunzenhausen. Diplomarbeit, Ludwig Maximilians Universität München.
- SCHOLZ F. 1983: Kann Züchtung auf Immissionsresistenz zur Lösung des Problems "Waldsterben" beitragen? *AFZ* 38: 281-283.

- SCHUBERT R., MÜLLER-STARCK G. und RIEGEL R. 2001: Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. Theor. Appl. Genet., in Druck.
- SCHUBERT R., SPERISEN C., MÜLLER-STARCK G., LA SCALA S., ERNST D. SANDERMANN H. und HÄGER K 1998: The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene structure in *Picea abies* (L.) Karst.: genomic sequences, Southern hybridization, genetic analysis and phylogenetic relationships. Trees 12: 453-463.
- SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G. und HEDLEY P. 2000: Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. Genome 43: 41-46.
- SCOTTI I., SORANZO N., FERRARIO S. und BINELLI G. 1998a: Genetic variation in Norway spruce as revealed by mapped PCR-based markers. Proc. Plant Biotechnology as a Tool for the Exploitation of Mountain lands. S. 363-369.
- SCOTTI I., TROGGIO M., SORANZ N, VENDRAMIN G. und BUCCI G. 1998b: A new set of PCR-based, locus-specific markers for *Picea abies* (L.) Karst. Mol. Ecol. 7: 783-792.
- SOKAL R. und ROHLF F. 1981: Biometry – The principles and practice of statistics in biological research. 2nd ed., Freeman & Co., New York.
- SORANZO N., PROVAN J. und POWELL W. 1998: Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. Mol. Ecol. 7: 1260-1261.
- SPERISEN C., BÜCHLER U., GUGERLI F., MATYAS G. und GEBUREK T. 2001: Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. Mol. Ecol. 10: 257-263.
- SPERISEN C., BÜCHLER U., MATYAS G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., SKROPPA T. und VENDRAMIN G. 1999: Polymorphic tandem repeats in the chloroplast and mitochondrial genomes of Norway spruce. In: Skroppa T., Paule L. und Gömöry D. (Hrsg.): Genetics and breeding of Norway spruce. Arbora Publishers, Zvolen, Slovakia.
- STARKE R., ZIEHE M. und MÜLLER-STARCK G. 1996: Viability selection in juvenile populations of european beech (*Fagus sylvatica* L.). Forest Genetics 3: 217-225.
- STINE M., SEARS B. und KEATHLEY D. 1989: Inheritance of plastids interspecific hybrids of blue spruce and white spruce. Theor. Appl. Genet. 78: 768-774.
- STREIFF R., LABBE T., BACILIERI R., STEINKELLNER H., GLÖSSL J. und KREMER A. 1998: Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. Mol. Ecol. 7: 317-328.
- STINE M. und KEATHLEY, D. 1990: Paternal inheritance of plastids in Engelmann spruce x Blue spruce hybrids. J. of Heredity 81: 443-446.
- SUNNUCKS P. 2000: Efficient genetic markers for population biology. TREE 15: 199-203.
- SUTTON B., FLANAGAN D., GAWLEY J., NEWTON C., LESTER D. und EL-KASABY Y. 1991: Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones. Theor. Appl. Genet. 82: 242-248.
- THOMAS B., MACDONALD S., HICKS M., ADAMS D. und HODGETTS R. 1999: Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 98: 793-801.
- TSUMURA Y., SUYAMA Y., YOSHIMURA K., SHIRATO N. und MUKAI Y. 1997: Sequence-aggged-sites (STS) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. Theor. Appl. Genet. 94: 764-772.
- TULSIERAM L., GLAUBITZ J., KISS G. und CARLSON J. 1992: Single-tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. BioTechniques 10: 686-690.
- TZSCHACKSCH O. 1987: Zur Labor- und Feldresistenz der Kiefer (*Pinus sylvestris* L.) gegenüber phytotoxischen Stoffen und Schlußfolgerungen für die Anbauwürdigkeit von Kiefernarten in den Immissionsschadgebieten des oberen Erzgebirges. Beitr. Forstwirtschaft 21: 97-102.
- URBAN D., MECKER-RICHTER M., BRUNS T., HERZOG R. und NEUHAUS H. 1992: Systematische Statistik für die computergestützte Datenanalyse. Gustav Fische Verlag, Stuttgart.

- VENDRAMIN G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., SPERISEN C. und BUCCI G. 2000: Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43: 68-78.
- VENDRAMIN G., DEGEN B., PETIT R., ANZIDEI M., MADAGHIELE A. und ZIEGENHAGEN B. 1999: High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Mol. Ecol.* 8: 1117-1126.
- VENDRAMIN G., LELLI L., ROSSI P. und MORGANTE M. 1996: A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol. Ecol.* 5: 595-598.
- VENDRAMIN G. und ZIEGENHAGEN B. 1997: Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome* 40: 857-864.
- VENNE H., SCHOLZ F. und VORNWEG A. 1989: Effects of air pollutants on reproductive processes of poplar (*Populus spp.*) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In: Scholz F., Gregorius H. und Rudin D. (Hrsg.): Genetic effects of air pollutants in forest tree populations. Springer-Verlag, Berlin, S. 89-103.
- WEBER E. 1978: Mathematische Grundlagen der Genetik. VEB Gustav Verlag, Jena.
- WOLF H. 1998: Erste Ergebnisse der Prüfung feldresistenter Klone der Fichte - *Picea abies* (L.) Karst. - im Erzgebirge und im Thüringer Wald. Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Forsten 13: 51-68.
- WRIGHT S. 1965: The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- ZIEGENHAGEN B., LLAMAS GOMEZ L., BERGMANN F., BARRAUN H. und SCHOLZ F. 1995: Protection of genetic variability in polluted stands. A case study with silver fir (*Abies alba* Mill.). *Forest Genetics* 2: 155-160.
- ZIEGENHAGEN B., SCHOLZ F., MADAGHIELE A. und VENDRAMIN G. 1998: Chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. *Can. J. For. Res.* 28: 317-321.
- ZIEHE M. und GREGORIUS H. 1996: Beurteilung der Gefährdung genetischer Ressourcen anhand von Stressmerkmalen. In: Müller-Starck (Hrsg.): Biodiversität und nachhaltige Forstwirtschaft. Ecomed, Landsberg, S. 300-317.



## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
Abb.	Abbildung
AFLP	„amplified fragment length polymorphism“
bp	Basenpaare
cDNA	„complementary-DNA“
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
cpDNA	„chloroplast-DNA“
cpSSR	„chloroplast simple sequence repeats“
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff
dATP ( A )	2'-Deoxyadenosin –5'-triphosphat
dCTP ( C )	2'-Deoxycytidin –5'-triphosphat
dGTP ( G )	2'-Deoxyguanosin –5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP ( T )	2'-Deoxythymidin –5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	„European Molecular Biology Laboratory“
EST	„expressed sequence tagged “
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
n.e.	nicht ermittelbar
NN	Normalnull
n.s.	nicht signifikant
ntDNA	„nuclear-DNA“
PCR	„polymerase chain reaction“
RAPD	„random amplified polymorphic DNA“
RNAse	Ribonuclease
SCAR	„sequence characterized amplified region“
SSR	„simple sequence repeats“
STS	„sequence tagged site“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
vgl.	vergleiche
vs.	versus

## 8.2 Gegenüber SO<sub>2</sub> sensitive und tolerante Fichtenklone im Erzgebirge

### Versuchsfläche Altenberg

sensitive Klone			tolerante Klone		
Klonnummer	Herkunftsort	Land	Klonnummer	Herkunftsort	Land
4297	Seiffen	D	4281	Seiffen	D
4303	Seiffen	D	4333	Oberlochrühle	D
4330	Oberlochrühle	D	4346	Oberlochrühle	D
4448	Deutscheinsiedel	D	4418	Deutscheinsiedel	D
4701	Oberlochrühle	D	4464	Deutscheinsiedel	D
4715	Oberlochrühle	D	4468	Deutscheinsiedel	D
4741	Seiffen	D	4698	Oberlochrühle	D
4776	Deutscheinsiedel	D	4704	Oberlochrühle	D
4787	Deutscheinsiedel	D	4737	Seiffen	D
4788	Deutscheinsiedel	D	4762	Seiffen	D
4815	Deutscheinsiedel	D	4770	Deutscheinsiedel	D
4819	Deutscheinsiedel	D	4774	Deutscheinsiedel	D
4826	Deutscheinsiedel	D	4854	Deutscheinsiedel	D
4834	Deutscheinsiedel	D	5667	Kovarska	CZ
4861	Deutscheinsiedel	D	5669	Kovarska	CZ
4864	Deutscheinsiedel	D	5680	Bolebor	CZ
5670	Kovarska	CZ	5685	Bolebor	CZ
5672	Kovarska	CZ	5687	Bolebor	CZ
5673	Kovarska	CZ	5702	Kliny	CZ
5686	Bolebor	CZ	5771	Kovarska	CZ
5760	Oberlochrühle	D	5778	Kovarska	CZ
5787	Nacetin	CZ	5794	Nacetin	CZ
5798	Kliny	CZ	5797	Kliny	CZ
5799	Kliny	CZ	5800	Kliny	CZ

### Versuchsfläche Bärenfels

sensitive Klone			tolerante Klone		
Klonnummer	Herkunftsort	Land	Klonnummer	Herkunftsort	Land
4302	Seiffen	D	4150	Deutscheinsiedel	D
4380	Oberlochrühle	D	4259	Seiffen	D
4384	Oberlochrühle	D	4266	Seiffen	D
4392	Oberlochrühle	D	4739	Seiffen	D
4405	Oberlochrühle	D	4748	Seiffen	D
4433	Deutscheinsiedel	D	4755	Seiffen	D
4443	Deutscheinsiedel	D	4772	Deutscheinsiedel	D
4459	Deutscheinsiedel	D	4779	Deutscheinsiedel	D
4721	Oberlochrühle	D	4793	Deutscheinsiedel	D
4759	Seiffen	D	4794	Deutscheinsiedel	D
4829	Deutscheinsiedel	D	4800	Deutscheinsiedel	D
4841	Deutscheinsiedel	D	5796	Bolebor	CZ
4850	Deutscheinsiedel	D	5831	Reitzenhain	D
4857	Deutscheinsiedel	D	5939	Georgenfeld	D
4860	Deutscheinsiedel	D	5954	Reitzenhain	D
5751	Georgenfeld	D	5957	Georgenfeld	D
5830	Reitzenhain	D	5980	Szklarska	PL
5838	Markersbach	D	5995	Szklarska	PL
5843	Ottomühle	D	6022	Szklarska	PL
5929	Markersbach	D	6028	Szklarska	PL
5930	Taubenbach	D	6031	Szklarska	PL
5989	Szklarska	PL	6116	Altenberg	D
6006	Szklarska	PL	6123	Reitzenhain	D
6106	Waltersdorf	D	6032	Szklarska	PL

### 8.3 Nomenklatur der Allele

<b>Kern-DNA-Marker</b>						
	<i>Allel</i>	Fragmentlänge	<i>Allel</i>	Fragmentlänge	<i>Allel</i>	Fragmentlänge
<b>PA0002</b>	<i>A</i>	480+300 bp	<i>B</i>	780 bp		
<b>PA0005</b>	<i>A</i>	503+.. bp	<i>C</i>	544+.. bp	<i>E</i>	475+.. bp
	<i>B</i>	524+.. bp	<i>D</i>	462+.. bp		
<b>PA0034</b>	<i>A</i>	212 bp	<i>C</i>	226 bp	<i>E</i>	230 bp
	<i>B</i>	214 bp	<i>D</i>	228 bp		
<b>PA0038</b>	<i>A</i>	186+.. bp	<i>B</i>	192+.. bp	<i>C</i>	228+.. bp
<b>PA0043</b>	<i>A</i>	368 bp	<i>C</i>	389 bp	<i>E</i>	360 bp
	<i>B</i>	372 bp	<i>D</i>	420 bp		
<b>PA0055</b>	<i>A</i>	267+39 bp	<i>B</i>	306 bp		
<b>PA0066</b>	<i>A</i>	154 bp	<i>C</i>	171 bp		
	<i>B</i>	161 bp	<i>D</i>	178 bp		
<b>Cad7</b>	<i>A</i>	382 bp	<i>I</i>	428 bp	<i>Q</i>	532 bp
	<i>B</i>	387 bp	<i>J</i>	434 bp	<i>R</i>	517 bp
	<i>C</i>	392 bp	<i>K</i>	444 bp	<i>S</i>	373 bp
	<i>D</i>	396 bp	<i>L</i>	483 bp	<i>T</i>	471 bp
	<i>E</i>	405 bp	<i>M</i>	505 bp	<i>U</i>	496 bp
	<i>F</i>	412 bp	<i>N</i>	513 bp	<i>V</i>	460 bp
	<i>G</i>	417 bp	<i>O</i>	549 bp	<i>W</i>	439 bp
	<i>H</i>	420 bp	<i>P</i>	558 bp		

<b>Chloroplasten-Mikrosatelliten</b>						
	<i>Variante</i>	Fragmentlänge	<i>Variante</i>	Fragmentlänge	<i>Variante</i>	Fragmentlänge
<b>Pt63718</b>	<i>1</i>	= 94 bp	<i>4</i>	= 97 bp	<i>6</i>	= 99 bp
	<i>2</i>	= 95 bp	<i>5</i>	= 98 bp	<i>7</i>	= 100 bp
	<i>3</i>	= 96 bp				
<b>Pt26081</b>	<i>1</i>	= 114 bp	<i>2</i>	= 115 bp	<i>3</i>	= 116 bp
<b>Pt71936</b>	<i>1</i>	= 142 bp	<i>3</i>	= 144 bp	<i>5</i>	= 146 bp
	<i>2</i>	= 143 bp	<i>4</i>	= 145 bp		

## 8.4 Genetische Diversität

### Sensitive und tolerante Fichtenkollektive in drei verschiedenen Stressszenarien

( $\infty$  = Irrtumswahrscheinlichkeit; S bzw. T = Kollektiv sensibler bzw. toleranter Fichten)

#### Isoenzym-Genloci

	Schwermetall-/SO <sub>2</sub> -Belastung slowakische Spis Region			
	S	T	S-T	I- $\mu$
<i>FEST-A</i>	1,08	1,13	-0,05	0,74 n.s.
<i>LAP-A</i>	1,10	1,06	0,04	0,72 n.s.
<i>LAP-B</i>	1,59	1,51	0,08	0,63 n.s.
<i>PX-A</i>	1,22	1,10	0,11	0,87 n.s.
<i>GDH-A</i>	1,06	1,00	0,06	0,89 n.s.
<i>AAT-A</i>	1,04	1,00	0,04	0,81 n.s.
<i>AAT-B</i>	1,02	1,04	-0,02	0,77 n.s.
<i>AAT-C</i>	2,05	2,05	0,00	-
<i>PGI-A</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>PGI-B</i>	1,56	1,64	-0,08	0,69 n.s.
<i>MDH-A</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>MDH-B</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>MDH-C</i>	1,13	1,04	0,09	0,90 n.s.
<i>IDH-A</i>	1,10	1,09	0,01	-
<i>IDH-B</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>PGM-A</i>	1,04	1,00	0,04	0,83 n.s.
<i>G6PD-A</i>	1,26	1,17	0,09	0,76 n.s.
<i>SKD-A</i>	1,08	1,04	0,04	0,72 n.s.
<i>SKD-B</i>	1,06	1,00	0,06	0,91 n.s.
<i>Mittelwert</i>	1,14	1,11	0,03	0,99 **

	Streusalz-Belastung Mönichswald bei Gunzenhausen			
	S	T	S-T	I- $\mu$
<i>AAT-A</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>AAT-B</i>	1,00	1,01	-0,01	-
<i>AAT-C</i>	2,02	2,04	-0,03	0,63 n.s.
<i>AAP-B</i>	1,31	1,27	0,05	0,62 n.s.
<i>ACO-A</i>	1,51	1,63	-0,12	0,79 n.s.
<i>GDH-A</i>	1,00	1,01	-0,01	-
<i>IDH-A</i>	1,03	1,03	0,00	-
<i>LAP-A</i>	1,30	1,39	-0,09	0,77 n.s.
<i>LAP-B</i>	1,87	1,65	0,22	0,80 n.s.
<i>MDH-B</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>MDH-C</i>	1,17	1,14	0,04	0,67 n.s.
<i>MNR-B</i>	1,11	1,04	0,06	0,91 n.s.
<i>MNR-C</i>	1,14	1,09	0,05	0,76 n.s.
<i>NDH-B</i>	2,00	2,02	-0,02	0,74 n.s.
<i>6PGDH-B</i>	2,06	1,96	0,09	0,76 n.s.
<i>6PGDH-C</i>	3,07	3,04	0,02	0,52 n.s.
<i>PGI-B</i>	1,75	1,73	0,02	0,56 n.s.
<i>PGM-A</i>	1,11	1,03	0,08	0,94 n.s.
<i>SKDH-A</i>	1,21	1,34	-0,13	0,87 n.s.
<i>Mittelwert</i>	1,32	1,31	0,01	0,71 n.s.

#### Kern-DNA-Loci

	Schwermetall-/SO <sub>2</sub> -Belastung slowakische Spis Region				SO <sub>2</sub> -Belastung sächsisches Erzgebirge				Streusalz-Belastung Mönichswald bei Gunzenhausen			
	S	T	S-T	I- $\mu$	S	T	S-T	I- $\mu$	S	T	S-T	I- $\mu$
<i>Cad7</i>	7,69	7,02	0,67	0,65 n.s.	8,53	8,65	-0,11	0,64 n.s.	7,60	7,79	-0,19	0,62 n.s.
<i>PA0002</i>	1,98	1,96	0,02	0,60 n.s.	1,86	2,00	-0,14	0,98 *	1,92	1,97	-0,05	0,76 n.s.
<i>PA0005</i>	1,46	1,29	0,17	0,85 n.s.	1,34	1,28	0,06	0,65 n.s.	1,36	1,17	0,19	0,97 *
<i>PA0034</i>	1,50	1,27	0,23	0,90 n.s.	1,77	1,73	0,05	0,53 n.s.	2,01	1,95	0,06	0,57 n.s.
<i>PA0038</i>	1,93	1,96	-0,02	0,56 n.s.	1,86	1,78	0,09	0,65 n.s.	1,97	1,98	-0,02	0,56 n.s.
<i>PA0043</i>	3,39	3,04	0,35	0,90 n.s.	2,71	2,48	0,23	0,78 n.s.	2,95	2,52	0,44	0,93 n.s.
<i>PA0055</i>	1,17	1,23	-0,07	0,79 n.s.	1,39	1,49	-0,11	0,76 n.s.	1,50	1,68	-0,18	0,90 n.s.
<i>PA0066</i>	1,62	1,67	-0,05	0,61 n.s.	1,75	1,61	0,15	0,72 n.s.	1,86	1,43	0,43	0,99 **
<i>Mittelwert</i>	1,87	1,79	0,08	0,83 n.s.	1,92	1,89	0,03	0,56 n.s.	2,03	1,90	0,13	0,96 *

#### Chloroplasten-Mikrosatelliten

	Schwermetall-/SO <sub>2</sub> -Belastung slowakische Spis Region				SO <sub>2</sub> -Belastung sächsisches Erzgebirge				Streusalz-Belastung Mönichswald bei Gunzenhausen			
	S	T	S-T	I- $\mu$	S	T	S-T	I- $\mu$	S	T	S-T	I- $\mu$
<b>Einzellocus</b>												
<i>Pt63718</i>	1,94	1,57	0,37	0,83 n.s.	1,35	1,57	-0,22	0,84 n.s.	1,27	1,47	-0,20	0,83 n.s.
<i>Pt26081</i>	1,95	2,29	-0,34	0,90 n.s.	1,19	1,62	-0,44	0,98 *	1,19	1,33	-0,14	0,79 n.s.
<i>Pt171936</i>	2,45	1,98	0,47	0,92 n.s.	1,75	2,22	-0,46	0,92 n.s.	1,51	1,75	-0,23	0,88 n.s.
<b>Haplotypen (2- bzw. 3-Loci)</b>												
<i>Pt63718+Pt26081</i>	3,71	3,27	0,44	0,72 n.s.	1,57	1,96	-0,39	0,85 n.s.	1,45	1,82	-0,38	0,90 n.s.
<i>Pt63718+Pt171936</i>	4,92	3,23	1,68	0,96 *	2,12	3,84	-1,72	0,99 **	1,77	2,60	-0,83	0,97 *
<i>Pt26081+Pt171936</i>	3,14	3,97	-0,82	0,84 n.s.	2,09	3,90	-1,81	0,99 **	1,81	2,30	-0,49	0,89 n.s.
<i>Pt63718+Pt26081 +Pt171936</i>	5,96	6,06	-0,11	0,52 n.s.	2,41	4,90	-2,49	0,99 **	1,94	3,06	-1,12	0,98 *

## Fichtenpopulationen der Tief- und Hochlagen

### Isoenzym-Genloci

	<i>Berchtesgaden</i>			
	Tief	Hoch	T-H	<i>I-μ</i>
<i>AAT-A</i>	1,00	1,00	0,00	-
<i>AAT-B</i>	1,00	1,04	-0,04	0,91 n.s.
<i>AAT-C</i>	1,98	1,91	0,06	0,65 n.s.
<i>ACO-A</i>	1,60	2,00	-0,40	1,00 ***
<i>GDH-A</i>	1,00	1,00	0,00	-
<i>IDH-A</i>	1,00	1,01	-0,01	-
<i>MDH-C</i>	1,04	1,11	-0,07	0,86 n.s.
<i>MNR-B</i>	1,01	1,00	0,01	-
<i>MNR-C</i>	1,11	1,26	-0,14	0,91 n.s.
<i>NDH-B</i>	2,04	1,99	0,05	0,90 n.s.
<i>6PGDH-B</i>	1,79	1,73	0,06	0,64 n.s.
<i>PGL-B</i>	1,86	1,80	0,06	0,67 n.s.
<i>PGM-A</i>	1,33	1,33	0,00	-
<i>Mittelwert</i>	1,31	1,32	-0,01	0,72 n.s.

### Kern-DNA-Loci

	<i>Berchtesgaden</i>			
	Tief	Hoch	T-H	<i>I-μ</i>
<i>Cad7</i>	7,09	8,60	-1,51	0,86 n.s.
<i>PA0002</i>	1,80	1,86	-0,06	0,66 n.s.
<i>PA0005</i>	1,28	1,28	0,00	-
<i>PA0034</i>	1,54	1,80	-0,25	0,84 n.s.
<i>PA0038</i>	2,03	2,12	-0,10	0,79 n.s.
<i>PA0043</i>	1,99	1,95	0,04	0,54 n.s.
<i>PA0055</i>	1,60	1,52	0,08	0,66 n.s.
<i>PA0066</i>	1,64	1,80	-0,16	0,80 n.s.
<i>Mittelwert</i>	1,84	1,91	-0,07	0,85 n.s.

### Chloroplasten-Mikrosatelliten

	<i>Berchtesgaden</i>			
	Tief	Hoch	T-H	<i>I-μ</i>
<i>Einzellocus</i>				
<i>Pt63718</i>	1.36	1.35	0.01	0.58 n.s.
<i>Pt26081</i>	1.18	1.13	0.05	0.77 n.s.
<i>Pt71936</i>	1.54	1.69	-0.15	0.69 n.s.
<b>Haplotypen (2- bzw. 3-Loci)</b>				
<i>Pt63718+Pt26081</i>	1.36	1.49	-0.13	0.66 n.s.
<i>Pt63718+Pt71936</i>	1.84	2.15	-0.31	0.71 n.s.
<i>Pt26081+Pt71936</i>	1.65	1.89	-0.24	0.70 n.s.
<i>Pt63718+Pt26081+ Pt71936</i>	1.84	2.42	-0.58	0.84 n.s.

## Lebenslauf

<b>Name:</b>		Ricardo Riegel
<b>Geburtsdatum/-ort:</b>		23. 4.1972 in Osorno, Chile
<b>Nationalität:</b>		deutsch/chilenisch
<b>Schulbildung:</b>	1978 - 1989	Deutsche Schule in Osorno
<b>Studien:</b>	März 1990 - Juli 1993	Grundstudium der Agrarwissenschaften an der „Universidad Austral de Chile“, Valdivia
	Aug. 1993 - Juli 1994	Praktika an der „University of Prince Edward Island“, Kanada; landwirtschaftliche Betriebsarbeiten, Deutschland
	Aug. 1994 - Sept. 1996	Weiterführung der Studien der Agrarwissenschaften mit Schwerpunkt Pflanzenproduktion, an der „Universidad Austral de Chile“, Valdivia: Abschluss als „Ingeniero Agrónomo“
	Okt. 1996 - Mai 1998	Aufbaustudiengang „Agrarwissenschaften und Ressourcen-Management in den Tropen und Subtropen“ mit Schwerpunkt in genetischen Ressourcen und Biodiversität an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: Abschluss mit Magister der Agrarwissenschaften
<b>Berufstätigkeiten:</b>	ab Juli 1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachgebiet Fortstgenetik, Technische Universität München-Weihenstephan

## Veröffentlichungen:

- BERENYI M., FLUCH S., HÖHL K., BURG K., SCHUBERT R., RIEGEL R. und MÜLLER-STARCK G. 1999: Isolation and sequence analysis of oak and spruce cDNA clones. In: Gillet E.M. (Hrsg.) Which DNA marker for which purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union. Chapter 13. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm> oder in Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Nr. 198.
- RIEGEL R., SCHUBERT R. und MÜLLER-STARCK G. 2000: Validation of newly-developed codominant DNA-markers for studying intrapopulational genetic variation in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. In: S. Espinel E. Ritter (Hrsg.) Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics, Biofor 99, 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain, 1999, S. 151-154.
- RIEGEL R., SCHUBERT R., MÜLLER-STARCK G., KARNOSKY D.F. und PAULE L. 2001: Genetic variation in two heavily polluted stands of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) as indicated by nuclear and organelle DNA markers. In: Müller-Starck G., Schubert R. (Hrsg.) Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions. Forestry Sciences, Volume 70, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. S. 21-34.
- SCHUBERT R., MÜLLER-STARCK G. und RIEGEL R. 2001: Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. Theoretical and Applied Genetics 103, 1223-1231.

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, diese Arbeit eigenständig und mit keinen anderen als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ricardo Riegel

Freising, April 2001