

Natalia Andrea Decarli Muñoz

**Räumliche Verteilungen der genetischen
Ausstattung von Eckern und Jungwuchs
der Buche (*Fagus sylvatica* L.) in Abhängigkeit
von Bestandesstrukturen**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Räumliche Verteilungen der genetischen Ausstattung von
Eckern und Jungwuchs der Buche (*Fagus sylvatica* L.) in
Abhängigkeit von Bestandesstrukturen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Forstwissenschaftlichen Fachbereichs
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Natalia Andrea Decarli Muñoz
geboren in Concepción, Chile

Göttingen 2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Georg-August-Universität in Göttingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Martin Ziehe angefertigt. Ich möchte mich bei ihm für seine kontinuierliche Leitung und fachliche Betreuung ganz herzlich bedanken. Mein Dank gilt auch zahlreichen weiteren Mitgliedern des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung wie auch Mitarbeitern anderer Institute der Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie:

Herrn Prof. Dr. Reiner Finkeldey für die Einführung in die Nutzung molekularer Marker und seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Hans H. Hattemer für die hilfreichen fachlichen Gespräche,

Frau Dr. Barbara Vornam und Herrn Dr. Oliver Gailing für ihre Unterstützung bei der Anwendung molekularer Techniken und ihre Geduld in vielen fachlichen Gesprächen,

Herrn Prof. Dr. Hans-Rolf Gregorius, Frau Dr. Elizabeth M. Gillet und Jörg R. G. Kleinschmit, deren nützliche Hinweise zur Erstellung des Programm „ABSTAMMUNG“ beitrugen,

Frau Oleksandra Dolynska, Frau Christine Radler, Herrn Karsten Hennecke, Herrn Gerold Dinkel, Herrn August Capelle, Frau Olga Artes, Herrn Thomas Seliger und Herrn Siegfried Krakuhn, die bei der Bewältigung der Laboruntersuchungen und der Durchführung der Feldarbeiten sehr hilfreich waren,

Frau Dr. Heide Glock, Frau Sabine Fehrmann und Frau Sigrid Schmaltz für ihre wertvollen Kommentare bei der Herstellung der Dissertationsschrift,

Herrn Sapto Indrioko, Herrn Madhav Panday und Frau Sylvia Nascimento de Sousa, die bei Bedarf jederzeit unterstützend zur Stelle waren,

Frau Marita Schwahn für ihre Hilfsbereitschaft,

Herrn Dr. Martin Jansen, Herrn Dr. Swen Hentschel, Herrn Dr. Jens Nieschulze und Herrn Dr. Rainer Schulz für ihre Hilfe bei der Beschreibung der Versuchsflächen und

meinem Mann Dr. Jorge Cancino für seine geduldige Unterstützung.

Der KAAD (Katholischer Akademischer Ausländer-Dienst) hat die Promotion finanziell gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Allgemeines zur Rotbuche zur Erhaltung von deren genetischen Ressourcen.....	1
1.2 Zielsetzungen der Arbeit.....	2
1.3 Genetische Marker.....	3
1.3.1. Allgemeine Bemerkungen.....	3
1.3.2. Isoenzyme.....	3
1.3.2.1. Besondere Bedeutung bestimmter Allelvarianten.....	4
1.3.3. DNA Marker.....	6
1.3.3.1. Auf PCR (polymerase chain reaction) basierende Marker.....	6
1.3.3.2.1. SSRs; Mikrosatelliten-DNA: simple sequence repeats.....	6
1.3.3.2.2.1. Evolution der Mikrosatelliten-Marker.....	7
1.3.3.2.2.2. Theoretische Modelle der Mikrosatelliten-Mutationen.....	9
1.3.3.2.2.3. Anwendung der Mikrosatelliten-Marker.....	10
1.3.3.2.2.4. DNA-Sequenzierung.....	11
1.3.3.2.2.4.1. Sanger-Coulson-Sequenzierung (Dideoxy-Sequenzierung).....	11
1.3.3.2.2.4.2. Taq-cycle-Sequenzierung.....	12
1.3.3.3. Bisheriger Einsatz bei Fagaceen.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1. Pflanzenmaterial.....	13
2.1.1. Buchenbestand Abt 3100c (FoA Dassel, ehemals FoA Knobben).....	13
2.1.2. Buchenbestand Abt. 1083 (FoA Eschershausen).....	16
2.1.3. Eckern der ausgewählten Bäume Nr. 9 und 95 der Abt. 3100c des FoA Dassel.....	20
2.1.4. Eckern des isolierten Baumes in der Abt. 62 des FoA Seesen.....	20
2.2. Methoden.....	22
2.2.1. Isoenzymanalysen.....	22
2.2.2. DNA-Analysen.....	23
2.2.2.1. Isolierung der DNA aus Samen und Knospen.....	23
2.2.2.2. Agarose- und Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese.....	23
2.2.2.3. DNA-Amplifizierung von Mikrosatelliten-Markern.....	23
2.2.3. Auftrennung und Sequenzierung von Amplifizierungsfragmenten mittels Kapillarelektrophorese.....	25
2.2.3.1. Probenvorbereitung der Amplifizierungsprodukte für die Kapillar-elektrophorese.....	25
2.2.3.2. Extraktion der DNA aus Agarosegelen.....	25
2.2.3.3. Sequenzierung.....	26
2.2.3.4. Sequenzvergleich.....	27
2.2.3.5. Optimierung eines neuen Mikrosatelliten-Markers.....	27
2.3. Analyse der erhobenen Daten.....	27
2.3.1. Populationsgenetische Parameter.....	27
2.3.2. Elternschaftsanalysen.....	28
2.3.3. Berechnung zusätzlicher Parameter.....	28
2.3.3.1. In der Abteilung 3100c.....	28
2.3.4. Computergestützte Analyse der erhobenen Daten.....	29
3 ERGEBNISSE.....	31
3.1. Entwicklung und Anwendung von Mikrosatelliten-Markern.....	31
3.1.1. Mikrosatelliten für <i>Fagus crenata</i> und <i>F. japonica</i>	31
3.1.1.1. Sequenzierung der Amplifizierungsprodukte.....	31
3.1.2. Mikrosatelliten-Marker für <i>Fagus sylvatica</i> L. und <i>F. orientalis</i>	34
3.1.3. Allgemeine Betrachtung zur untersuchten Versuchsfläche.....	36
3.2. Ergebnisse der Abteilung 3100c.....	37
3.2.1. Räumliche Verteilung der genetischen Strukturen in der Abt. 3100c.....	39
3.2.2. Fremdpollenflug (bei Windeinfluss).....	40
3.2.3. Räumliche Verteilungen der Häufigkeiten von verschiedenen Allelvarianten.....	42
3.2.4. Räumliche Verteilung der Allelvariante LAP-A ₄	45
3.3. Parameter der Mikrosatelliten-Marker in den Abteilungen 3100c und 1083.....	51
3.3.1. Genetische Parameter der Mikrosatelliten-Marker in den Abteilungen 3100c (FoA Dassel) und 1083 (FoA Eschershausen).....	51
3.3.2. Indices von Moran (Moran's I) und genetische Abstände an den Mikrosatelliten-Loci.....	52
3.4. Elternschaftsverhältnisse für Eckern und Jungwuchs der Abt. 3100c.....	53

3.4.1 Abstammungsrekonstruktion für die Eckern des Jahrgangs 1998/99 aus dem nördlichen Bereich der Abt. 3100c.....	53
3.4.2 Genetische Parameter und Vaterschaftsanalyse für Baum 9	54
3.4.2.1 Genetische Parameter und Häufigkeiten von bestimmten Allelvarianten	54
3.4.2.2 Vaterschaftsanalyse.....	55
3.4.3 Genetische Parameter und Vaterschaftsanalyse für den Baum 95	55
3.4.3.1 Genetische Parameter und Häufigkeiten von bestimmten Allelvarianten	55
3.4.3.2 Elternschaftsanalyse	56
3.4.4 Genetische Parameter und Elternschaftsanalyse für den Jungwuchs der Abteilung 3100c.....	62
3.4.4.1 Analyse auf der Basis von Enzymgenloci	62
3.4.4.2 Elternschaftsanalyse auf der Basis von Mikrosatelliten-Markern	62
3.4.1 Analyse auf der Basis von Isoenzymgenloci.....	64
3.4.2 Analyse auf der Basis von Mikrosatelliten-Markern.....	65
3.5 Ergebnisse der Abteilung 62	69
3.5.1 Analyse auf der Basis von Enzymgenloci	69
3.5.2 Analyse auf der Basis von Mikrosatelliten-Markern.....	70
4 DISKUSSION	72
4.1. Entwicklung und Einsatz von Mikrosatelliten-Markern	72
4.1.1. Potenzielle Probleme bei der Entwicklung und dem Einsatz der Mikrosatelliten-Marker	72
4.1.1.1. Besonderheiten für die Primer von Tanaka et al. (1999).....	73
4.1.1.2. Besonderheiten bei den Primern von Pastorelli (et al. (2003)).....	73
4.1.1.3. Besonderheiten bei den Primerpaaren <i>mfc 5</i> , <i>mfs 11</i> und FS 3_04.....	74
4.2 Abteilung 3100c.....	74
4.2.1. Ergebnisse der genetischen Parameterauf der Basis von Isoenzymuntersuchungen	74
4.2.1.1 Räumliche genetische Variation.....	74
4.2.1.3. Räumliche Verteilung von Trägern der Allelvariante LAP-A ₄	76
4.2.2. Bestätigung von Korrelationen bei Mikrosatelliten-Markern (Moran's Index und genetischer Abstand).....	76
4.2.3. Vergleich zwischen Isoenzymen und Mikrosatelliten-Markern	77
4.2.4. Abstammungsrekonstruktion bei Eckern und Naturverjüngung	78
4.2.5. Analyse der Einzelbaumnachkommenschaften	78
4.2.5.1. Analyse mit Mikrosatelliten	78
4.2.5.2. Einfluss der Bestandesstruktur auf den Pollenflug.....	79
4.2.6. Analyse des Jungwuchses	79
4.2.6.1. Isoenzyme	79
4.2.6.2. Vaterschaftsanalyse mit Mikrosatelliten-Markern	80
4.3. Abt. 1083.....	80
4.3.1. Isoenzymmarker	80
4.3.2. Vaterschaftsanalyse mit Mikrosatelliten-Markern	81
4.4. Isolierter Baum im Bestand 62.....	81
4.4.1. Analyse mit Isoenzymmarkern.....	81
4.4.2. Vaterschaftsanalyse durch Mikrosatelliten-Marker.....	81
4.5. Praxisrelevanz der Ergebnisse.....	82
ZUSAMMENFASSUNG.....	84
LITERATURVERZEICHNIS	90
ANHANG II. Räumliche Verteilung von Allelvarianten an Enzymgenloci in der Abt. 3100c	105
ANHANG III. Ergänzungen zur Elternschaftsanalyse für die Verjüngung der Abt. 3100c.....	107
ANHANG IV. Ergänzungen zur Elternschaftsanalyse für die Verjüngung der Abt. 1083	108

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeines zur Rotbuche zur Erhaltung von deren genetischen Ressourcen

Mit der Zunahme der stark bzw. sehr stark geschädigten Buchenwälder in Deutschland wächst die Notwendigkeit, effektivere Konzepte zur Erhaltung von deren genetischen Ressourcen zu entwickeln. Die am meisten bedrohten oder bereits absterbenden Populationen sind nach wirtschaftlichen, ökologischen, waldbaulichen und genetischen Gesichtspunkten zwar häufig erhaltungsbedürftig; das systematische Vorgehen muss sich aber dennoch an solchen Konzepten orientieren, die möglichst langfristige Ziele zu erreichen versprechen (Turok 1995). Angesichts der unvorhersehbaren und raschen, anthropogenen Umweltveränderungen ist eine besondere Vorgehensweise geboten (Hattemer 1988, Ziehe et al. 1989, Hattemer 1990, Gregorius 1991). Der langfristige Schutz einer Genressource in ihrem Habitat lässt eine ununterbrochene Entwicklung adaptiver Prozesse zu. Für lange dynamische Erhaltungsstrategien werden deshalb allgemein in situ Verfahren bevorzugt (Gregorius et al. 1979, Ziehe et al. 1989). Die kontinuierliche natürliche Verjüngung in situ dürfte dabei die Erhaltung adaptiver Potenziale über längere Zeiträume hinweg besonders effektiv gewährleisten (Gregorius 1994).

Die sogenannte natürliche Verjüngung im Waldökosystem ist heute eine nachhaltige Alternative für den Weiterbestand der Wälder. Um dieses Ziel zu erreichen, ist nicht nur das Ausmaß der Verjüngung relevant, sondern auch ihre genetische Ausstattung. Fehlende genetische Variation (durch genetische Erosion oder Inzucht) kann die Verjüngungserfolge erheblich einschränken.

Während der Reproduktion liegt eine Phase vor, in der die genetische Struktur und das Ausmaß der Verjüngung festgelegt werden. Diese Phase und damit das Reproduktionssystem der Waldbäume umfasst drei Bereiche: Die Fertilität der Eltern, das Paarungssystem und die Viabilität der Nachkommen (Ziehe 1982). Die genetische Struktur der Samen kann sich im Vergleich zu den Altbäumen durch die Reproduktion und während der Jungwuchsentwicklung besonders drastisch ändern. Während der eigentlichen Reproduktionsphase ist ein wichtiger Faktor die Verteilung der potenziell reproduzierenden Altbäume; sie könnte durch waldbauliche Maßnahmen modifiziert werden oder verändert worden sein. Diese Verteilung hat ebenfalls Einfluss auf die Art und Weise der Kombination von Gameten zu Zygoten. Im Vergleich zum Altbestand führen zudem Fertilitätsselektion,

Inkompatibilitäten, Drift- oder Inzuchteffekte in der Regel zu anderen genetischen Strukturen unter den Samen. Negative Auswirkungen etwa in Form von Inzuchtdepression oder genetischer Erosion können die Folge sein. Das Material hat in der Phase zwischen Samenstadium und Jungwuchs wiederum die Möglichkeit zur Veränderung in den Häufigkeiten der genetischen Ausstattung. Diese Änderung ist insbesondere von standörtlichen Bedingungen, aber auch anthropogenen Effekten abhängig.

Die europäische Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) ist eine anemophile, allogame Baumart mit einem relativ geringen Anteil an Selbstbefruchtung (Krabel und Ziehe unveröffentlicht), der in genetischer Sicht ein leichtes Defizit an Heterozygoten im Vergleich zu Hardy-Weinberg-Strukturen (wie sie bei Zufallskombination von Gameten und gleichen Allelstrukturen unter weiblichen und männlichen Gameten entstünden) erwarten läßt.

Die Rotbuche gehört zu den ökologisch und ökonomisch relevanten Baumarten. Die genetische Variation wurde bereits sehr intensiv untersucht (z. B. Thiébaud et al. 1982, Müller-Starck und Starke 1993, Leonardi und Menozzi 1995, Paule et al. 1995, Hattemer und Ziehe 1996, Konnert et al. 2000). Mit Hilfe von Isoenzymen wurde bei der Buche ein ähnliches Niveau der genetischen Variation wie bei vielen anderen Baumarten gefunden (Hamrick et al. 1992); unter den Fagaceen scheint die Eiche aber mehr Varianten und Variation (Müller-Starck und Ziehe 1991) zu besitzen. Normalerweise beobachtet man innerhalb von Populationen beachtliche, zwischen Populationen aber vergleichsweise kleine genetische Variation (z. B. Müller-Starck und Ziehe 1991, Larsen 1995, Turok 1995, Leonardi und Menozzi 1995, Paule et al. 1995, Starke et al. 1995, Hattemer und Ziehe 1996, Ziehe et al. 1998, Konnert et al. 2000).

Das Ausmaß beobachteter signifikanter Autokorrelationen in den räumlichen Strukturen von Altbuchen ist an Enzymgenloci bisher eher klein (Merzeau et al. 1994, Leonardi und Menozzi 1996, Doúnavi 2000) eingeschätzt worden. Im Vergleich der genetischen Strukturen zweier aufeinander folgender Generationen, d. h. unter Altbäumen und ihren Eckern, wurden zum Teil aber erhebliche Änderungen festgestellt (Müller-Starck und Ziehe 1991, Fromm 1992, Starke und Müller-Starck 1992, Hattemer et al. 1993, Müller-Starck 1996, Ziehe et al. 1998).

1.2. Zielsetzungen der Arbeit

Zielsetzungen der vorliegenden Untersuchung sind Beschreibung und Analyse von Parametern und Strukturen, die eine Rolle für den Verjüngungserfolg spielen. Hierzu wurde u. a. eine Vaterschaftsanalyse bei Eckern und Jungwuchs durchgeführt. Das einbezogene

Material stammt sowohl aus einem kleinen isolierten Reinbestand (Abt.3100c, FoA Dassel im Solling) mit variabler Bestandesdichte, als auch von einer Versuchsfläche in einem Mischbestand (Abt. 1083, FoA Eschershausen im Solling), in der die Versuchspartzen (Verjüngungsinselfn) unterschiedliche Grade der Isolation bzw. Abschirmung durch Fichten aufweisen. Zum Vergleich wurde für eine isolierte Buche (Abt. 62, FoA Seesen im Westharz) deren Nachkommenschaft und das Ausmaß an Genfluss charakterisiert.

1.3. Genetische Marker

1.3.1. Allgemeine Bemerkungen

In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die genetische Variation verschiedener biologischer Kollektive, wie z. B. die von natürlichen Populationen, zu bestimmen. Mit der Veröffentlichung von Mendel (1866) wurden die ersten genetischen Marker für die moderne Genetik festgelegt und später deren Vererbungsanalyse etabliert.

So können für die Identifizierung von Polymorphismen, d.h. von genetischer Variation, morphologische Merkmale oder auch die Analyse sekundärer Inhaltsstoffe eingesetzt werden. Bei beiden Methoden kann jedoch der betrachtete Genomabschnitt nicht klar eingegrenzt werden, da es sich hierbei um komplexe Merkmale handelt, die das Zusammenspiel vieler Gene voraussetzen.

Im Folgenden werden biochemische und molekulargenetische Methoden zur Identifizierung genetischer Variation vorgestellt, die sich im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden auf einzelne Genomabschnitten beziehen.

1.3.2. Isoenzyme

Isoenzyme sind die wichtigsten biochemischen Genmarker zur Untersuchung des genetischen Systems von Pflanzen (Finkeldey 1999). Die verschiedenen Molekülformen eines Enzyms mit gleicher oder sehr ähnlicher katalytischer Funktion nennt man Isoenzyme. Bei der Isoenzymanalyse wird die katalytische Funktion von Proteinen und deren unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ausgenutzt. Werden Isoenzyme durch verschiedene Allele eines bestimmten Genlocus kodiert, spricht man von Alloenzymen.

Nach Bergmann und Hattemer (1998) zeichnen sich Isoenzyme durch folgende Eigenschaften aus:

1. Umweltunabhängigkeit, d.h. das Verhalten der Isoenzyme ist unabhängig von der das Individuum umgebenden Umwelt. Aufgrund dieser Eigenschaft können Isoenzyme als genetische Marker betrachtet werden.
2. Hohe ontogenische Stabilität. Die Isoenzyme besitzen ihre katalytische Funktion in vielen verschiedenen Stadien der Pflanzenentwicklung und ihre Elektrophoresemuster sind konstant.
3. Für die Analyse der Isoenzyme wird nur sehr wenig Pflanzenmaterial benötigt. Bereits ein kleiner Samen ist für eine elektrophoretische Trennung ausreichend.
4. Zahlreiche Enzymsysteme und Proben können gleichzeitig untersucht werden.
5. Kodominanz-Ausprägung, d.h. heterozygote Individuen können von den Homozygoten unterschieden werden. Allerdings können rezessive „Null-Allele“ auftreten.
6. Zahlreiche Isoenzyme können in einer einzigen experimentellen Untersuchung ausgewertet werden.
7. Der Vererbungsmodus vieler Isoenzymssysteme ist bereits bekannt oder kann leicht überprüft werden.
8. Im Vergleich zu anderen Methoden ist nur eine vergleichsweise einfache Ausstattung des Labors erforderlich.

1.3.2.1. Besondere Bedeutung bestimmter Allelvarianten

Einige Allelvarianten und Genotypen haben bei der Naturverjüngungserfolg der Buche einen besonderen Einfluss. So wird die genetische Anpassungsfähigkeit der Populationen an neue Umweltbedingungen in Abhängigkeit von der Präsenz seltener Allele mit „präadaptiver“ Funktion betrachtet, welche adaptive Kapazitäten darstellen (Hattemer et al. 1982, Bergmann et al. 1990, Finkeldey 1993, Turok et al. 1998).

Die folgenden allelischen Varianten erscheinen wegen ihrer Anpassungsrelevanz betrachtenswert:

- **LAP-A₄**

Die Allelvariante LAP-A₄ wurde in vielen Untersuchungen als bedeutsam für die Überlebensfähigkeit von Jungwuchs unter Stressbelastungen charakterisiert (Müller-Starck und Ziehe 1991, Müller-Starck 1993, Hattemer et al. 1993 und Ziehe et al. 1999). Deswegen

wurde in dieser Untersuchung die Häufigkeit dieser Allelvariante mit besonderem Interesse betrachtet.

- **PGM-A₂**

Diese Allelvariante scheint unter Umweltbelastungen zumindest im heterozygoten Zustand tolerante Eigenschaften zu entwickeln. Konnert et al. (2000) berichteten in einer bundesweiten Auswertung über eine beträchtliche Häufigkeit von PGM-A₂ in belasteten Mittelgebirgsregionen.

- **IDH-A₂**

Die Individuen mit dem Genotyp IDH-A₂A₂ zeigten zwar unter verschiedenen Standortsbedingungen einen Nachteil in ihrer Viabilität (Starke et al. 1996). Die Allelvariante A₂ hat aber weitere Bedeutung im Zusammenhang mit dem Befall durch *Cryptococcus fagisuga* Lind. (Gora et al. 1994), welches eine Eintrittspforte für nachfolgende Pilze bedeuten kann.

- **MDH-B**

Die Varianten des Isoenzymystems MDH-B wurden in Meliorationsversuchen als potenzielle Indikatoren für den Verjüngungserfolg gewertet. Der Genotyp MDH-B₃B₄ erwies sich unter zwei verschiedenen Standortsbedingungen als besonders überlebensfähig (Starke et al. 1996). Die Allelvariante MDH-B₄ wurde allerdings insgesamt mit einer geringen Häufigkeit beobachtet (Starke et al. 1996).

- **6PGDH-A**

Für den Enzymgenlocus 6PGDH-A beobachteten Konnert und Spiecker (1996) eine größere Häufigkeit des heterozygoten Genotyps A₂A₃ unter jenen Buchen, die bereits einen Zieldurchmesser erreicht hatten. Bei A₃ handelt es sich um die deutlich seltenere der beiden in der Regel beobachteten Varianten an 6PGDH-A. Obwohl dieser Befund in anderen Untersuchungen nicht immer bestätigt wurde, könnte sich hier eine von lokalen Umweltbedingungen abhängige Förderung des Wachstums durch A₃ gezeigt haben.