

Machbarkeitsstudie

Herkunftskontrollen von Saat- und Pflanzgut aus lokalen Herkünften

Auftraggeber: Institut für Umweltplanung
 Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Bearbeiter: Walter Durka

Erstellt im Rahmen des DBU Projektes „Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen“, Prasse, Kunzmann & Schröder 2010

Machbarkeitsstudie Herkunftskontrollen von Saat- und Pflanzgut aus lokalen Herkünften

Auftraggeber: Institut für Umweltplanung
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Herrenhaeuser Strasse 2
30419 Hannover

Bearbeiter: Dr. Walter Durka
Wielandstr. 24
06114 Halle

Email: walter.durka@ufz.de

Erstellt im Rahmen des DBU Projektes „Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen“, Prasse, Kunzmann & Schröder 2010

Bearbeitungsdatum: 5.4.2009

In dieser Studie sind einige Abbildungen enthalten, die urheberrechtlich geschützt sind, und ausschließlich für den internen Gebrauch bestimmt sind: Abb. 3.1, 3.4A, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.11. Die Weitergabe oder Veröffentlichung dieser Abbildungen ist untersagt.

Inhalt

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
3	Genetische Vielfalt und biogeographische und ökologische Arealstrukturen.....	10
3.1	<i>Lokale Anpassung und adaptive genetische Variation.....</i>	<i>11</i>
3.2	<i>Neutrale genetische Variation</i>	<i>16</i>
3.2.1	Genetische Diversität und Merkmale der Lebensgeschichte	19
3.2.2	Ökologisch-Genetische Charakterisierung wichtiger Grünlandarten	23
3.2.3	Biogeographische Muster in Europa	26
3.2.4	Genetische Variation und Räumliche Skalen	31
3.3	<i>Genetische Marker und die Abgrenzung von Herkunftsgebieten</i>	<i>34</i>
3.4	<i>Schlußfolgerungen für Herkunftsgebiete.....</i>	<i>35</i>
4	Genetische Markersysteme zur Kontrolle lokaler Herkünfte	37
4.1	<i>Markersysteme</i>	<i>37</i>
4.1.1	Allozym-Analyse	37
4.1.2	Mikrosatelliten	38
4.1.3	RAPD.....	39
4.1.4	AFLP.....	39
4.1.5	Chloroplasten-DNA-Marker (cpDNA)	40
4.1.6	SNP	41
4.1.7	DNA-barcoding.....	42
4.1.8	DArt	42
4.1.9	Bewertung und Eignung.....	42
4.2	<i>Statistische Verfahren der Herkunftszuordnung</i>	<i>43</i>
4.2.1	Privat-Allele	43
4.2.2	Deskriptive Parameter auf Populationsebene	44
4.2.3	Genetische Distanz und genetische Differenzierung.....	44
4.2.4	Zuweisungs-Tests für einzelne Individuen.....	45
4.2.5	Bayesische Clusterverfahren	45
5	Herkunftskontrolle: Struktur und Kostenschätzung	46
5.1	<i>Dokumentation und Referenzdatenbank.....</i>	<i>46</i>
5.2	<i>Referenzproben und Genetische Karte.....</i>	<i>49</i>
5.3	<i>Verfahren der Herkunftskontrolle</i>	<i>49</i>
5.4	<i>Kostenschätzungen.....</i>	<i>50</i>
5.4.1	Etablierung von genetischen Markersystemen	51
5.4.2	Erstellung einer Referenzdatenbank.....	51
5.4.3	Routine- oder Kontrolluntersuchungen an Saat- oder Pflanzgut	52
5.5	<i>Offene Fragen</i>	<i>52</i>
6	Nachweismöglichkeiten des Vermehrungs- bzw. Anbauortes mittels Isotopen-Analysen	55
6.1	<i>Methodische und theoretische Grundlagen.....</i>	<i>55</i>
6.2	<i>Praktisches Verfahren und Kosten.....</i>	<i>57</i>
7	Abschließende Bewertung.....	59

Abbildungen

Abbildung 3.1. Genetische Differenzierung von neutralen Markern und Fitness-relevanter Merkmale bei *Festuca pratensis*..... 15

Abbildung 3.2 Zusammenhang zwischen quantitativ-genetischer Differenzierung und neutral-genetischer Differenzierung. 16

Abbildung 3.3 Die Beziehung zwischen Genfluss und genetischer Differenzierung. 19

Abbildung 3.4. A. Zusammenhang zwischen genetischer Diversität in Populationen (H_e) und genetischer Diversität zwischen Populationen..... 21

Abbildung 3.5. Zusammenhang zwischen der genetischen Differenzierung von Kern-Genom und Organell-Genom..... 23

Abbildung 3.6. Maximale Ausdehnung der letzten Vereisung (18.000-20.000 ybp) und Hauptrefugien. Hauptwege der postglazialen Wiederbesiedlung. 27

Abbildung 3.7. Verteilung von Chloroplasten-Haplotypen europäischer Eichen-Arten 27

Abbildung 3.8 Abb. Phylogeographische Struktur des Wiesen-Schwingels. 29

Abbildung 3.9 A. Verbreitung von vier cpDNA-Haplotypen der Roten Lichtnelke 30

Abbildung 3.10 Beziehung zwischen genetischer Differenzierung und geographischer Distanz 31

Abbildung 3.11 Abhängigkeit der genetischen Differenzierung zwischen Populationen von der geographischen Entfernung für verschiedene Arten des Grünlandes..... 33

Abbildung 5.1. Beispiel-Datensätze der Genotyp-Datei für A) AFLP-Daten und B) Mikrosatelliten-Daten 48

Abbildung 5.2 Schematische Darstellung eines Systems zur Herkunftskontrolle mittels genetischer Fingerabdruck-Analysen. 47

Abbildung 6.1. Isotopensignatur im Niederschlagswasser über Europa..... 56

Tabellen

Tabelle 3.1 Wichtige Unterschiede zwischen den Genomen und Markern für mitochondriale, chloroplasten und Kern-DNA..... 17

Tabelle 3.2. Der Einfluss von Lebensform, geographischer Verbreitung, Befruchtungssystem, Samenausbreitung und Sukzessionsstatus auf die Allozym-Diversität 21

Tabelle 3.3. Der Einfluss von Lebensform, geographischer Verbreitung, Befruchtungssystem, Samenausbreitung und Sukzessionsstatus auf die genetische Diversität basierend auf RAPD- und Mikrosatelliten-Analysen 22

Tabelle 3.4 Sechzig weitverbreitete Arten des Grünlandes und deren wichtige Merkmale und publizierte Mikrosatellitenmarker. 24

Tabelle 4.1. Genetische Markersysteme und ihre Eigenschaften..... 42

1 Zusammenfassung

Im Rahmen des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projektes „Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut (ohne Bäume und Sträucher) – Regiosaaten“ untersucht diese Studie die Grundlagen und technischen Möglichkeiten der Herkunftskontrolle mit speziellem Fokus auf Arten des Grünlandes. Dabei wurden aufbauend auf einer Literaturlauswertung vor allem die genetischen und in geringerem Umfang auch die isotopenchemischen Grundlagen für die Differenzierung von Herkünften und deren praktischen Nachweismöglichkeiten untersucht.

Genetische Differenzierung verschiedener regionaler Herkünfte kann entweder auf Anpassung und Selektion beruhen oder auf selektions-unabhängigen Effekten der genetischen Drift und historischen Ausbreitung. Lokale Anpassung ist bei Pflanzen weit verbreitet, so dass grundsätzlich davon auszugehen ist, dass Pflanzen an ihrem Standort besser gedeihen als standortsfremde Pflanzen. Hierbei spielen sowohl das Klima als auch die abiotischen und biotischen Standortverhältnisse eine Rolle. Das Einbringen von nicht angepasstem Saatgut kann verschiedene negative Effekte haben wie reduzierter Fitness der Nachkommen oder die Verdrängung der lokalen Herkünfte und ihres genetischen Potentials.

Aus historischer Sicht ist die genetisch-geographische Struktur der mitteleuropäischen Flora stark geprägt von der nacheiszeitlichen Wiederbesiedlung. Durch die Wiederbesiedlung aus genetisch differenzierten Refugialpopulationen sind in Mitteleuropa bei vielen Arten mehrere innerartliche Linien eingewandert. Die dabei entstandenen phylogeographischen Muster können bis heute erhalten sein und bilden neben der lokalen Anpassung genetisch differenzierte Gruppen aus.

Die biologischen Eigenschaften der Pflanzenarten beeinflussen deren räumliche genetische Struktur und insbesondere den Grad der genetischen Differenzierung zwischen Populationen. Dabei spielt die Ausbreitungsfähigkeit der Samen und Pollen eine entscheidende Rolle für die genetische Struktur der Populationen auf lokaler und regionaler Skala. Selbstbestäubte Arten und solche mit geringer Samenausbreitungskapazität zeigen in der Regel große Differenzierung zwischen Populationen, während ausgekreuzte wind- oder insektenbestäubte Arten, solche mit effizienter Samenausbreitung und langlebige Arten weniger stark differenziert sind. Die Mehrzahl der Grünlandarten ist auskreuzend und mehrjährig, so dass mit mäßiger Differenzierung zwischen Populationen zu rechnen ist.

Insgesamt ist zu erwarten, dass Grünlandarten auf Grund von historischen Ursachen und aufgrund von lokaler Anpassung genetische Differenzierung innerhalb von Deutschland aufweisen. Inwieweit diese Differenzierung sich mit den definierten Herkunftsregionen deckt,

ist offen. Aufgrund der häufig nicht-linearen Beziehung zwischen genetischer Divergenz und geographischer Entfernung ist es fraglich, ob für eine Pflanzenprobe eindeutig eine Herkunftsregion bestimmt werden kann, wenn nicht gleichzeitig eine aus derselben Herkunft stammende Referenzprobe vorhanden ist. Für ein Kontrollsystem auf genetischer Basis ergibt sich daraus, dass neben einer Referenzdatenbank, die stichprobenhaft einen möglichst großen Teil des Areal der Art abdeckt, alle fraglichen Herkünfte in Form einer Rückstellprobe zur Verfügung stehen müssen.

Von den heute üblichen molekularen genetischen Fingerprint-Systemen erscheinen Mikrosatelliten-Marker, AFLPs und Chloroplasten-Marker am besten geeignet für den Herkunftsnachweis. Es wird ein Kontrollsystem für den genetischen Herkunftsnachweis entworfen, das zwei parallele Strategien verfolgt. (1) Einerseits kann allein die Übereinstimmung oder Nicht-Übereinstimmung der fraglichen Herkunft mit der hinterlegten Rückstellprobe untersucht werden. Dafür genügen die Analyse der fraglichen Probe und der Rückstellprobe und die Festlegung eines kritischen Maßes der genetischen Distanz, das Nicht-Übereinstimmung anzeigt. (2) Andererseits kann eine unabhängige Herkunftsidentifikation angestrebt werden, indem eine fragliche Probe mit vielen potentiellen Herkunftsregionen verglichen wird. Dafür und für die Festlegung der kritischen Distanz muss eine vergleichende genetische Analyse aller potentiellen Herkunftsregionen erfolgen. Eine solche „genetische Karte“ müsste als Vorleistung für ein Kontrollsystem erbracht werden. Eine Reihe von Fragen über die spezifische Eignung verschiedener Markersysteme für einzelne Pflanzenarten, den dabei nötigen Probenumfang und die Eignung statistischer Auswerteverfahren müsste in einem praktischen Pilotprojekt untersucht und geklärt werden.

Verschiedene geographische Regionen unterscheiden sich aufgrund klimatischer und geologischer Gegebenheiten in der Isotopensignatur verschiedener chemischer Elemente. Unabhängig von ihrer genetischen Konstitution nehmen Pflanzen während des Wachstums die typische Isotopensignatur des Wuchsortes an. Diese kann mit isotochemischen Analysen zur Herkunftsbestimmung benutzt werden. Prinzipiell ist die Methodik damit geeignet, bei Wildpflanzensaatgut den Sammelort bzw. den Vermehrungsort nachzuweisen. Auch hier erfolgt der Herkunftsnachweis, indem die Übereinstimmung mit einer Rückstellprobe bestimmt wird.

Der genetische und der isotochemische Herkunftsnachweis ergeben komplementäre Informationen zur genetischen und stofflichen Herkunft. Diese sind nicht austauschbar. Je nach dem ob der Ort der Erzeugung oder die genetische Identität gefragt ist können sie differenziert eingesetzt werden.

2 Einleitung

Die vorliegende Studie wurde im Rahmen des von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderten Projektes „Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut (ohne Bäume und Sträucher) – Regiosaaten“ angefertigt.

Die Studie basiert auf der Auswertung relevanter wissenschaftlicher Literatur. Sie kann auf anderen Arbeiten aufbauen, die die Bedeutung der genetischen Vielfalt und die regionale und standörtliche genetische Differenzierung und Anpassung von Wildpflanzen und deren Bedeutung für den Arten- und Naturschutz dargelegt haben (z.B. Rogers & Montalvo 2004) und auch speziell für das Gebiet und die Gegebenheiten in Deutschland spezifiziert wurden (Seitz *et al.* 2005; Seitz *et al.* 2007; Seitz & Kowarik 2008). Die in dieser Arbeit behandelten genetischen Muster und Prozesse gelten grundsätzlich für Bäume, Sträucher, Kräuter und Gräser in gleicher Weise. Sie werden hier aber mit dem Schwerpunkt auf den Nicht-Baumarten ausgeführt (vgl. dazu z.B. Seitz *et al.* (2007), Gebhardt (2008); Nielsen & Kjær (2008)).

Die Ausbringung von Wildpflanzen in der freien Landschaft bei Rekultivierungs- oder Begrünungsmaßnahmen berührt Fragen des Naturschutzes und des Ressourcenschutzes. Bei Pflanzmaßnahmen in der freien Landschaft sollten züchterisch veränderte Kultursippen nicht verwendet werden, weil sie eine eingeschränkte genetische Vielfalt besitzen (Seitz *et al.* 2007). In dem Übereinkommen über Biologische Vielfalt (CBD) haben sich die Unterzeichner verpflichtet, auch die innerartliche Vielfalt zu erhalten, was auch den Schutz der genetischen Vielfalt in ihrer natürlichen Struktur umfaßt. Da die genetische Vielfalt von Pflanzenpopulationen somit ein eigenständiges Schutzobjekt des Naturschutzes ist (Klingenstein & Wingender 2000), muss dieser Aspekt entsprechend einbezogen werden.

Die genetische Vielfalt von Pflanzenarten, also die innerartliche Variabilität, betrifft dabei zwei Ebenen: einerseits die genetisch festgelegten Anpassungen an lokale Standortverhältnisse und klimatische Faktoren wobei lokal angepasste Genotypen (Ökotypen) Fitness-Vorteile gegenüber fremden Genotypen haben. Lokale Anpassung kann sich dabei bei Eigenschaften wie Frostresistenz, Phänologie oder Toleranz gegenüber der Nutzung entwickeln. Andererseits existiert genetische Vielfalt in solchen genetischen Merkmalen, die nicht zwingend einen ökologischen Anpassungswert haben und die vor allem durch die Einwanderungsgeschichte und durch begrenzte lokale Ausbreitungsfähigkeit geographisch differenziert sind.

Das Einbringen von nicht angepasstem Material kann verschiedene negative Auswirkungen haben (Mijnsbrugge *et al.* 2009). Intraspezifische Hybridisierung zwischen lokalen und fremden Genotypen kann zu „Auszucht-Depression“ führen, d.h. reduzierter Fitness in späteren Generationen (Edmands 2007; Hufford & Mazer 2003). Nicht standorttypische Herkünfte können so die Genpools standorttypischer Herkünften verändern und letztlich verdrängen (Rhymer & Simberloff 1996). Generell können fremde Genotypen nicht an die lokalen Bedingungen angepasst sein und haben deswegen eine reduzierte Fitness. Diese ist oft schwer festzustellen, da späte Wachstumsstadien relevant sind, oder bestimmte selten eintretende Umweltbedingungen selektiv wirken. Gelegentlich können fremde Genotypen erfolgreicher sein als die lokal angepassten und invasiv werden. Solche „kryptischen Invasionen“ sind schwer festzustellen (Hufford & Mazer 2003; Saltonstall 2002).

Aus diesen kurz umrissenen Ursachen folgt das Ziel, die natürliche genetische Vielfalt zu erhalten durch die Verwendung genetisch vielfältigen gebietseigenen Wildpflanzensaatgutes. Vor allem bei Rekultivierungsvorhaben wird dies schon lange propagiert (Van Andel 1998). Obwohl diese Frage hat auch in der ökologischen Wissenschaft einen hohen Stellenwert und wird aktuell diskutiert (z. B. Broadhurst *et al.* 2008; Mijnsbrugge *et al.* 2009). In anderen Ländern gibt es z. T. bereits anerkannte Regelungen für die Gewinnung und Verwendung von gebietseigenem Wildpflanzen-Saatgut (Schweiz: Skew 2003) bzw. Unterstützung solcher Initiativen durch staatliche Institutionen (USA: Usda 2009, Australien: <http://www.florabank.org.au/>).

Der zentrale Begriff „gebietseigenes Wildpflanzensaatgut“ hat zwei unterschiedliche Bedeutungsebenen, eine genetische und eine rein stoffliche, die klar zu unterscheiden sind.

Unter genetischen Gesichtspunkten ist das Ziel, die **gebietseigene genetische Vielfalt** zu erhalten (genetische Ressource). Dabei ist auch relevant, ob es genetisch verankerte Merkmale gibt, die sich zwischen geographischen Regionen unterscheiden, möglicherweise in Folge lokaler Anpassung, und die als solche erhalten werden sollen, z.B. in Form von regionstypischen Sorten oder Genotypen. Die genetischen Merkmale sind ausschließlich von den jeweiligen Elternpflanzen ererbt und damit im Prinzip unabhängig vom Anbauort.

Unter rein stofflicher Sicht ist das Ziel, **gebietseigene Erzeugung bzw. Vermehrung** zu sichern, also sicherzustellen, dass Pflanzen in einer bestimmten Region erzeugt wurden, unabhängig von ihrem Genotyp. Hier können chemische oder isotopechemische Methoden herangezogen werden, um den Erzeugungsort festzustellen.

Folglich können vier verschiedene Fälle unterschieden werden, je nach dem, ob Genotyp und/oder Erzeugungsort gebietseigen oder gebietsfremd sind. Nur dann, wenn Saatgut direkt am Standort gesammelt wurde, stimmt die genetische Herkunft mit der stofflichen Herkunft

überein, und das Saatgut kann sowohl über den Genotyp als auch die stofflichen Eigenschaften identifiziert werden (Fall 1). Genetisch fremdes Saatgut wird bei Vermehrung innerhalb einer bestimmten Region die Isotopensignatur dieser Region annehmen (Fall 2). Sobald gebietseigenes Saatgut aber an einem anderen Ort vermehrt wird, entsprechen die stofflichen, z.B. isopenchemischen Merkmale denen des Vermehrungsstandortes, während der Genotyp zunächst unverändert bleibt (Fall 3).

		Genetische Herkunft	
		<ul style="list-style-type: none"> • Von Elternpflanzen ererbt • Genetische Merkmale 	
		Gebietseigener Genotyp	Gebietsfremder Genotyp
Stoffliche Herkunft <ul style="list-style-type: none"> • Am Wuchsort erworben • Isotopenchemische und chemische Merkmale 	Gebietseigene Erzeugung	1	2
	Gebietsfremde Erzeugung	3	4

Die vorliegende Studie hat dementsprechend **zwei** Haupt-Ziele:

1. Darstellung der fachlichen Grundlagen zum Komplex der genetischen Vielfalt innerhalb von Arten (Kapitel 3). Der Fokus liegt dabei auf genetischen Unterschieden zwischen Regionen Deutschlands und der Möglichkeiten ihres Nachweises mittels molekular-genetischer Fingerprint-Methoden, inklusive eines Entwurfes für ein Kontrollsystem (Kapitel 4 und 5).

2. Darstellung der Nachweismöglichkeiten für die gebietseigene Vermehrung mittels stofflicher Analysen, insbesondere durch natürliche Isotopenverhältnisse (Kapitel 6).

3 Genetische Vielfalt und biogeographische und ökologische Arealstrukturen

Die Verwendung lokalen Saat- oder Pflanzgutes dient dem Ziel, lokal angepasste und/oder genetisch differenzierte und aus der betreffenden Region stammende Herkünfte für Anpflanzungen zu verwenden. Die Grundlage dafür ist der Befund, bzw. die Annahme, dass

1. lokale Anpassung an die biotische und abiotische Umwelt stattgefunden hat, so dass lokale Herkünfte bessere Überlebenschancen haben als fremde; lokale Anpassung ist genetisch determiniert und nicht ausschließlich durch phänotypische Plastizität bedingt.

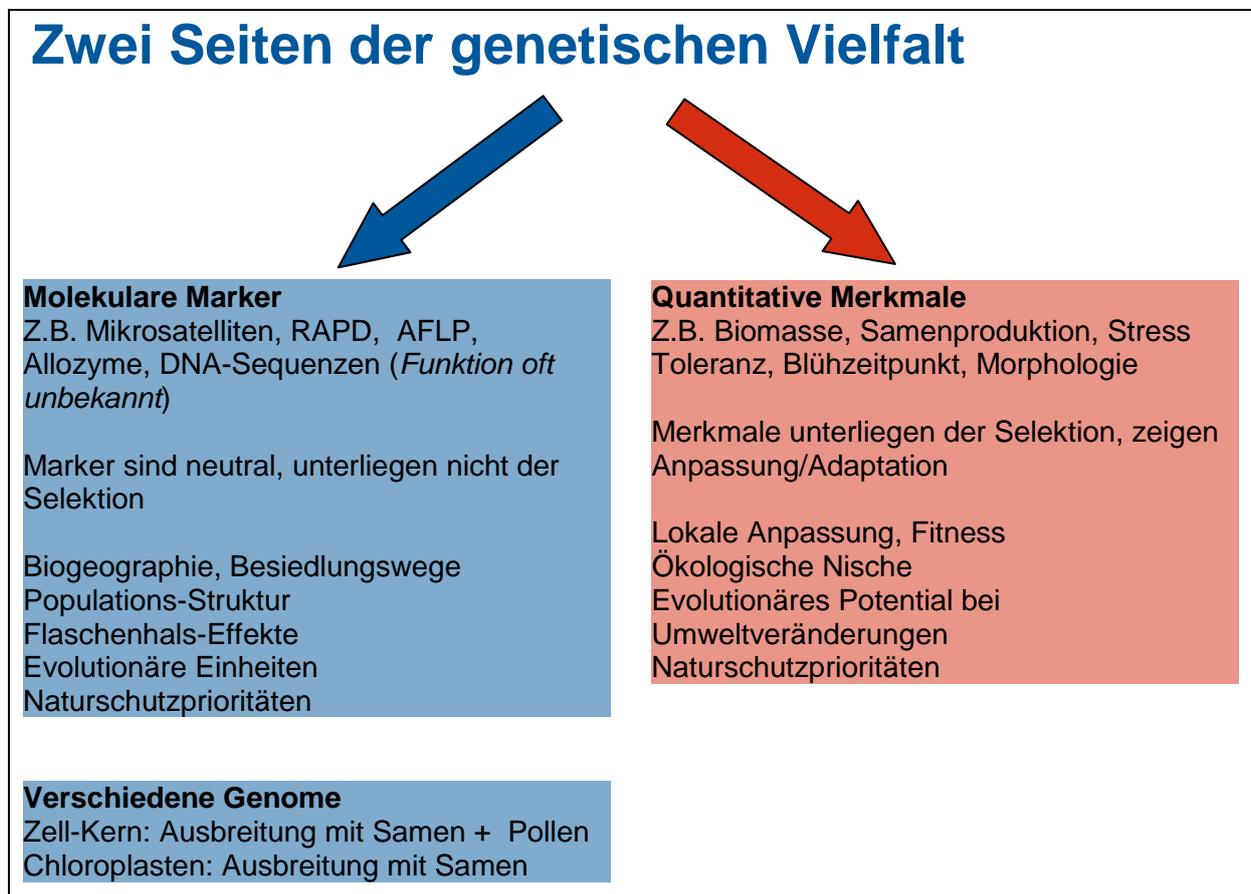
2. eine räumliche Differenzierung des Genpools vorliegt aufgrund von neutralen, d.h. nicht der Selektion unterliegenden Prozessen, z.B. historischen Effekten (z.B. Nacheiszeitliche Wiedereinwanderung aus unterschiedlichen Refugien), oder aufgrund der Biologie der Arten (z.B. lokale Differenzierung durch räumliche Isolation und geringen Genfluss zwischen Teilpopulationen). Das Vorhandensein solcher Differenzierungsmuster ist eine notwendige Voraussetzung für eine spätere Kontrolle. Wäre eine Pflanzenart über ihr gesamtes Areal im ständigen Gen-Austausch und läge keine genetische Differenzierung vor, wäre eine Herkunftskontrolle ökologisch nicht begründbar und praktisch nicht durchführbar. Im Folgenden wird dazu dargelegt, Pflanzenarten innerartlich genetisch strukturiert sein können. Es wird nach verallgemeinerbaren Mustern gesucht innerhalb bestimmter Gruppen mit bestimmten pflanzlichen Merkmalen wie Wuchsform (Gras, Kraut, Strauch, Baum), Arealtyp (z.B. mutmaßliche glaziale Refugien), Ausbreitungsform (Wind, Tier, Selbstausbreitung) oder Bestäubungs- und Befruchtungssystem (Wind, Insekten, Selbstbestäubung).

Genetische Vielfalt (= genetische Diversität), die letztlich das Vorhandensein unterschiedlicher Nukleotidsequenzen in der genomischen DNS beschreibt, kann sich auf zwei verschiedene Ebenen beziehen, wenn man die Wirkung der unterschiedlichen genetischen Formen berücksichtigt: **neutrale genetische Variation** und **adaptive genetische Variation**. Die üblicherweise mit molekularen Markern (Mikrosatelliten, AFLP, DNA-Sequenzen) untersuchte Variation bezieht sich in der Regel auf neutrale Loci ohne direkte physiologische Funktion. Diese Variation unterliegt vor allem Zufallseffekten und erlaubt so, die Effekte demographischer Veränderungen, wie z.B. Veränderungen der Populationsgrößen, und stochastische Ereignisse in der Vergangenheit zu beobachten. Neutrale genetische Variation ist relativ einfach über Laboranalysen quantifizierbar.

Merkmale, die der Selektion unterliegen und direkten Anpassungswert haben, werden in aller Regel von mehreren genetischen Loci kodiert, und diese sind in aller Regel auch nicht genau bekannt. Deswegen kann die genetische Vielfalt an adaptiven Loci vor allem über **quantitative Merkmale** untersucht werden, wie z.B. morphologische Merkmale,

Biomasseproduktion oder Samenerzeugung. Quantitative genetische Variation ist nur mit Hilfe von common-garden- und Gewächshausversuchen durch Anzucht und Vermessung von Samen-Familien messbar.

Während molekulare genetische Variation 100% erblich ist, d.h. jedes beobachtete Allel stammt aus der vorigen Generation und wird an die nächste weitergegeben, ist die Erbllichkeit quantitativer Merkmale unterschiedlich. Der beobachtete Phänotyp einer Pflanze ist Produkt der ererbten Gene und der Umwelt. Unterschiedliche Merkmale zeigen eine große Bandbreite der Erbllichkeit, die zwischen 20% und 100% liegen kann. So liegt etwa die Erbllichkeit bei den gut untersuchten Baumarten bei ca. 20% für Dicken- und Höhenwachstum, bei ca 50% für die Holzdichte, 60% für Holzfaserlänge und Geradschaftigkeit. Der Zeitpunkt des Austriebes ist zu 80% genetisch festgelegt und die Blütenfarbe zu 100% (Geburek 2004).



3.1 Lokale Anpassung und adaptive genetische Variation

Pflanzenarten, die über ein großes Verbreitungsareal vorkommen, sind dazu in der Lage, weil sie entweder phänotypisch plastisch sind, hohe genetische Variabilität aufweisen, oder beides. Phänotypisch plastische Arten weisen einen Genotyp auf, der in der Lage ist, unter verschiedenen Umweltbedingungen verschiedene Phänotypen auszubilden. Im Gegensatz

dazu können Populationen auch genetisch differenziert sein durch Anpassung an lokale Bedingungen. Viele Pflanzenarten zeigen lokale Anpassung (Übersicht bei Linhart & Grant (1996)) und dies wurde auch stark unter dem praktischen Aspekt von Wiederbegrünungs- und Pflegemaßnahmen untersucht. Dabei gibt es eine Reihe von Arbeiten aus Nordamerika (Gordon & Rice 1998; Knapp & Rice 1998; Rice & Knapp 2008) und in den letzten Jahren wurde auch für mitteleuropäische Grünlandarten (z.B. Becker *et al.* 2008; Bischoff *et al.* 2006a; Bischoff *et al.* 2006b; Hufford & Mazer 2003; Smith *et al.* 2009). Es liegt somit eine gute Informationsbasis für Grünlandarten vor. Insgesamt zeigen diese Studien, dass unterschiedliche Herkünfte in Bezug auf Wachstumsmerkmale und Fitness genetisch bedingte Unterschiede zeigen und dass lokale Anpassung in Grünlandpflanzen häufig ist.

Lokale Anpassung

Lokale Anpassung setzt genetische Variation in den betroffenen Merkmalen voraus und erfolgt als Antwort auf räumlich unterschiedliche Umweltbedingungen. Der wichtigste großräumig adaptiv wirkende Faktor ist das Klima. Bodenbedingungen sind dagegen kleinräumiger wirksam, und biotische Interaktionen wie Pathogene oder Fressfeinde können noch kleinräumiger wirken und zu lokaler Anpassung führen. Der Grad der Anpassung ist von der Unterschiedlichkeit der selektiven Bedingungen abhängig.

Eine große Zahl von Studien hat nachgewiesen, dass Genotypen an ihrem Ursprungsstandort eine höhere Fitness aufweisen als an einem fremden Ort, was ein Zeichen von lokaler Anpassung ist (Smith & Bradshaw 1979, Joshi *et al.* 2001; Leimu & Fischer 2008). **Grundsätzlich gilt damit die Regel, dass Pflanzen am Standort ihrer Herkunft einen Heimvorteil haben.** Allerdings ist ein Heimatvorteil nicht immer festzustellen, sondern kann auf bestimmte Orte, bestimmte Arten, bestimmte Merkmale oder im Vergleich zu bestimmten andern Herkünften beschränkt sein. Andererseits ist zu bedenken, dass experimentelle Untersuchungen zeitlich begrenzt sind und somit Anpassungen an seltene oder extreme klimatische Ereignisse wie Spätfrost möglicherweise unentdeckt bleiben können.

Nicht alle Herkünfte zeigen einen Heim-Vorteil. So fanden (Becker *et al.* 2008), dass *Hypochoeris radicata* einen Heimvorteil hatte, allerdings nicht bei allen Herkünften, und dass dieser zwar beim Samenansatz, nicht aber für andere Merkmale wie die Überlebensrate und die Rosettengröße bemerkbar war. Das schlechte lokale Abschneiden einzelner Herkünfte kann damit erklärt werden, dass die Population bei ihrer Gründung nicht genügend genetische Variation mitbrachte um eine optimale Anpassung zu entwickeln (Abdala-Roberts & Marquis 2007; Rapson & Wilson 1988; Rice & Mack 1991)

Nicht alle Merkmale zeigen lokale Anpassung. So wurde insbesondere für ontogenetisch frühe Merkmale, wie die Keimungsrate festgestellt, dass es genetisch bedingte Unterschiede zwischen verschiedenen Herkünften von Graslandarten gab (Bischoff *et al.* 2006b), ohne aber einen Heimvorteil aufzuweisen. Andererseits konnten (Raabova *et al.* 2007) zeigen, dass

lokale Herkünfte von *Aster amellus* nach Aussaat 42-68% mehr Jungpflanzen hervorbrachten als fremde Herkünfte.

Neben den abiotischen Verhältnissen, die das Wachstum beeinflussen, üben biotische Interaktionen, also z.B. Konkurrenz durch andere Pflanzen, Fressfeinde oder Pathogene eine starke Selektionswirkung aus und bieten Gelegenheit zur lokalen Anpassung. Der Grad der lokalen Anpassung zeigt sich somit teilweise erst unter Konkurrenzbedingungen. So war der Heimvorteil von *Plantago lanceolata* unter Konkurrenzbedingungen in einer Wiesen-Artengemeinschaft stärker als ohne Konkurrenz (Bischoff *et al.* 2006a). Bei *P. lanceolata* wurden signifikante Unterschiede zwischen Herkünften in der Empfindlichkeit gegenüber spezialisierten laubfressenden Käfern festgestellt und es wurden lokale Herkünfte weniger befallen als fremde (Cremieux *et al.* 2008). Allerdings wurde in der gleichen Studie festgestellt, dass lokale Herkünfte von *H. lanatus* stärker von Rostpilz befallen waren als fremde.

Auch wurde mehrfach in Experimenten beobachtet, dass eine bestimmte Herkunft an allen Standorten am besten abschneidet. So fanden Bischoff *et al.* (2006), dass eine schweizerische Herkunft von *Lotus corniculatus* alle anderen europäischen Herkünfte übertraf.

Eine wichtige Frage ist die nach der **räumlichen Skala der lokalen Anpassung**. Für *Hypochoeris radicata* als Art mit hoher Ausbreitungskapazität der Samen zeigten Becker *et al.* (2008), dass die Fitness kontinuierlich mit der Entfernung zum Herkunftsregion abnahm. Ähnliche lineare Abnahme der Fitness mit der Entfernung wurden für mehrere Arten gefunden, z.B. *Carlina vulgaris* (Becker *et al.* 2006), insbesondere auch für weitverbreitet häufige Graslandarten wie *Trifolium pratense*, *Dactylis glomerata*, und *Plantago lanceolata* (Joshi *et al.* 2001). Die bisherigen Studien geben keine Hinweise darauf, dass Arten mit unterschiedlicher Ausbreitungsfähigkeit systematische Unterschiede im Grad der lokalen Anpassung aufweisen würden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch (Leimu & Fischer 2008) in einer großen vergleichenden Studie über lokale Anpassung von krautigen Arten, in der sie feststellen, dass lokale Herkünfte am Herkunftsort meist besser wachsen und dass dies auch unabhängig von pflanzlichen Merkmalen der Lebensgeschichte war.

Bei den meisten genannten Studien waren die unterschiedlichen Standorte zwar räumlich getrennt, aber ökologisch sehr ähnlich. Lokale Anpassung an stark kontrastierende Standorte kann stärker sein und ist dann auch stärker durch die standörtliche Ähnlichkeit bestimmt als durch die Entfernung. So waren die genetischen und Fitness-Unterschiede zwischen *Lotus scoparius* Populationen in Kalifornien besser durch die Umweltvariablen zu erklären als durch die Entfernung (Montalvo & Ellstrand 2000). Unabhängig von einer generellen Abnahme der Fitness mit zunehmender Entfernung zeigten sich ähnliche Ergebnisse auch in den Europäischen Versuchen mit Grünlandarten. Für *Hypochoeris radicata* wurde festgestellt,

dass Fitnessunterschiede zwischen Standorten (3-50 km) innerhalb einer Region ebenso groß sein können wie die zwischen den Regionen (Becker *et al.* 2008). Dies legt nahe, dass auch über relativ kurze Entfernungen von wenigen Kilometern lokale Anpassung stattfinden kann. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Standortbedingungen unterschiedlich sind. So zeigten *P. lanceolata*, *H. lanatus* und *L. corniculatus* in manchen Merkmalen stärkere Differenzierung zwischen benachbarten Herkünften auf kontrastierenden Standorten (mesophile Wiese vs. Feuchtwiese) als zwischen weit entfernten aber standörtlich ähnlichen Herkünften (Bischoff *et al.* 2006a). Auch für *Aster amellus* wurde festgestellt, dass die Ähnlichkeit der Standortfaktoren wichtiger war als die geographische Entfernung, die allerdings maximal 70km betrug (Raabova *et al.* 2007).

Allerdings gibt es auch Studien, die keine lokale Anpassung über große Distanzen feststellten, z.B. zeigte *Chamaecrista fasciculata* unterhalb von 1000 km keine lokale Anpassung (Galloway & Fenster 2000). Auch für *Lotus corniculatus* fanden (Macel *et al.* 2007) keine Anpassung an das Klima. Leimu & Fischer (2008) stellten in einer vergleichenden Arbeit fest, dass, obwohl lokale Herkünfte meist einen Vorteil haben, dies oft keinen Selektionsvorteil darstellte. Mit diesem Befund wird langfristige die Bedeutung von lokaler Anpassung etwas relativiert.

Lokale Anpassung wird beeinflusst von der Stärke des Genflusses mit der Gene von nicht angepassten Genotypen aus anderen Populationen wirken und lokale Anpassung „verdünnen“. Ähnlich dem Effekt von „Aussterben durch Hybridisierung“ kann durch starken Genfluss benachbarter, aber anders angepasster Genotypen die Ausbildung eines lokal angepassten Genotyps erschwert oder verhindert werden (Rhymer & Simberloff 1996).

Auch das Beispiel des Wiesen-Schwingels (*Festuca pratensis*, Abbildung 3.1) aus drei schweizerischen Regionen zeigt, dass die Regionen sowohl in neutralen wie adaptiven Merkmalen genetisch differenziert sind, somit lokale Anpassung vorliegt (Peter-Schmid *et al.* 2008a; Peter-Schmid *et al.* 2008b). Die Regionen sind durch die Geologie und höhenbedingt klimatisch differenziert und erstrecken sich zusammen nur über eine Breite von ca. 100 km.

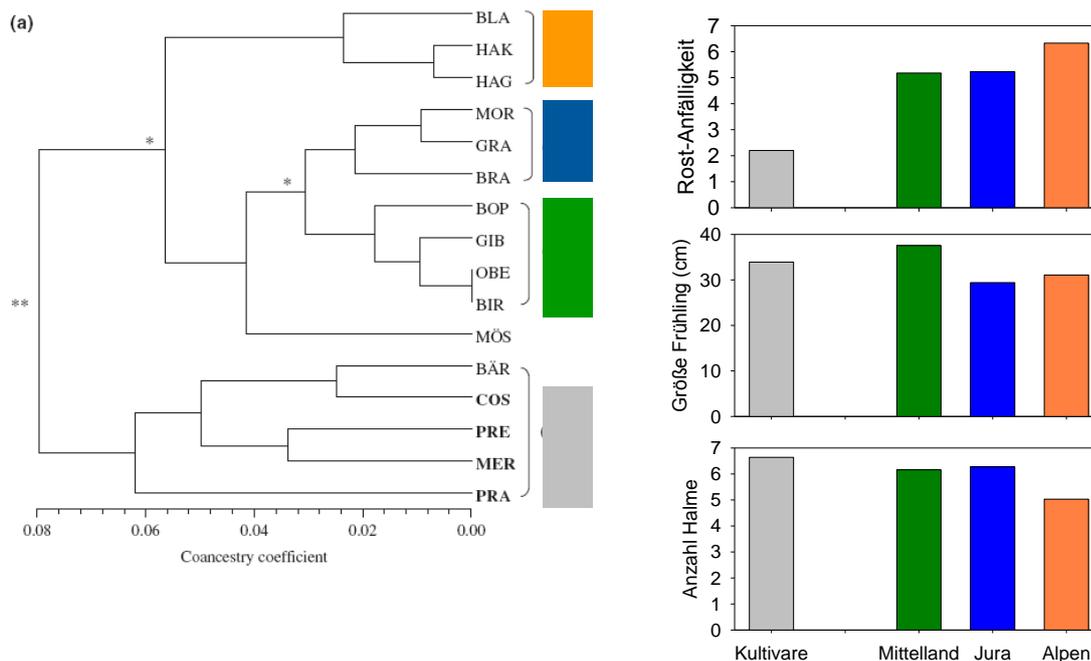


Abbildung 3.1. Genetische Differenzierung von neutralen Markern (Mikrosatelliten) und quantitativer Fitnessrelevanter Merkmale bei *Festuca pratensis* für drei Regionen der Schweiz (Peter-Schmid *et al.* 2008a; Peter-Schmid *et al.* 2008b).

Kann morphologische Differenzierung mit molekular-genetischen Markern ermittelt werden ?

Lokal angepasste Populationen sind genetisch differenziert in Bezug auf Fitness-relevante Merkmale. Der Grad der Differenzierung lässt sich quantitativ beschreiben als das Verhältnis der Varianz zwischen den Populationen zu der Summe der Varianz zwischen den Populationen und der additiven genetischen Varianz innerhalb der Populationen ($Q_{ST} = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + 2 \sigma_w^2)$), wobei σ_b^2 die Varianz zwischen den Populationen und σ_w^2 die additive genetische Varianz innerhalb der Populationen ist. Der Q_{ST} -Werte liegt zwischen 0 und 1 und beschreibt demnach den Grad der Unterschiedlichkeit von Populationen in quantitativen Merkmalen.

Da die Ermittlung von quantitativ-genetischer Variation methodisch aufwändig ist, liegt die Frage nahe, ob deren Muster mit den Mustern der neutralen genetischen Variation zusammenhängen, deren Ermittlung einfacher ist. Außerdem ist zu fragen, ob quantitativ-genetische Differenzierung zwischen Populationen wirklich adaptiv ist, oder nicht durch historische Effekte bedingt sind ohne klaren Anpassungswert. Um dies zu klären, vergleicht man Q_{ST} -Werte, die die Differenzierung quantitativ-genetischer Merkmale beschreibt mit den F_{ST} -Werten der neutralen genetischen Differenzierung. Die bisher umfassendste Analyse zu dieser Frage legten Leinonen *et al.* (2008) vor. Sie zeigten (Abbildung 3.2), dass Q_{ST} -Werte in der Regel höher sind als F_{ST} -Werte, was darauf hindeutet, dass natürliche Selektion stärker

auf quantitativ-genetische Variation wirkt als genetische Drift. Insbesondere bei geringer neutraler Differenzierung wurden kleine bis große Q_{ST} -Werte gefunden. Die mit neutralen Marker geschätzten F_{ST} -Werte stellen somit in der Regel einen minimalen Schätzer für die Differenzierung Fitness-relevanter Merkmale dar, der jedoch bei Werten von $F_{ST} < 0.2$ sehr unzuverlässig ist. Dies gilt unabhängig davon ob Bäume oder Kräuter untersucht wurden, abgesehen davon, dass Baumarten meist sehr niedrige F_{ST} -Werte zeigen. Bei Arten mit großer Differenzierung, wie z.B. Selbstbestäubern, ist die Differenzierung in neutralen molekularen Markern ein gutes Maß für die Unterschiede in Fitness-relevanten Merkmalen, wie z.B. an *Bromus tectorum* gezeigt wurde (Ramakrishnan *et al.* 2004).

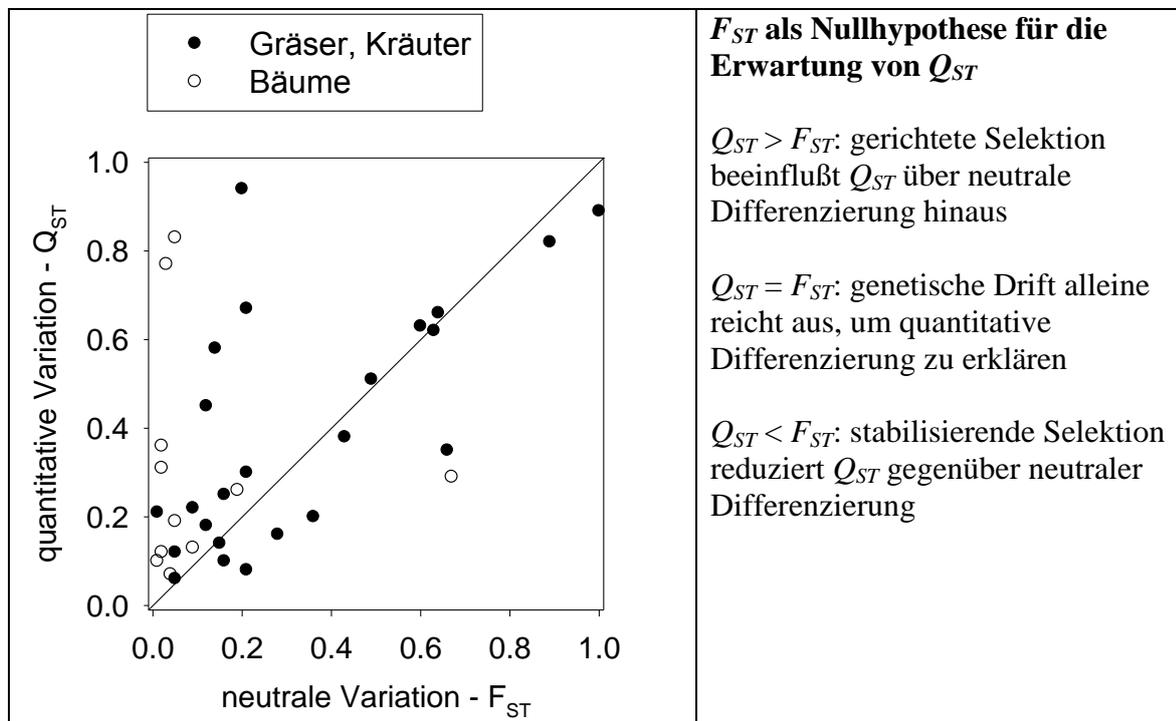


Abbildung 3.2 Zusammenhang zwischen quantitativ-genetischer Differenzierung zwischen natürlichen Populationen und neutral-genetischer Differenzierung für Bäume und Nicht-Bäume. Jeder Punkt stellt eine Art dar. Daten aus Leinonen *et al.* 2008.

3.2 Neutrale genetische Variation

Chromosomen-Variation

Genetische Variation innerhalb von Arten kann sich zunächst auf chromosomaler Ebene zeigen in Form von unterschiedlichen Cytotypen oder Ploidie-Stufen und anderen Chromosomen-Rassen. So sind von 552 Pflanzenarten (= 18.5%) Deutschlands verschiedene Chromosomenrassen bekannt (Durka 2002). Bei einer Auswahl von 60 wichtigen

Grünlandarten (**Tabelle 3.4**) haben 11 Arten zwei Cytotypen (18.3%). Allerdings ist in der Regel unbekannt, wie die Chromosomenrassen geographisch verteilt sind und wie häufig die unterschiedlichen Rassen sind. Ploidie-Unterschiede ziehen nichtgenetische und genetische Effekte nach sich, so dass zu erwarten ist, dass Chromosomenrassen auch physiologische und ökologische Unterschiede zeigen (Durka 2002). Exemplarische Untersuchungen am Weißen Straußgras (*Agrostis stolonifera*) zeigten allerdings, dass trotz großer Ploidie-Variation innerhalb und zwischen verschiedenen Habitaten und Populationen nur geringe Variation der Morphologie und anderer Lebensgeschichtlicher Merkmale zu beobachten war (Kik *et al.* 1992, 1993; Kik *et al.* 1990). Dennoch gilt zunächst, dass Chromosomenrassen innerhalb von Arten bei Managementplanungen mit berücksichtigt werden sollten (Severns & Liston 2008).

Pflanzliche Genome

Entsprechend dem Vorhandensein mehrerer Genome in Pflanzlichen Zellen und unterschiedlichen Vererbungsmechanismen ist bei der genetischen Variation zu unterscheiden zwischen dem **Kerngenom**, das biparental vererbt wird und der Rekombination unterliegt und dem wesentlich kleineren **Plastidengenom** (Chloroplast, Mitochondrium), das bei Angiospermen maternal vererbt wird und nicht rekombiniert (**Tabelle 3.1**). Das Kerngenom ist wesentlich variabler als Plastiden-DNA. Die häufig verwendeten neutralen molekularen Marker Mikrosatelliten und AFLP bilden das Gesamtgenom ab und damit quantitativ vor allem das Kerngenom. Insbesondere Chloroplasten-DNA (cpDNA) wird bei Pflanzen häufig verwendet, um die maternale Linie zu untersuchen, z.B. bei Phylogeographien.

Tabelle 3.1 Wichtige Unterschiede zwischen den Genomen und Markern für mitochondriale, chloroplasten und Kern-DNA (nach Nielsen & Kjær 2008).

Eigenschaften	Mitochondrium	Chloroplast	Zellkern
Genomgröße	klein	klein	groß
Ploidie-Stufe	haploid	haploid	diploid oder polyploid
Marker-Variabilität	niedrig	niedrig	hoch
Vererbung	maternal	maternal	bi-parental
Geographische Struktur	hoch	hoch	niedrig
Anzahl pro Zelle	viele	viele	zwei (bis viele)
Rekombination	nein	nein	ja

Maßzahlen der genetischen Diversität

Die wichtigsten quantitativen **Maßzahlen der neutralen genetischen Diversität** innerhalb von Populationen sind die Gendiversität, die äquivalent zur erwarteten Heterozygotie ist und mit H_e bezeichnet wird. Je nach Bezugspopulation kann ein Wert der genetischen Diversität innerhalb aller Subpopulationen, H_s , und die Diversität in der Gesamt-Population, H_T , angegeben werden.

Die genetische Differenzierung zwischen Populationen wird mit der sogenannten F -Statistik beschrieben (Wright 1951), die die mittlere Diversität der Subpopulationen zur Gesamtdiversität ins Verhältnis setzt: $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$. Dieser Fixierungs-Index liegt zwischen 0 und 1 und man bezeichnet Werte von 0 bis 0.05 als gering, von 0.05-0.15 als mäßig, von 0.15-0.25 als stark und von >0.25 als sehr starke Differenzierung (Wright 1978). Es gibt verschiedene Schätzer für den F_{ST} -Wert, z.B. die Parameter G_{ST} , F_{ST} , und Φ_{ST} .

Unter bestimmten Voraussetzungen kann aus dem Grad der genetischen Differenzierung auf die effektive historische Migrationsrate zwischen den Populationen abgeschätzt werden. $F_{ST} = 1 / (4N_e m + 1)$, wobei N_e die effektive Populationsgröße, m die Migrationsrate und $N_e m$ die effektive Zahl von Migranten pro Generation ist. Da die Voraussetzungen in der Natur selten gegeben sind, sind die entsprechenden Werte allerdings mit sehr großen Unsicherheiten behaftet (Whitlock & McCauley 1999).

Faktoren die zur genetischen Differenzierung zwischen Populationen führen sind genetische Drift, also die zufällige Veränderung von Allelfrequenzen, die sich vor allem in kleinen Populationen auswirkt. Der Differenzierung entgegen wirkt der Genfluss durch Einwanderung von Samen oder dem Eintrag von Pollen. In einem Versuch, einfache Regeln für das Populationsmanagement aufzustellen hat man versucht, aus der populationsgenetischen Theorie über den Zusammenhang von genetischer Differenzierung und Migration die Zahl der pro Generation nötigen Einwanderer zu berechnen. Wie viele Einwanderer werden benötigt, um Differenzierung aufgrund von Drift zu verhindern? Es wurde die sogenannte "**one migrant per generation**" –Regel aufgestellt (Spieth 1974) die besagt, dass ein Migrant pro Generation den Verlust bzw. die Fixierung von Allelen verhindert, wenn man einen maximal tolerierbaren F_{ST} -Wert = 0.2 annimmt. Allerdings beruht diese Regel auf einer Reihe von unrealistischen Annahmen, die die Migration überschätzen (Insel-Modell, keine Selektion, ideale Population, demographisches Gleichgewicht). Deshalb wurde eine veränderte Regel vorgeschlagen: Minimal 1 Migrant und maximal 10 Migranten pro Generation verhindern den Verlust bzw. die Fixierung von Allelen (Mills & Allendorf 1996). Damit gilt als Faustregel: **0.022** < F_{ST} < **0.2** als tolerierbare Differenzierung. Viele der untersuchten Pflanzenarten liegen mit ihren empirisch erhobenen F_{ST} -Werten genau in diesem Bereich, oft auch darüber, so dass grundsätzlich mit signifikanter Differenzierung zwischen Population zu rechnen ist.

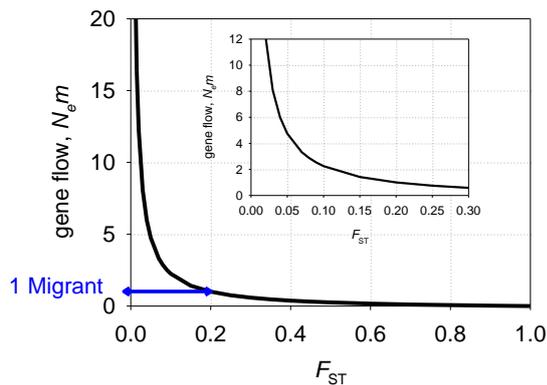


Abbildung 3.3 Die Beziehung zwischen Genfluss und genetischer Differenzierung unter der Annahme eines Inselmodells. Ein Migrant pro Generation reicht aus, um die Differenzierung auf $F_{ST} = 0.2$ zu begrenzen.

3.2.1 Genetische Diversität und Merkmale der Lebensgeschichte

Die genetische Diversität in Pflanzenpopulationen wurde schon an vielen Arten untersucht, so dass es möglich ist, nach generellen Zusammenhängen zwischen den Parametern der genetischen Vielfalt und Merkmalen der Lebensgeschichte von Pflanzen zu suchen.

Die genetische Diversität in Pflanzenpopulationen (Tabelle 3.2, Tabelle 3.3, H_e , H_s , H_{pop}) ist nur wenig von der Lebensdauer abhängig, da annuelle und kurzlebige Arten sich nicht unterscheiden. Lediglich langlebige Arten (Bäume) zeigen höhere Diversität als die übrigen Arten. Bezogen auf die geographische Verbreitung ist eine Tendenz festzustellen, dass die Diversität positiv mit der Größe des Gesamtareals korreliert ist, da einerseits bei den Allozym-Studien weitverbreitete Arten erhöhte Werte zeigen und bei den Mikrosatelliten-Studien endemische Arten reduzierte Werte aufweisen. Das Befruchtungssystem hat einen starken Einfluss auf die Diversität auf Populationsebene. Selbstbestäubte Arten haben bei allen Methoden die geringste Diversität, während entweder die gemischt-bestäubten (Allozyme) oder die streng auskreuzenden Arten (RAPD) die höchsten Werte zeigen. Eine Ursache für reduzierte Diversität der Selbstbestäuber ist einerseits die genetische Drift, die zum Verlust von Allelen führt und andererseits der geringe Genfluss zwischen Populationen, so dass neue Mutationen nur sehr eingeschränkt ausgebreitet werden. Die Samenausbreitung hat einen gewissen Einfluss auf die Diversität, da Arten ohne spezielle Ausbreitungsmechanismen die geringere Diversität aufweisen als Arten, die von Tieren oder durch Wind ausgebreitet werden. Das Sukzessions-Stadium hat einen gewissen Einfluss, da meist frühe Stadien (Ruderal-Arten, Annuelle) geringere Diversität aufweisen als spätere Stadien (Graslandarten, Waldarten). Interessanterweise ist es bei den Gräsern nicht so, da hier die frühen Stadien höhere Diversität zeigen als spätere. Dies wird allerdings dadurch erklärt,

dass diese Kategorie durch die Getreide-Arten stark beeinflusst wird, die aufgrund von Züchtung hoch divers sind (Godt & Hamrick 1998).

Die genetische Differenzierung, also der Anteil der Diversität zwischen den Populationen (Tabelle 3.2, Tabelle 3.3, Φ_{ST} , F_{ST} , G_{ST}) zeigt große Unterschiede bezogen auf die Lebensdauer. Annuelle Arten sind am stärksten differenziert und haben je nach Methode zwischen 30% und 60% ihrer genetischen Variabilität zwischen den Populationen verteilt. Bei mehrjährig-kurzlebigen Arten ist die Differenzierung geringer und liegt zwischen 23% und 40%. Die geringsten Werte zeigen mehrjährig-langlebige (Bäume) die nur zwischen 8% und 25% der Variabilität zwischen Populationen aufweisen. Die geographische Verbreitung hatte nur bei den Allozym-Untersuchungen, aber nicht bei RAPD und Mikrosatelliten einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung. A priori wird für weitverbreitete Arten eine stärkere Differenzierung erwartet, diese zeigte sich allerdings nicht bei den Gräsern. Dies wird wiederum dadurch erklärt, dass viele der weitverbreiteten Gräser Nutzpflanzen sind, und so durch menschlichen Transport eine Homogenisierung der Genpools erfolgte. Wiederum den stärksten Effekt auf die genetische Differenzierung hat das Befruchtungssystem. Selbstbestäubte Arten haben 40% bis 60% ihrer Diversität zwischen Populationen, während gemischt bzw. fremdbestäubte je nach Methode nur Werte zwischen 10% und 22% aufweisen. Windbestäubte Arten zeigten jeweils geringe Differenzierung als tierbestäubte, was zeigt, dass Windbestäubung einen höheren Genfluss zwischen Populationen gewährleistet als Tierbestäubung. Die Samenausbreitung hat nur einen geringen Einfluss auf die genetische Differenzierung und konnte nur aus den Mikrosatelliten-Studien belegt werden. Arten ohne spezielle Samen-Ausbreitungsmechanismen zeigen die stärkste Differenzierung. Das Sukzessionsstadium zeigt ebenfalls einen gewissen Einfluss, da Arten früher Stadien stärker differenziert sind als spätere. Dies dürfte im Wesentlichen dadurch bedingt sein, dass frühe Sukzessionsstadien stärkeren Populationsgrößenveränderungen einschließlich des Aussterbens von Populationen unterliegen. Populationsneugründungen verbunden mit demographischen und genetischen Flaschenhälsen führen zu stärkerer Differenzierung.

Da Pflanzenpopulationen in der Regel räumlich gegliedert sind und aus getrennten Populationen bestehen, ist eine Grundfrage, wie hoch die genetische Vielfalt innerhalb einer Art ist, und wie diese auf die einzelnen Populationen (Subpopulationen) verteilt ist. Hier zeigt sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Diversität innerhalb von Populationen (H_e) und der Diversität zwischen Populationen (F_{ST}) (Abbildung 3.4). Je geringer die mittlere Diversität in Populationen ist, desto größer ist in der Regel deren genetische Differenzierung; umgekehrt ist bei genetisch sehr diversen Populationen zu erwarten, dass Populationen nur relativ geringe Unterschiede aufweisen.

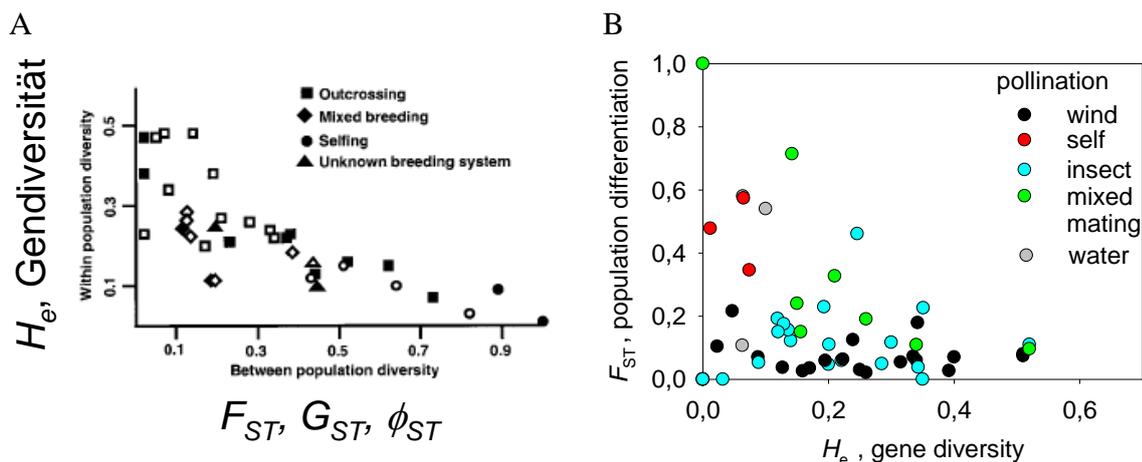


Abbildung 3.4. **A**. Zusammenhang zwischen genetischer Diversität in Populationen (H_e) und zwischen Populationen (F_{ST} , G_{ST} (offene Symbole) und Φ_{ST} (volle Symbole)). Jeder Punkt repräsentiert eine Pflanzenart. Aus Nybom & Bartish 2000. **B** Derselbe Zusammenhang von Pflanzenarten, deren Allozym-Diversität untersucht wurde, aus diversen Quellen.

Tabelle 3.2. Der Einfluss von Lebensform, geographischer Verbreitung, Befruchtungssystem, Samenausbreitung und Sukzessionsstatus auf die Allozym-Diversität innerhalb von Populationen (H_e) und zwischen Populationen (G_{ST}). Daten für alle Pflanzenarten aus Hamrick & Godt 1990, für Gräser (Poaceae) aus Godt & Hamrick 1998. N : Anzahl untersuchter Arten. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: nicht signifikant.

Kategorien	Alle Arten			Gräser (Poaceae)		
	N	H_e	G_{ST}	N	H_e	G_{ST}
Lebensform		***	***		ns	ns
Annuell	146	0.20	0.36	80	0.147	.290
Mehrjährig-kurzlebig	119	0.22	0.23	56	0.125	.252
Mehrjährig-langlebig (Bäume)	131	0.27	0.08			
Geographische Verbreitung					**	***
endemisch				23	0.122a	.231a
regional				53	0.104a	.398b
weitverbreitet				59	0.174b	.190a
Befruchtungssystem		***	***		***	***
Selbstbefruchtung	78	0.15	0.51	80	0.109a	.415a
Gemischt-Tier	60	0.22	0.22			
Gemischt-Wind	11	0.34	0.10	9	0.218b	.156b
Fremdbestäubung-Tier	124	0.24	0.20			
Fremdbestäubung-Wind	134	0.26	0.10	47	0.175b	.112b
Samenausbreitung		***	***		*	ns
Schwerkraft	161	.21	.28	67	0.117a	.315
Klett	52	.24	.26	66	0.160b	.239
Endozoochor	39	.31	.22			
Wind/Wasser	121	.24	.14	3	0.131	
Sukzession					**	ns
früh				115	0.150a	.275
mittel				21	0.066b	.264

Tabelle 3.3. Der Einfluss von Lebensform, geographischer Verbreitung, Befruchtungssystem, Samenausbreitung und Sukzessionsstatus auf die genetische Diversität innerhalb von Populationen (H_{pop} , H_e) und auf die genetische Diversität zwischen Populationen (Φ_{ST} , F_{ST}) basierend auf RAPD- und Mikrosatelliten-Analysen (aus Nybom 2004). N : Anzahl untersuchter Arten. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: nicht signifikant.

Kategorien	RAPD			SSR		
	N	H_{pop}	Φ_{ST}	N	H_e	F_{ST}
Lebensform		*	*		***	*
Annuell	6	.13a	.62a	15	.46a	.40a
Mehrjährig-kurzlebig	17	.20ab	.41b	29	.55a	.31ab
Mehrjährig-langlebig	37	.25b	.25c	59	.68b	.19b
Geographische Verbreitung		ns	ns		*	ns
endemisch	7	.20	.26	7	.42a	.26
klein	8	.28	.34	16	.56ab	.23
regional	25	.21	.42	41	.65b	.28
weitverbreitet	20	.22	.34	31	.62b	.25
Befruchtungssystem		***	***		***	*
Selbstbefruchtung	10	.12a	.65a	15	.41a	.42a
Gemischt	8	.18a	.40b	15	.60b	.26ab
Fremdbestäubung	38	.27b	.27c	71	.65b	.22b
Samenausbreitung		ns	ns		***	*
Schwerkraft	24	.19	.45a	29	.47a	.34a
Klett	3	.16	.46ab	8	.56ab	.33ab
Endozoochor	22	.24	.27b	29	.73c	.21ab
Wind/Wasser	7	.27	.25b	28	.61b	.13b
Sukzession		**	**		***	*
früh	15	.17a	.37a	24	.46a	.38a
mittel	28	.21a	.39a	40	.63b	.22b
spät	16	.30b	.23b	34	.70b	.17b

Wie der Vergleich der Merkmale und der genetischen Diversitätsparameter gezeigt hat, sind die wichtigsten direkten Parameter, die sich auf die Weitergabe genetischer Information innerhalb und zwischen Populationen auswirken (Genfluss) das **Bestäubungs- und Befruchtungssystem** und die Art der **Samenausbreitung**. Dementsprechend zeigen Arten mit unterschiedlichem Pollen-Vektor oder Bestäubungssystem unterschiedliche Verteilung der genetischen Diversität innerhalb und zwischen den Populationen (Abbildung 3.4).

Die Genome der Plastiden, also Chloroplasten und Mitochondrien werden in der Regel nur uniparental vererbt, rekombinieren nicht, und unterliegen stärkeren Selektionsfaktoren. Deshalb zeigen sie verringerte Variabilität als das Kerngenom und in der Regel auch großräumigere und klarer abgegrenzte Muster der genetischen Differenzierung, z.B. der bei

phylogeographischen Analysen. Der Vergleich der genetischen Differenzierung von Kern- und Plastidengenom zwischen Populationen (**Abbildung 3.5**) zeigt, dass 1. die Differenzierung der Plastidengenome unabhängig von der des Kerngenoms ist; 2. dass beim Plastidengenom häufig extrem starke Differenzierung ($F_{ST} > 0.5$) vorliegt, die vor allem durch Fixierung einzelner Populationen zu erklären ist; 3. dass Kräuter und Zwergsträucher sich beim Plastidengenom nicht grundsätzlich vom Muster der Bäume unterscheiden, dass sie aber beim Kerngenom oft stärker differenziert sind als Bäume.

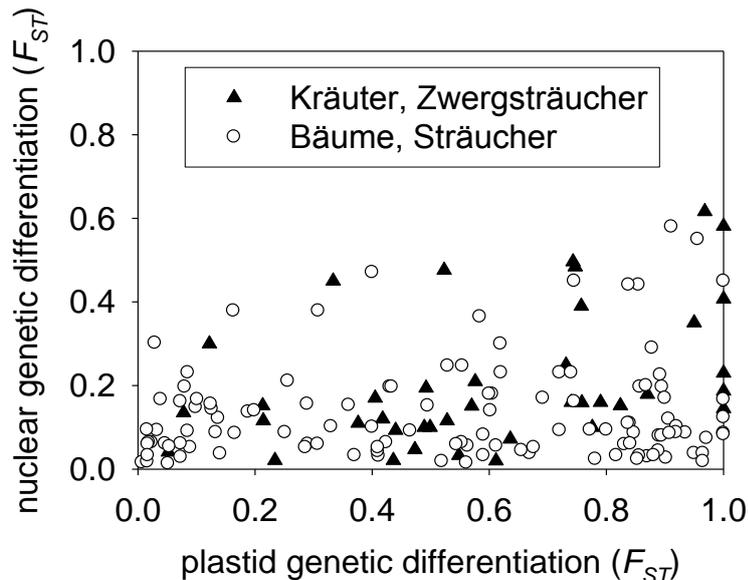


Abbildung 3.5. Zusammenhang zwischen der genetischen Differenzierung von Kern-Genom und Organell-Genom von krautigen/Zwergsträuchern im Vergleich mit Bäumen (Daten von 40 Kraut- und Zwergstraucharten und 118 Strauch- und Baumarten aus Petit *et al.* 2005). Kräuter und Zwergsträucher sind nicht weniger genetisch differenziert als Bäume, sie tendieren eher zu stärkerer Differenzierung des Kerngenoms.

3.2.2 Ökologisch-Genetische Charakterisierung wichtiger Grünlandarten

Um spezifischere Aussagen über die bei Grünland-Arten zu erwartenden Muster der genetischen Diversität machen zu können, werden sie zunächst anhand einer Liste von 60 häufigen und oft für Ansaaten verwendeten Arten charakterisiert (Tabelle 3.4). Die meisten Arten (85%) sind mehrjährig und nur wenige sind einjährig (3%), zweijährig (7%) oder hapaxanth (5%). Das Bestäubungssystem der meisten Arten ist obligate Fremdbefruchtung (56%), z.B. aufgrund von Selbstinkompatibilität, und fakultative Fremdbefruchtung (28%). Relativ selten sind dagegen gemischte Befruchtung (13%) oder fakultative Selbstbefruchtung (4%).

Hieraus kann die Erwartung abgeleitet werden, dass in der Regel eine hohe genetische Vielfalt in den Populationen vorliegt und diese nur mäßige genetisch voneinander

differenziert ist. Dabei ist zu erwarten, dass die Differenzierung zwischen Regionen bzw. Populationen bei Kräutern stärker ist als bei Gräsern. Viele der Arten sind weit verbreitet und weisen oft eine breite ökologische Amplitude auf, so dass davon auszugehen ist, dass sie geographisch differenziert sind und Anpassungen an verschiedene Umweltbedingungen aufweisen. Bei wenigen kurzlebigen Arten mit höherem Anteil an Selbstbestäubung ist von vornherein mit stärkerer Populationsdifferenzierung zu rechnen. Bei selbstbestäubenden Arten ist Inzuchtdepression und Genfluss zwischen lokal angepassten Populationen wenig wahrscheinlich. Dagegen ist es wahrscheinlicher, dass die Populationen differenziert sind und wenig genetische Variation für zukünftige Anpassung und Evolution aufweisen. Im Gegensatz dazu ist bei stark auskreuzenden Arten weniger mit kleinräumig lokaler Anpassung zu rechnen, wohingegen Inzuchtdepression und eine Rolle spielen können.

Tabelle 3.4 Sechzig weitverbreitete Arten des Grünlandes und deren wichtige Merkmale: Chromosomenzahl, Ploidie (d=diploid, p=polyploid), Lebensdauer, Vorkommen in Klimazonen und Biotoptypen, Selbstkompatibilität (SC=selbstkompatibel, SI=selbstinkompatibel), Befruchtungssystem (AO=obligat selbstbefruchtend, AF=fakultativ selbstbefruchtend, XF=fakultativ fremdbefruchtend, X = obligat fremdbefruchtend), Apomixis (Daten aus BIOLFLOR, Klotz *et al.* 2002) und publizierte Mikrosatellitenmarker.

Kräuter	Chromosomenzahl	Ploidie	Lebensdauer	Anzahl Florenzonen	Anzahl Biotop-typen	Kom-patibi-lität	Befruch-tungs-system	Apo-mixis	Mikro-satelliten-Marker *
<i>Achillea millefolium</i>	54	p	ausdauernd	4	12	SI	X		
<i>Agrimonia eupatoria</i>	28	p	ausdauernd	3	3	SC	AF		
<i>Anthemis tinctoria</i>	18	d	ausdauernd	4	4				
<i>Anthyllis vulneraria</i>	12	d	ausdauernd	2	9	SC	X		1
<i>Campanula patula</i>	20/40	dp	zweijährig	3	1	SI	X		
<i>Campanula rotundifolia</i>	68/102	p	ausdauernd	2	8	SI	X		2
<i>Carum carvi</i>	20	d	zweijährig	4	1	SC	XF		
<i>Centaurea cyanus</i>	24	p	einjährig	4	2			selten	
<i>Centaurea jacea</i>	22/44	p	ausdauernd	3	6	SI	X	selten	
<i>Centaurea scabiosa</i>	20/40	dp	ausdauernd	4	10	SI	X		
<i>Cichorium intybus</i>	18	d	ausdauernd	4	6	SC	X		3
<i>Crepis biennis</i>	40	p	zweijährig	3	2				
<i>Daucus carota</i>	18	d	hapaxanth	4	6	SC	XF		4
<i>Dianthus carthusianorum</i>	30	p	ausdauernd	2	2	SC	XF		5
<i>Dianthus deltoides</i>	30	p	ausdauernd	3	2	SC	XF		5
<i>Echium vulgare</i>	32	p	hapaxanth	3	6	SC	XF		6
<i>Galium album</i>	44	p	ausdauernd	4	6		AFXF		
<i>Galium verum</i>	22/44	p	ausdauernd	4	4			fakul-tativ	
<i>Hypericum perforatum</i>	18/32	dp	ausdauernd	4	11	SC	AFXF		7
<i>Hypochaeris radicata</i>	8	d	ausdauernd	3	4	SI	X		8
<i>Knautia arvensis</i>	20/40	dp	ausdauernd	4	3	SC	XF		
<i>Lathyrus pratensis</i>	14	d	ausdauernd	4	7	SC	XF		

Kräuter	Chromosomenzahl	Ploidie	Lebensdauer	Anzahl Florenzonen	Anzahl Biotop-typen	Kompatibilität	Befruchtungssystem	Apo-mixis	Mikro-satelliten-Marker *
<i>Leontodon autumnalis</i>	12	d	ausdauernd	4	5	SI	X		
<i>Leontodon hispidus</i>	14	d	ausdauernd	3	8	SI	X		
<i>Leucanthemum ircutianum</i>	36	p	ausdauernd	3	2	SC	AFXF		
<i>Lotus corniculatus</i>	24	p	ausdauernd	4	9	SC	X		
<i>Malva moschata</i>	42	p	ausdauernd	3	2	SC	XF		
<i>Medicago lupulina</i>	16	d	ausdauernd	3	7	SC	AF		
<i>Onobrychis viciifolia</i>	28	p	ausdauernd	2	2	SI	X		
<i>Origanum vulgare</i>	30	p	ausdauernd	3	7	SC	XF		9
<i>Papaver rhoeas</i>	14	d	einjährig	3	2	SI	X		
<i>Pastinaca sativa</i>	22	p	zweijährig	3	5	SC	AFXF		
<i>Pimpinella major</i>	20	d	ausdauernd	3	3	SC	XF		
<i>Pimpinella saxifraga</i>	36/40	p	ausdauernd	4	2	SC	XF		
<i>Plantago lanceolata</i>	12	d	ausdauernd	4	3	SI	X		10
<i>Plantago media</i>	24	p	ausdauernd	3	4	SI	X		11
<i>Prunella vulgaris</i>	28	p	ausdauernd	4	3	SC	X		
<i>Ranunculus acris</i>	14/16	d	ausdauernd	5	5	SI	X	selten	12
<i>Rumex acetosa</i>	14/15	d	ausdauernd	5	1		X		
<i>Salvia pratensis</i>	18	d	ausdauernd	2	5	SC	XF		
<i>Sanguisorba minor</i>	28	p	ausdauernd	3	5		X		
<i>Sanguisorba officinalis</i>	28/56	p	ausdauernd	4	2				
<i>Silene dioica</i>	24	p	ausdauernd	3	3	SC	X		
<i>Lychnis flos-cuculi</i>	24	p	ausdauernd	3	2	SC	XF		13
<i>Thymus pulegioides</i>	28	p	ausdauernd	2	7	SC	XF		14
<i>Tragopogon pratensis</i>	12	d	hapaxanth	3	2	SC	AFXF		
<i>Trifolium pratense</i>	14	d	ausdauernd	4	9	SI	X		15
Gräser:									
<i>Agrostis capillaris</i>	28	p	ausdauernd	3	5	SI	X		
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	20	p	ausdauernd	4	4	SC	XF		
<i>Arrhenatherum elatius</i>	28	p	ausdauernd	3	7	SI	X		
<i>Cynosurus cristatus</i>	14	d	ausdauernd	2	2	SI	X		
<i>Briza media</i>	14	d	ausdauernd	2	3	SI	X		
<i>Bromus erectus</i>	56	p	ausdauernd	3	4	SI	X		
<i>Festuca guestfalica</i>	28	p	ausdauernd	2	10	SI	X		
<i>Festuca nigrescens</i>	42	p	ausdauernd	2	6	SI	X		
<i>Festuca pratensis</i>	14	d	ausdauernd	4	3	SI	X		16
<i>Poa angustifolia</i>	54/72	p	ausdauernd	4	1	SC	AFXF		
<i>Poa pratensis</i>	42	p	ausdauernd	4	1	SC	AFXF	fakul-tativ	
<i>Trisetum flavescens</i>	24	p	ausdauernd	3	3	SI	X		

* Mikrosatelliten-Marker: 1: Van Glabeke *et al.* 2007, 2: Aegisdottir *et al.* 2000 (*C. thyrsoides*), 3: Gemeinholzer & Bachmann 2005, 4: Hyman *et al.* 2004, 5: Smulders *et al.* 2000, 6: Korbecka *et al.* 2003, 7: Sharbel *et al.* 2006, 8: Mix *et al.* 2004, 9: Novak *et al.* 2008, 10: Hale & Wolff 2003, 11: Squirrell & Wolff 2001, 12: Noel *et al.* 2005 (*R. flammula*), 13: Galeuchet *et al.* 2002, 14: Landergott *et al.* 2006 (*T. praecox*), 15: Kölliker *et al.* 2006, 16: Studer *et al.* 2006

3.2.3 Biogeographische Muster in Europa

Die Pflanzenwelt Mitteleuropas ist historisch stark geprägt durch die nacheiszeitliche Wiederbesiedlung der durch die Eiszeiten weitgehend vegetationslosen Regionen. Soweit bekannt, erfolgte die Wiederbesiedlung aus den glazialen Refugien in Südeuropa (Abbildung 3.6A): Iberische Halbinsel (R1), Apennin-Halbinsel (R2), Balkan (R3) und weiter östlich gelegene Refugien. Durch die lange andauernde Trennung und Isolation dieser Refugialgebiete kam es zu einer genetischen Differenzierung der Refugialpopulationen. Inwieweit Pflanzen-Populationen in Mittel- und Nordeuropa in unvereisten Gebieten innerhalb der geschlossenen Eisdecke (Nunataks) oder im Periglazialgebiet überdauert haben, ist unklar. Da dies aber für eine Reihe von alpinen Sippen gezeigt wurde, muss auch im Mitteleuropäischen Flachland mit solchen Phänomenen gerechnet werden.

Die postglazialen Besiedlungswege lassen sich aus den phylogeographischen Mustern ableiten. Sie sind artspezifisch, dennoch lassen sich vereinfacht einige Syndrome verallgemeinern (Abbildung 3.6B). Ein westlicher Ausbreitungspfad ausgehend von der Iberischen Halbinsel konnte über Frankreich und Mitteleuropa bis nach Skandinavien, aber auch bis nach Osteuropa reichen. Ein östlicher Ausbreitungspfad ausgehend vom Balkan verlief nach Norden und Westen über Mitteleuropa bis zu den Pyrenäen. Ein zweiter, möglicherweise unabhängiger östlicher Pfad aus weiter nordöstlich gelegenen Regionen führte von Osten über die skandinavische Halbinsel. Der Pfad von der Apennin-Halbinsel konnte westlich um die Alpen ebenfalls nach Mitteleuropa führen. Die Gebirge der Pyrenäen und Alpen behinderten teilweise die Ausbreitung, so dass sich heute hier verschiedene Ausbreitungslinien treffen und relativ scharfe Grenzen stark differenzierter innerartlicher Gruppen ausgebildet haben. Aber auch im weniger stark strukturierten Mitteleuropa wurde für einige Arten das Zusammentreffen von westlichen und östlichen Ausbreitungslinien festgestellt, was, wegen seiner zentralen Lage, häufig im Gebiet Deutschlands auftritt.

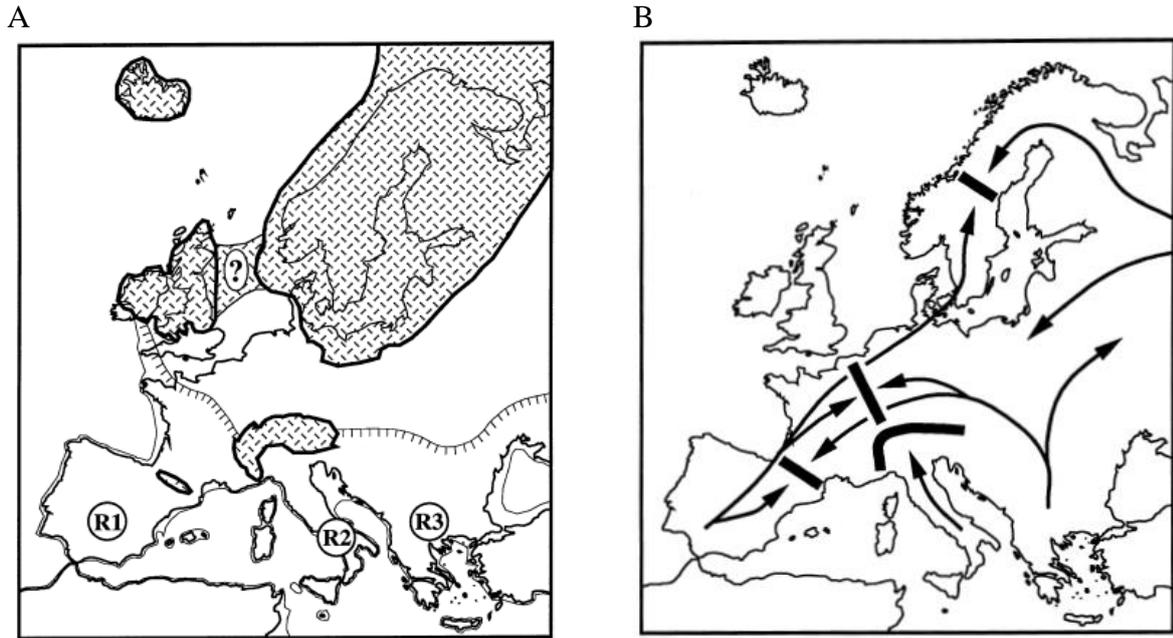


Abbildung 3.6 **A.** Maximale Ausdehnung der letzten Vereisung (18.000-20.000 ybp) und Hauptrefugien (R1-R3). **B.** Hauptwege der postglazialen Wiederbesiedlung und Nahtzonen durch Zusammentreffen verschiedener refugialer Linien (aus Taberlet *et al.* 1998).

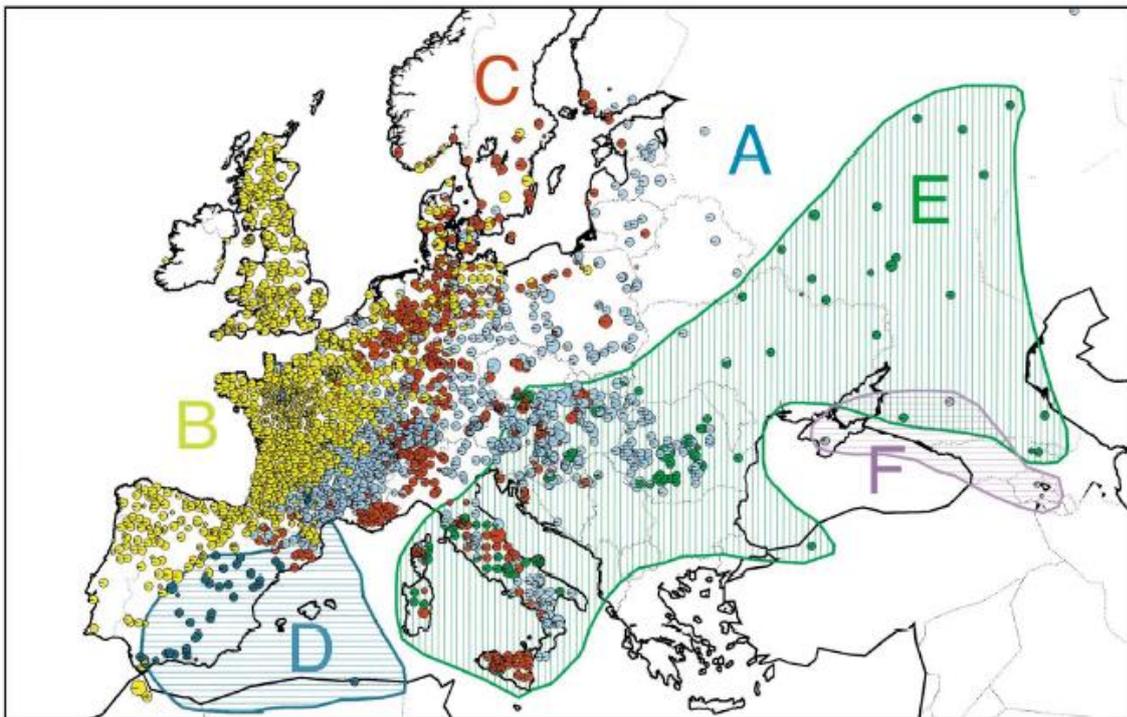


Abbildung 3.7. Verteilung von Chloroplasten-Haplotypen europäischer Eichen-Arten (*Q. robur*, *petraea*, *pubescens*, etc). Die Eichen besitzen durch gelegentliche Hybridisierung einen im wesentlichen gemeinsamen Chloroplasten-Genpool (aus Petit *et al.* 2002). Die Genpools A, B und C sind in den drei genannten Arten vertreten.

Von der mitteleuropäischen Flora am besten phylogeographisch untersucht sind die zahlenmäßig überschaubaren Baumarten, insbesondere die forstlichen Hauptbaumarten (Demesure *et al.* 1996; Dumolin-Lapegue *et al.* 1997; Grivet & Petit 2002, 2003; Hampe *et al.* 2003; Vendramin *et al.* 2000).

Das Beispiel der an Hand von cpDNA untersuchten mitteleuropäischen Eichenarten (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*), zeigt, wie sich auf dem Gebiet Deutschlands verschiedene refugiale Linien ausbreiteten und zu komplexen Mustern innerhalb von Deutschland führten (Abbildung 3.7, Petit *et al.* 2002). Die drei relevanten refugialen Linien bilden teilweise gebietsweise relativ reine Vorkommen (Sachsen, Südbayern), andererseits gibt es Gebiete mit starker Durchmischung (Nordost-Deutschland, westliche Mittelgebirgsregion). Der Vergleich mit den einfach strukturierten Verteilungen in Großbritannien und Frankreich macht klar, wie komplex die Situation durch das Zusammentreffen verschiedener refugialer Linien in Mitteleuropa ist.

Für Arten des mitteleuropäischen Gründlandes existiert nur eine geringe Zahl von Studien, aus denen phylogeographische Gliederungen und räumliche genetische Gruppen für das Gebiet von Deutschland abgeleitet werden können. Einige Arten zeigen das typische Muster von wenigen genetischen Linien mit relativ deutlicher geographischer Gliederung.

Das Gemeine Ruchgras (*Anthoxanthum odoratum*) wurde mit europäischer Skala RAPD charakterisiert (Pimentel *et al.* 2007). Dabei zeigten sich zwei genetische Gruppen: eine westliche, die aus Populationen der iberischen Halbinsel, und Südskandinaviens bestand; und eine östliche mit Populationen der Alpen, der Sudeten und aus Nord-Skandinavien. Populationen aus Deutschland wurden nicht untersucht, allerdings ist deutlich dass sich im Gebiet die beiden Linien treffen bzw überlappen.

Der Wiesen-Schwingel (*Festuca pratensis*) wurde in seinem gesamten Areal auf Chloroplasten-Polymorphismen untersucht (Abbildung 3.8, Fjellheim *et al.* 2006). Es zeigte sich zunächst nur eine geringe genetische Diversität, da nur drei Haplotypen gefunden wurden, von denen nur 2 eine größere Ausbreitung erfahren haben. Der westliche Haplotyp, dessen glaziales Refugien auf der iberischen Halbinsel war, hat sich über Mitteleuropa bis Nordskandinavien ausgebreitet. Der östliche Haplotyp, dessen glaziales Refugium nicht identifiziert werden konnte, tritt in den Alpen, dem Balkan, Ost-Europa bis nach Skandinavien auf. Möglicherweise anthropogen verschleppt tritt er auch auf den Britischen Inseln auf. Beide Haplotypen treffen in Mitteleuropa aufeinander, in Deutschland treten beide Typen auf. Wo genau die Grenze zwischen beiden verläuft, ist aufgrund geringer Probendichte unklar.

Die Studie mit der derzeit besten Datengrundlage bezogen auf das Gebiet Deutschlands ist die Untersuchung der Phylogeographie der Roten Lichtnelke (*Silene dioica*) an Hand von cpDNA Polymorphismen von Prentice *et al.* 2008. Die Art stellte sich als sehr divers heraus mit 4 weit verbreiteten Haplotypen, die sich von Norden, Osten, Südwesten und Südosten ausbreiteten. Sie zeigen jeweils ein charakteristisches Verbreitungsbild und bilden in Mitteleuropa weite Überlappungsbereiche (Abbildung 3.9). Überlagert man die Verbreitungsgebiete, so ergeben sich in Deutschland drei breite Zonen von SW nach NO mit einer zunehmenden Zahl von Haplotypen.

Für andere Arten sind wieder genetisch diverse Populationen typisch ohne starke Differenzierung zwischen Refugialgebieten, so dass auch wiederbesiedelte Gebiete genetisch divers sind.

Ein Beispiel einer solchen Verteilung der Diversität zeigt die Frühlings-Kuhschelle (*Pulsatilla vernalis*, Ronikier *et al.* 2008). Hier treten sowohl in den südlichen Refugialgebieten als auch verschiedenen nördlichen Teilarealen mehrere cpDNA-Haplotypen in kleinräumigem Mosaik auf. Dies wird so erklärt, dass die in den Refugien erhaltene Diversität in mehreren unabhängigen Schritten postglazial nach Norden gewandert ist und dort lokal differenzierte Gebiete besiedelte.

Ähnlich beim Heidekraut (*Calluna vulgaris*), das eine große cpDNA-Vielfalt sowohl in südlichen wie nördlichen Populationen zeigt (Rendell & Ennos 2002). Zwar können Refugien in Süd-Frankreich/Spanien nachgewiesen werden, aber auch ein nördliches Refugium wird gefordert. Viele Populationen sind genetisch divers und die Differenzierung zwischen den Populationen ist stark ($G_{ST} = 0.43$), aber es lassen sich keine Gebiete abgrenzen. Möglicherweise gab es mehrere nördliche Refugien im Periglazialgebiet, so dass eine schnelle Wiederbesiedlung und Durchmischung verschiedener Typen erfolgte.

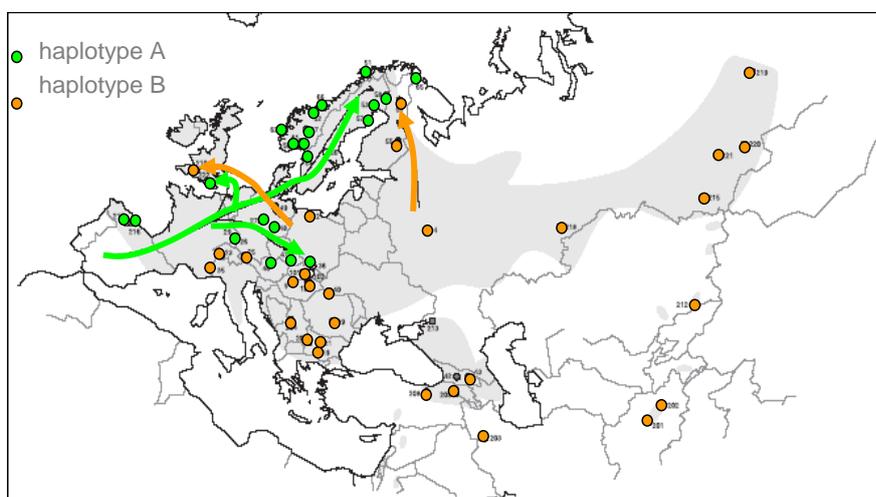


Abbildung 3.8 Phylogeographische Struktur des Wiesen-Schwingels (*Festuca pratensis*), bei dem nur zwei genetische Linien gefunden wurden (Fjellheim *et al.* 2006).

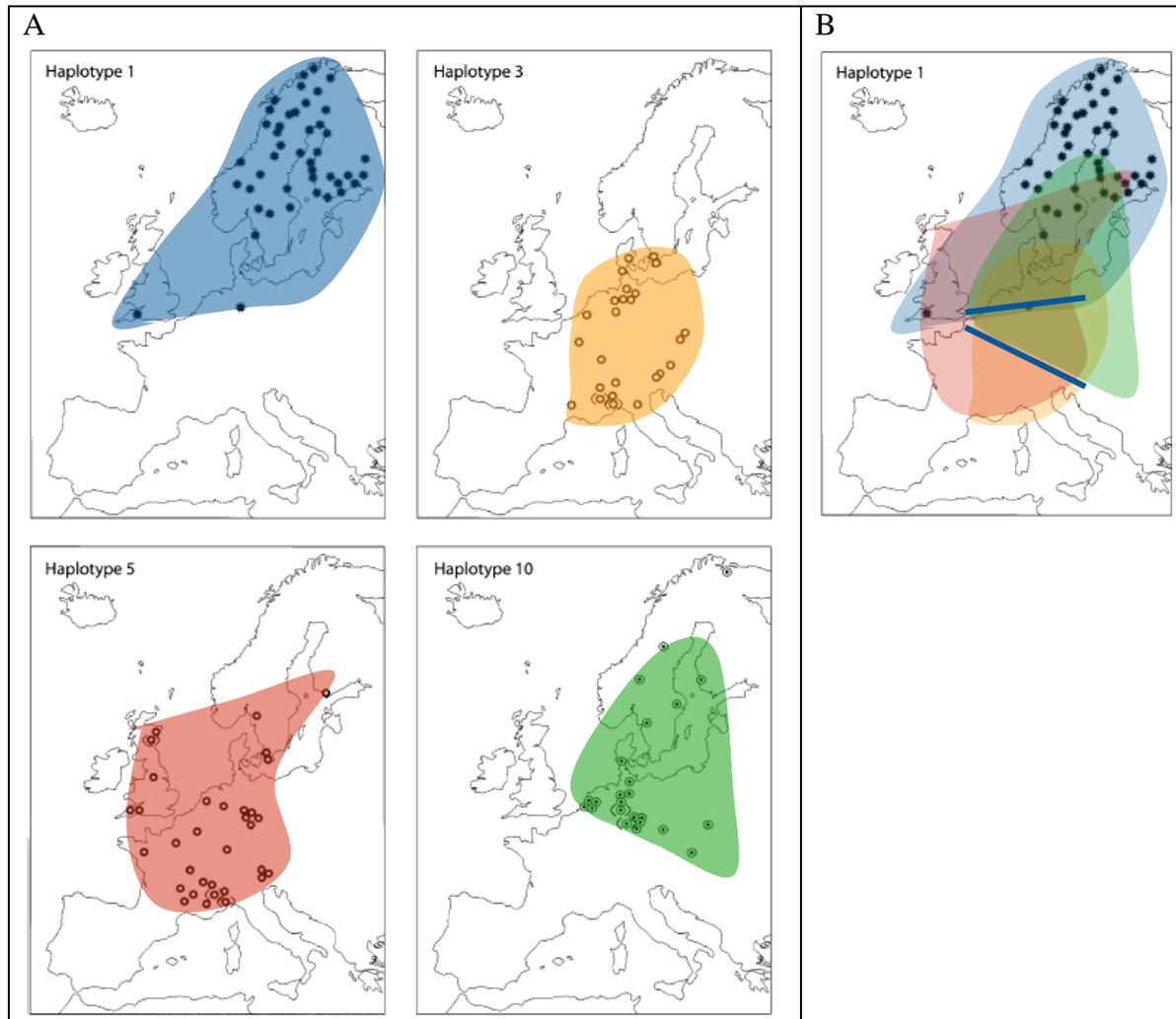


Abbildung 3.9 **A.** Verbreitung von vier cpDNA-Haplotypen der Roten Lichtnelke (*Silene dioica*) und mögliche Einwanderungswege. **B.** Überlagerung der Haplotypenverteilungen. Nach Prentice *et al.* 2008.

Fazit der phylogeographischen Arbeiten für die Gebietsabgrenzung von Regioaatgut

Aufgrund seiner zentralen Lage in Mitteleuropa liegt Deutschland im Bereich aller von den glazialen Refugien ausgehenden und grundsätzlich Nordwärts gerichteten Wiederbesiedlungsrouten. Dabei ist es möglich, dass sich während der Einwanderung genetische Gradienten entwickelt haben. Bei Arten, die mehrere glaziale Refugien aufweisen, ist damit zu rechnen, dass mehrerer Typen eingewandert sind. Nahtzonen zwischen verschiedenen Linien sind bevorzugt in Deutschland zu erwarten, z.B. parallel zum Nordrand der Alpen und weiterhin grundsätzlich N-S verlaufend zwischen westlichen und östlichen Besiedlungswegen. Die Existenz und die genaue Lage solcher Nahtzonen sind nicht vorhersagbar, zudem artspezifisch. Die bisher gezeigten phylogeographischen Strukturen legen nahe, das Gebiet von Deutschland sowohl in E-W wie in N-S-Richtung in mehrere Teile zu gliedern, wenn Herkunftsregionen die natürlichen Wiederbesiedlungseinheiten teilweise wiedergeben sollen.

3.2.4 Genetische Variation und Räumliche Skalen

Auch ohne kategoriale Gebietsunterteilung durch Einwanderung von genetisch alternativ fixierten Linien kommt es durch die Effekte von Genfluss und Gendrift zwischen Populationen zur entfernungsabhängigen genetischen Differenzierung. Unter Modelbedingungen entwickelt sich die so genannte „isolation by distance“ Beziehung, eine lineare Zunahme der paarweisen genetischen Differenzierung (F_{ST}) mit der geographischen Entfernung von Populationen (**Abbildung 3.10**, Hutchison & Templeton 1999; Wright 1943). Dies beruht darauf, dass Genfluss mit Samen und Pollen benachbarte Populationen verbindet und angleicht, gleichzeitig alle Populationen aber durch Drift dazu tendieren, sich zu verändern. Je nach der Stärke des Genflusses verändert sich die Beziehung, so dass bei starkem Genfluss entfernungsunabhängig nur geringe Differenzierung vorliegt, während bei sehr geringem Genfluss entfernungsunabhängig sowohl große und geringe Differenzierung zwischen Populationen vorliegen kann.

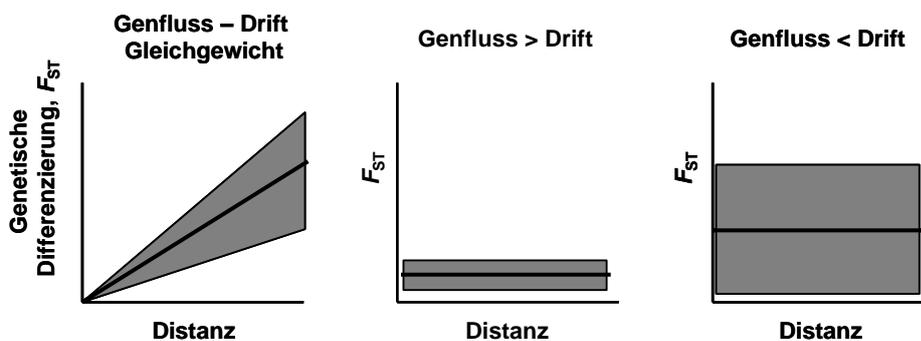


Abbildung 3.10 Beziehung zwischen genetischer Differenzierung (F_{ST} , G_{ST} , Φ_{ST}) und geographischer Distanz in Abhängigkeit von Genfluss und genetischer Drift. Nach Hutchison & Templeton 1999.

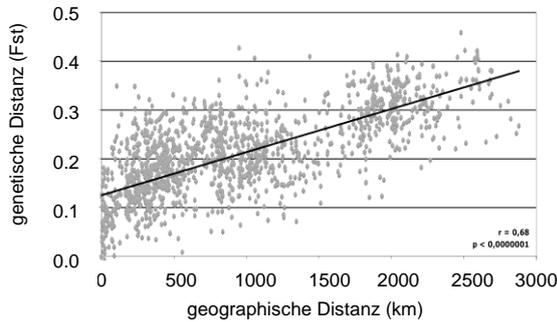
Die Muster der genetischen Differenzierung als Funktion der geographischen Entfernung sind stark artspezifisch (Abbildung 3.11). Folgende Verallgemeinerungen lassen sich dennoch ableiten: 1. Weit verbreitete auskrenzende Arten zeigen im Bereich bis 50km z. T. sehr geringe Differenzierung ohne Zusammenhang zur geographischen Distanz (z.B. *Sanguisorba officinalis*); 2. Die Differenzierung ist bis mehrere 100 km sehr variabel und zeigt keine regelhafte Beziehung zur geographischen Distanz (z.B. *Arrhenatherum elatius*, *Corynephorus canescens*) und erst bei großen Entfernungen (> 500km) ist eine klare Erhöhung der Differenzierung zu beobachten. 3. Seltene, oder auf isolierte Standorte beschränkte Arten zeigen häufig deutlichere Muster der entfernungsabhängigen Differenzierung (z.B. *Geum reptans*, *Campanula thyrsooides*, *Pulsatilla vulgaris*).

Bei der Betrachtung der wichtigen Futtergräser muss natürlich auch der menschliche Einfluß berücksichtigt werden. So zeigen *Arrhenatherum elatius* und *Corynephorus canescens* zwar ein ähnliches Muster (Abbildung 3.11), allerdings ist die Kurve bei *C.*

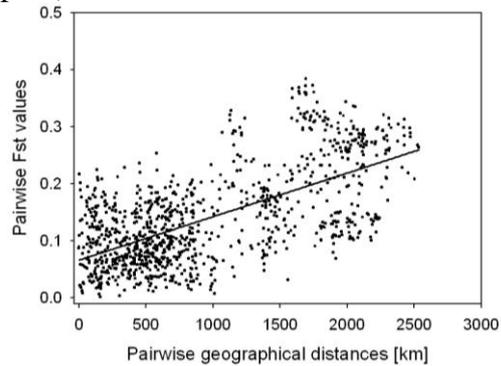
cansecens nach oben verschoben, zeigt als insgesamt wesentlich stärkere Differenzierung. Dies kann dadurch bedingt sein, dass Glatthafer schon lange mittels Massensaatgut weitverbreitet eingebracht wurde und damit genetisch homogenisiert wurde. Im Gegensatz dazu kann davon ausgegangen werden, dass das Silbergras nicht ausgesät wurde, so dass die höhere genetische Differenzierung natürlichen Ursprungs ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Bolaric *et al.* (2005), für die weit verbreiteten auskreuzenden *Lolium*-Ökotypen in Deutschland und Europa. Die Individuen clusterten populationsspezifisch, ohne allerdings ein Muster der Isolation durch Distanz zu zeigen. Teilweise waren Populationen innerhalb einer Region stärker voneinander differenziert als zwischen Regionen.

Welche Konsequenzen lassen sich aus diesen räumlichen-genetischen Mustern mit Hinblick auf die Herkunftszuordnung von Regiosaatgut ableiten? Da genetische Differenzierung zwischen Populationen die Regel ist, aber nicht unbedingt eine klare Entfernungsabhängigkeit der genetischen Distanz vorliegt, kann es schwierig sein, spezifische genetische Marker für jede Herkunftsregion zu definieren. Es wäre dann nicht möglich, eine fragliche Probe ohne weitere Kenntnis einer Herkunftsregion zuzuordnen. Andererseits ist in der Regel jede einzelne Herkunft genetisch von den übrigen differenziert, womit fragliches Material der ursprünglichen *Herkunft* zugeordnet werden kann, wenn deren Genotyp aus Rückstellproben bekannt ist.

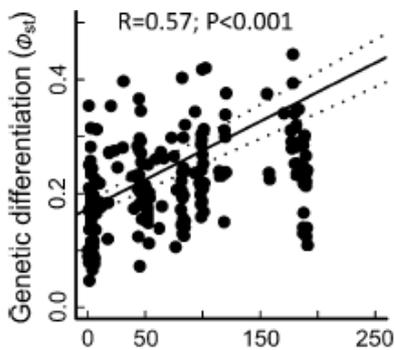
Corynephorus canescens (Kohlbeck 2006)



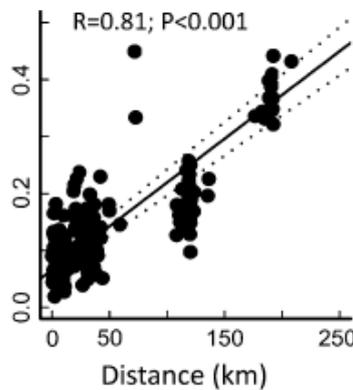
Arrhenatherum elatius (Michalski & Durka unpub.)



Epilobium fleischeri

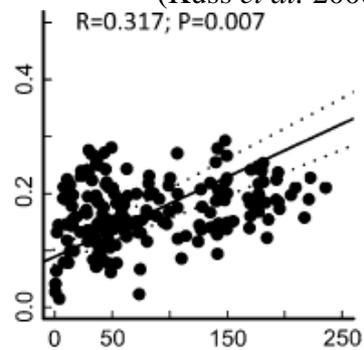


Geum reptans

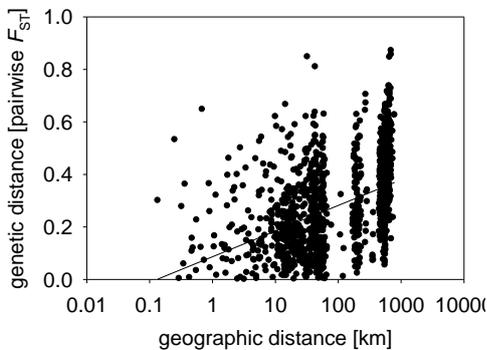


Campanula thyrsoides

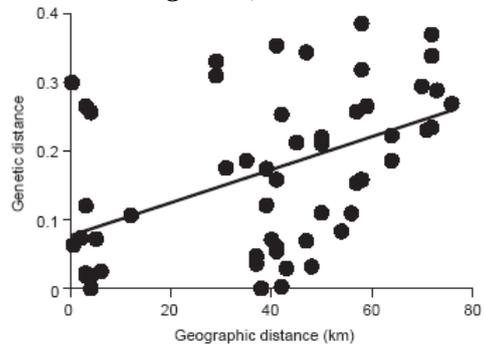
(Kuss *et al.* 2008)



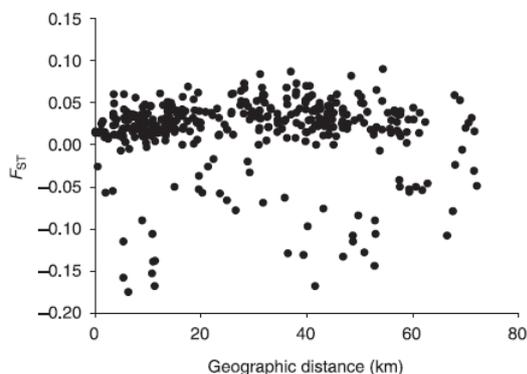
Astragalus exscapus (Durka & Becker unpub.)



Pulsatilla vulgaris (Hensen *et al.* 2005)



Lychnis flos-cuculi (Galeuchet *et al.* 2005)



Sanguisorba minor (Musche *et al.* 2008)

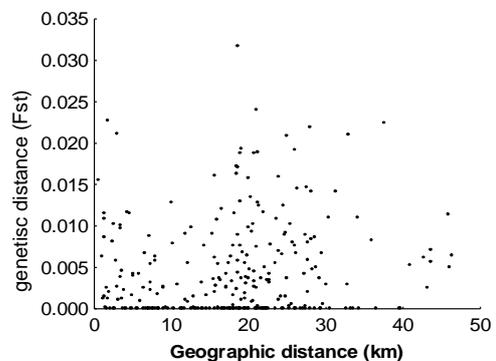


Abbildung 3.11 Beispiele für die Abhängigkeit der genetischen Differenzierung zwischen Populationen (F_{ST}) von der geographischen Entfernung für verschiedene Arten des Grünlandes.

3.3 Genetische Marker und die Abgrenzung von Herkunftsgebieten

Die bisher dargestellten Prozesse und darauf beruhenden räumlich-genetischen Mustern lassen sich nutzen, um Herkunftsregionen oder Saatzenen zu identifizieren. Die Abgrenzung von Herkunftsgebieten erfolgt in aller Regel nach biogeographischen und standörtlichen Gegebenheiten und nutzt die naturräumlichen Einheiten. Beispiele sind die forstlichen Herkunftsgebiete für die Saatgutgewinnung, aber auch jetzt vorgelegte Abgrenzung für Regiosaatgut in Deutschland und z.B. die Gebietsabgrenzung für die Saatgutgewinnung für Renaturierungszwecke und Buntbrachen in der Schweiz (Skew 2003). Aber auch mittels rein genetischer Methoden wurden in Einzelfallstudien Gebietsabgrenzungen vorgenommen, vor allem wiederum bei den forstlichen Hauptbaumarten. Eine einheitliche Methodik liegt hierzu allerdings nicht vor. So wurden mittels Isoenzymen für die Buche in Tschechien acht Zonen abgegrenzt (Gömöry *et al.* 1998). Für die Fichte wurden in Europa 16 Regionen auf der Basis von genetischer Variation von Chloroplasten-Markern identifiziert (Bucci & Vendramin 2000). Für die Hainbuche wurde aufgrund von AFLP-Markern für das Gebiet von Flamen eine Saatzone als ausreichend betrachtet (Coart *et al.* 2005). Idealerweise fließen in eine Gebietsabgrenzung verschiedene Datenbenen ein: neutrale genetische Marker, quantitativ-genetische morphologische Eigenschaften und standörtliche Voraussetzungen. Dies wurde z.B. exemplarische am Sandelholz gezeigt, wobei die genannten Bereiche jeweils unabhängige Beiträge zu einem Gesamtbild lieferten (Bottin *et al.* 2007).

Für krautige Pflanzen sind derartige auf genetischer Basis durchgeführte Gebietsabgrenzungen nicht bekannt. Allerdings wird gerade bei der Problematik von Rekultivierung die Frage von lokal angepasstem Saat/Pflanzgut seit langem diskutiert (Knapp & Rice 1996; McKay *et al.* 2005; Smith *et al.* 2007). Es wurden im Rahmen von Rekultivierungsprojekten verschiedentlich Untersuchungen über genetische Differenzierung potentieller Herkunftsgebiete angestellt. Dabei war jeweils das Ziel, die Spenderpopulationen danach auszusuchen, wie stark die entsprechenden Pflanzenpopulationen genetisch von der Zielpopulation differenziert waren. So untersuchten Krauss & He (2006) und Bussell *et al.* (2006) in einem australischen Projekt für insgesamt 15 Pflanzenarten die genetische Differenzierung möglicher Spenderpopulationen im Umkreis von ca. 50 km um ein Rekultivierungsprojekt in Australien. Dabei zeigten die Arten unterschiedliche Differenzierungsmuster, insgesamt aber herrschte starke genetische Differenzierung vor. Es wurden drei Kategorien gebildet, mit (1) enger (alle möglicher Spenderpopulationen sind differenziert von Zielpopulation) (2) lokaler (nächstgelegene Population ist nicht differenziert), und (3) regionaler Bindung (keine der untersuchten Populationen ist differenziert). Solche Projekte verlaufen in der Regel in relativ kleinräumigem Maßstab, so dass sie nur eingeschränkt auf die Regiosaatgutproblematik übertragen werden können, sie zeigen aber klar, dass Populationen stark differenziert sein können und dass aufgrund

unterschiedlicher Arteigenschaften eine einheitliche Festlegung von Herkunftsregionen im Einzelfall eine suboptimale Lösung darstellen kann.

3.4 Schlussfolgerungen für Herkunftsgebiete

► Es ist zu erwarten, dass Grünlandarten auf Grund von historischen Ursachen, vor allem der nacheiszeitlichen Wiederbesiedlung, eine genetische Differenzierung innerhalb von Deutschland aufweisen in Bezug auf neutrale genetische Marker. Der Grad der Differenzierung zwischen Populationen wird grundsätzlich von Merkmalen wie Befruchtungssystem, Samenausbreitungs-Vektor und Lebensdauer bestimmt.

► Standort- und Klima-bedingte Selektion führt zusätzlich zu lokaler Anpassung und genetischen Differenzierung in adaptiven Merkmalen (adaptive genetische Marker). Lokale Anpassung ist für viele Arten zu erwarten. **Adaptive genetische Variation kann mit gängigen molekularen Markersystemen nicht, oder nur eingeschränkt erfasst werden** (s. Kap. 4). **Genetische Differenzierung in potentiell adaptiven Markmalen ist mindestens so stark wie die Differenzierung von neutralen Markersystemen.**

► Für die meisten Grünlandarten ist mit **hoher genetischer Diversität** innerhalb der Populationen und **mäßiger genetischer Differenzierung zu rechnen**. Auf der weiten Verbreitung der meisten Arten ist damit zu rechnen, dass die Differenzierung der quantitativ genetischen Variation hoch ist.

► Es liegen nur sehr wenige systematischen flächendeckenden Untersuchungen über genetische Differenzierung von Grünlandarten vor, die einen Großteil Deutschlands und der umgebenden Länder erfassen und gleichzeitig sowohl Kerngenom wie Chloroplastengenom untersucht haben. Viele Arbeiten haben nur eine geographische Reichweite von unter 100 km und lassen deswegen keine Schlüsse über größere geographische Räume zu. **Es ist eindeutig ein Forschungsbedarf vorhanden, an einzelnen Grünlandarten exemplarisch die genetische Struktur in Europa und insbesondere den Grad der genetischen Differenzierung in Deutschland zu untersuchen.**

► Aufgrund der phylogeographischen Gliederung und der klimatischen und standörtlichen adaptiven Differenzierung sind Herkunftsregionen an diesen Parametern zu orientieren, die sich z.B. in der biogeographischen und naturräumlichen Gliederung Deutschlands widerspiegelt (vgl. McKay *et al.* 2005). Ohne aus den bisherigen genetischen Erkenntnissen direkt Grenzen ableiten zu können, **legen die populationsgenetischen Befunde nahe, die Ausdehnung von Herkunftsregionen auf unter ~150-300 km zu begrenzen.**

► Die Beziehung von genetischer Differenzierung neutraler Marker (z.B. AFLP) zu geographischer Distanz hat, wenn signifikant, oft eine geringe Vorhersagequalität. Genetische Differenzierung, die eine tolerierbare Schwelle von $G_{ST} = 0.1$ bis 0.2 übersteigt, tritt innerhalb einer Art oft über einen weiten Distanzbereich auf (0 bis mehrere 100 km).

Daher ist es fraglich, ob für eine Pflanzenprobe eindeutig eine Herkunftsregion bestimmt werden kann, wenn nicht eine aus derselben Herkunft stammende Referenzprobe vorhanden ist.

Für ein Kontrollsystem auf genetischer Basis ergibt sich daraus der Schluss, dass neben einer Referenzdatenbank, die stichprobenhaft einen möglichst großen Teil des Areals der Art abdeckt, alle fraglichen besammelten Herkünfte als Referenz zur Verfügung stehen müssen.

4 Genetische Markersysteme zur Kontrolle lokaler Herkünfte

Im Folgenden werden verschiedene genetische Markersysteme vorgestellt, die häufig im Rahmen von Studien an Pflanzenpopulationen verwendet werden, um Populationsstrukturen, Metapopulationen, Genfluss oder phylogeographische Muster darzustellen. Diese Markersysteme erzeugen genetische Fingerabdrücke von Pflanzen und kommen auch für die Herkunftskontrolle prinzipiell in Frage: z.B. Mikrosatelliten, AFLP, RAPD, Isoenzyme, Chloroplasten-DNA-Marker, SNP, DArt, DNA-barcoding. Darüber hinaus werden kurz die möglichen statistischen Werkzeuge dargestellt, die Zuordnung von fraglichen Proben zu Herkünften bzw. den Ausschluss ermöglichen.

4.1 Markersysteme

4.1.1 Allozym-Analyse

Die Allozym-Analyse, manchmal auch Isoenzym-Analyse genannt, macht sich die Tatsache nutzbar, dass viele Enzyme des primären Stoffwechsels, in verschiedenen Allelen vorkommen, die mittels Gel-Elektrophorese getrennt werden können. Nach der Elektrophorese werden die Enzyme dadurch nachgewiesen, dass sie Substrate ihrer enzymspezifischen Reaktion umsetzen, wobei Farbstoffe erzeugt werden, die zu Bandenmustern führen. Da die untersuchten Enzyme in allen Pflanzenarten gebildet werden, ist die Methode universell einsetzbar. Obwohl Enzyme mit physiologischer Funktion untersucht werden, geht man in der Regel davon aus, dass die Variation neutral ist, d.h. die verschiedenen Allele nicht der Selektion unterliegen. Üblicherweise werden ca. 8-15 Enzym-Loci untersucht (Hamrick & Godt 1990), wovon ca. die Hälfte polymorph ist, mit in der Regel wenigen (2-3) Allelen. Allozyme werden in der Regel biparental vererbt und sind co-dominante Marker. Bei polyploiden Arten kann die Analyse durch Bandenüberlagerung schwierig bis unmöglich werden.

Da die Enzyme über ihre spezifische Enzymreaktion dargestellt werden, muss für die Analyse frisches lebendes oder gefrorenes Gewebe eingesetzt werden, was hohe Anforderungen an die Probenahme und Lagerungslogistik stellt. Die Allozym-Analyse ist die klassische Methode der Populationsgenetik und war bis zur Entwicklung der PCR die vorherrschende Methode zur Analyse von Populationsstrukturen. Ihre Bedeutung nimmt derzeit ab, da sie einen relativ hohen Aufwand im Labor benötigen, der nicht automatisierbar ist.

4.1.2 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten, auch SSR (simple sequence repeats) oder VNTR (variable number of tandem repeats) genannt, sind DNA-Bereiche, die aus einer Wiederholung desselben kurzen Motives bestehen. Die Wiederholungssequenz kann 2-5 Basenpaare lang sein, in der Regel werden 2-3 bp Motive untersucht, z.B. CA, GA, GAT. Eine Mikrosatelliten-Region zeichnet sich durch eine unterschiedliche Anzahl dieser Motive aus. Mikrosatelliten haben keine bekannte physiologische Funktion, sondern werden als überflüssige DNA betrachtet. Daher sind sie sehr variabel darüber hinaus sind sie im Genom aller Pflanzen und Tiere weit verbreitet. Mikrosatelliten-Marker werden über PCR erzeugt und mittels hochauflösender Gel-Elektrophorese dargestellt, was entweder über Polyacrylamid-Gele oder mittels automatischer Kapillar-Elektrophoresegeräte („DNA-Sequencer“) erfolgt. Es gibt keine universell einsetzbaren primer, sondern für jede Art müssen neue primer entwickelt werden, was pro Art eine Investition von ca. 15.000€ voraussetzt.

Üblicherweise werden 5-10 Mikrosatelliten untersucht, die alle hoch polymorph sind. Damit ist die Anzahl genetischer Loci relativ begrenzt und kann nach der Methodenentwicklung nicht erweitert werden. In der Regel hat jedes untersuchte Individuum einen individuellen Genotyp (genetischer Fingerabdruck).

Da eine hochspezifische PCR verwendet wird, die relativ kurze, in der Regel zwischen 100bp und 300bp lange Fragmente erzeugt, kann die Mikrosatelliten-Analyse auch mit schlechter Probenqualität noch erfolgreich durchgeführt werden. Für die Analyse genügen wenige Milligramm frischen oder getrockneten Gewebes. Insbesondere kann die Analyse in der Regel direkt mit Samenmaterial durchgeführt werden und ist nicht auf Blattmaterial angewiesen. Mikrosatelliten-Analysen bilden die Grundlage für forensische Untersuchungen und von Vaterschafts-Tests beim Menschen, da sie individuelle Fingerabdrücke erzeugen können, was aber voraussetzt, dass viele verschiedene Mikrosatelliten-Loci bekannt und gut untersucht sind. Im Bereich von Pflanzen werden Mikrosatelliten zu Analyse von Populationsstrukturen, Genfluss und Vaterschaftsanalysen verwendet. Mikrosatelliten sind für eine Reihe von Grünland-Arten bekannt (Tabelle 3.4). Mikrosatelliten-Marker werden grundsätzlich als genetisch neutral betrachtet, da sie keine abgelesenen Gene sind. Aufgrund der geringen Zahl untersuchter Loci ist die Wahrscheinlichkeit gering, physikalisch an adaptive Genloci gekoppelte Mikrosatelliten loci zu identifizieren.

Die Datengrundlage für die Charakterisierung einer Population oder Herkunft ist die Identität und die Frequenz aller an jedem Mikrosatelliten-Locus festgestellter Allele. Aufgrund des hohen Polymorphie-Grades der Mikrosatelliten müssen deshalb pro Population eine relativ große Zahl von Individuen untersucht werden, um verlässliche Aussagen über das Vorhandensein bestimmter Allele und über ihre Frequenz zu erhalten. In Populationsstudien werden üblicherweise 20-40 Individuen beprobt.

4.1.3 RAPD

Bei der RAPD (random amplified polymorphic DNA) Analyse werden PCR Produkte erzeugt, indem zufällig erzeugte 10bp Oligonukleotide als primer einer durch niedrige Anlagerungstemperatur unspezifischen Reaktion eingesetzt werden. Die so erzeugten DNA Fragmente werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die hiermit gewonnenen Bandenmuster werden in eine binäre Datenmatrix übersetzt. RAPD-Marker liefern dominante Daten.

Aufgrund der unspezifischen PCR Reaktion gelten RAPD als wenig reproduzierbar und stark abhängig von den Laborbedingungen.

4.1.4 AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphisms (Vos *et al.* 1995), sind genetische Fingerabdrücke. Sie werden erzeugt, in dem DNA mit zwei Restriktionsenzymen verdaut wird, und nach Ligation von Adaptoren zwei zunehmend selektive PCR Reaktionen der entstandenen DNA-Fragmente durchgeführt werden. Die Selektivität der PCR entsteht durch die Verwendung unterschiedlicher Primer, die den Adaptoren entsprechen und zusätzlich 2 bis 4 selektive Basen tragen. Durch Einsatz unterschiedlicher selektiver Primer in Kombination lassen sich sehr viele Polymorphismen erzeugen. Die Fragmentlängen-Analyse erfolgt üblicherweise über einen DNA-Sequenzierautomaten in einem Bereich von 50 bis 500 (800) Basenpaaren (bp). Die Adaptoren ermöglichen eine hoch spezifische PCR Reaktion und sichern so die Reproduzierbarkeit. Als Ergebnis der AFLP entsteht für jedes Individuum ein Charakteristisches Bandenmuster (DNA-Fragment) von ca. 50 bis 150 Banden, wobei die Präsenz oder Absenz der Banden ausgewertet wird. Je nach Variabilität der Art werden mit typischerweise 4 Primer-Kombinationen 80 bis 300 polymorphe Banden identifiziert. Die Genotypisierung kann dabei entweder rein manuell oder vollautomatisch erfolgen (Arrigo *et al.* 2009), wobei letzteres für große Datensätze zu bevorzugen ist.

Zur Etablierung der Methode werden typischerweise an einer kleinen Zahl von Individuen verschiedene Primer-Kombinationen getestet und diejenigen mit der größten Zahl gut ansprechbarer, gut reproduzierbarer Banden ausgewählt.

Aufgrund der universellen Anwendbarkeit, des hohen Polymorphiegrades, der großen Zahl der erzeugten Marker und der teilweisen Automatisierbarkeit sind AFLP zur Zeit eine weitverbreitete Methode für verschiedenste populationsgenetische Anwendungen, einschließlich Untersuchungen zur Phylogeographie, Genfluss, Populationsstruktur und Befruchtungssysteme (Bonin *et al.* 2007a). Die einzelnen AFLP-Marker sind DNA-Fragmente, über deren Funktion nichts bekannt ist. Deswegen werden sie prinzipiell als neutrale Marker angesehen. Jedoch ist es mit Hilfe statistischer Verfahren möglich, potentiell adaptive Loci zu identifizieren (Bonin *et al.* 2007b; Jump *et al.* 2006). Aufgrund der großen Zahl untersuchter AFLP Loci ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, potentiell adaptive Loci

zu treffen. Die Möglichkeit, potentiell adaptive Loci zu identifizieren bietet somit die Möglichkeit, Marker zu identifizieren, die lokale Anpassung zeigen (Storz 2005) und gegebenenfalls für die Herkunftsabgrenzung und Herkunftszuordnung zu nutzen. Potentielle Nachteile von AFLP sind, dass eine relativ große DNA-Menge benötigt wird und eine hohe DNA-Qualität vorhanden sein muss. Dies bedeutet, dass in der Regel junges Blattmaterial gewonnen werden muss also nicht direkt mit Samenmaterial gearbeitet werden kann. Nur bei groß-samigen Arten kann auch direkt mit Samen gearbeitet werden. Obwohl die PCR-Bedingungen sehr stringent sind, treten Genotypisierungsfehler auf (Bonin *et al.* 2004; Pompanon *et al.* 2005) und müssen aktiv bewertet werden, um konsistente Genotypisierungen zu ermöglichen, wofür spezielle Programme zur Verfügung stehen (Whitlock *et al.* 2008). Obwohl aus den Bandenmustern unterschiedliche Genotypisierungsergebnisse abgeleitet werden können, wurde gezeigt, dass die Populationsstruktur davon weniger betroffen ist als die Maße der Diversität auf Populationsebene (Arrigo *et al.* 2009), was für die Herkunftszuordnung von Bedeutung ist. Problematisch kann die Analyse von Arten mit großem Genom sein, da diese eine große Zahl von Fragmenten liefern (z.B. Polyploidie) mit z.T. komplexen schwer auswertbaren Bandenmustern. Allerdings gilt für polyploide Arten grundsätzlich, dass unabhängig von der Methode die Genotypisierung wesentlich komplexer ist als bei diploiden.

Die Datengrundlage für die Charakterisierung einer Population oder Herkunft ist die Frequenz der beiden Allele an jedem AFLP-Locus. Aufgrund des geringen Polymorphie-Grades pro AFLP-Locus kann die zu untersuchende Zahl von Individuen geringer sein als für die Untersuchung von Mikrosatelliten. Zur Erhöhung der Präzision der Quantifizierung von Populationsunterschieden kann entweder die Zahl der untersuchten Individuen oder die Zahl der analysierten AFLP-Loci erhöht werden (Medina *et al.* 2006). Während für klassische populationsgenetische Analysen meist zwischen 10 und 30 Individuen untersucht werden, kann bei einer systematischen Probenahme auch mit noch weniger Individuen gearbeitet werden. So wurden im Projekt INTRABIODIV, das eine Reihe von Pflanzenarten der europäischen Gebirge untersuchte, nur 4 Individuen pro Population analysiert, allerdings bei einer systematischen flächendeckenden Probenahme, die bis zu 170 Populationen umfasste (Gugerli *et al.* 2008).

4.1.5 Chloroplasten-DNA-Marker (cpDNA)

Die Chloroplasten enthalten ein kleines Genom, das bei den höheren Samenpflanzen in der Regel über die Eizellen vererbt wird. Ausnahmen bilden die Koniferen und einzelne Angiospermen-Arten. Als einziger der hier vorgestellten Markersysteme sind die Chloroplasten-Marker haploid und rekombinieren nicht. Das Chloroplastengenom zeigt innerhalb von Arten im Vergleich mit den anderen Markersystemen eine geringe Diversität

aufgrund der Haploidie, der fehlenden Rekombination und weil dieses Genom zum größten Teil aus unter Selektion stehenden kodierenden Genen besteht. Die Tatsache, dass dieses Genom maternal vererbt wird und nicht rekombiniert führt dazu, dass Mutationen ausschließlich über die Samen weitergegeben werden. Somit ist cpDNA gut geeignet, z.B. Ausbreitungswege und phylogeographische Muster nachzuvollziehen (z.B. Ziegenhagen *et al.* 2003).

Variabilität im Chloroplasten-Genom kann mit drei Methoden erfasst werden:

1. Sogenannte „Chloroplasten-Mikrosatelliten“, poly-A-Einheiten unterschiedlicher Länge, für die universelle primer vorliegen und somit direkt über PCR und Fragmentlängen-Analysen untersucht werden können (Weising & Gardner 1999). Allerdings sind diese Marker nicht in allen Arten polymorph.

2. Direkte Sequenzierung von cpDNA mit Hilfe universeller Sequenzierungsprimer zur Detektion variabler Sequenzen.

3. Eine Kombination aus selektiver PCR eines bestimmten cpDNA Fragmentes mit nachfolgender Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse (cpDNA-PCR-RFLP). Bei dieser Methode wird in einem ersten Schritt ein Chloroplasten-DNA-Fragment mit PCR vervielfältigt. Anschließend wird es mit Hilfe eines Restriktionsenzym in Fragmente zerlegt die schließlich mit Hilfe eines kostengünstigen Agarosegels oder in Sequenzierautomaten auf Fragmentlängenunterschiede untersucht werden. Für die Etablierung des Verfahrens werden mit einer kleinen Anzahl von Pflanzenproben verschiedene cpDNA-Fragmente mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, um Polymorphismen zu entdecken. Die so entdeckten Polymorphismen werden dann im Routineverfahren an allen zu untersuchenden Proben angewendet.

4.1.6 SNP

Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNP), also Veränderungen einzelner Nukleotide in der DNS, sind die häufigsten Polymorphismen im Genom überhaupt. Sie sind für viele verschiedene Anwendungen nutzbar und werden z.B. häufig diagnostisch in der Medizin eingesetzt, sind aber genauso für evolutionär-genetische Fragen einsetzbar (Morin *et al.* 2004; Morin *et al.* 2009). Die Methode basiert auf Sequenz-Information für Teile des Genoms des Zielorganismus und wird deshalb bisher vor allem in Modellorganismen eingesetzt (z.B. *Arabidopsis*, Soja, Mais). SNPs werden schon erfolgreich für die Identifikation von Herkünften bei bestimmten Fischarten benutzt (Negrini *et al.* 2009). Die Methode wäre damit prinzipiell auch für die Herkunftskontrolle von Pflanzenarten einsetzbar, allerdings sind die Entwicklungskosten zu hoch.

4.1.7 DNA-barcoding

DNA barcoding beschreibt ein Verfahren, bei dem mit Hilfe weniger DNA-Sequenzen die Art-Identität festgestellt werden kann. Für verschiedene Tiergruppen liegen entsprechende Methoden vor, während für Pflanzen noch keine Einigkeit besteht, welche Loci zu verwenden sind. Möglicherweise ist es bei den Pflanzen nicht möglich mit nur einem Set an DNA-Sequenzen zu arbeiten, und es müssen für bestimmte Gruppen spezielle Marker analysiert werden. Die Methode zielt auf die Art-Ebene und ist nicht geeignet, innerartliche Variabilität abzubilden. Deswegen kommt sie für den Herkunftsnachweis nicht in Frage.

4.1.8 DArt

Die *Diversity Arrays Technology* (DArt) ist junges System zur Erzeugung von genetischen Fingerprintdaten und stellt eine Verknüpfung von AFLP und array-Technologie dar (Jaccoud *et al.* 2001). Das Verfahren ist gut geeignet, Akzessionen von Kulturpflanzen zu charakterisieren und zu unterscheiden (z.B. White *et al.* 2008) und wäre prinzipiell für die Herkunftszuordnung einsetzbar. DArT ist eine kommerzielle Anwendung, die hohe artspezifische Entwicklungskosten mit sich bringt und scheidet deshalb zunächst für den Herkunftsnachweis aus.

Tabelle 4.1. Genetische Markersysteme und ihre Eigenschaften. Der Preis bezieht sich lediglich auf die Verbrauchsmittel pro Genotypisierung.

Marker-System	Preis (€)	Variabilität	Reproduzierbarkeit	Handhabung	Bemerkungen
Allozym-Analyse	ca. 10	mittel	hoch	schwierig	
Mikrosatelliten	ca. 8	hoch	hoch	mittel	
RAPD	ca. 4	hoch	mittel	mittel	Reproduzierbarkeit fraglich
AFLP (4 Primer Kombinationen)	ca. 8	hoch	hoch	schwierig	Genotypisierung Benutzer-abhängig
(cpDNA) PCR-RFLP	ca. 5 - 8 ¹	mittel	hoch	mittel	
SNP	?	sehr hoch	hoch	schwierig	Nur für Modell-Organismen
DArt	?	sehr hoch	hoch	kommerziell	
DNA-barcoding	ca. 5	niedrig	hoch	mittel	Art-Abgrenzung

¹ je nach Methode: Agarose-Gel: 5€, Sequenzierautomat: 8€

4.1.9 Bewertung und Eignung

Aus den in **Tabelle 4.1** zusammengestellten Eigenschaften der verschiedenen genetischen Markersysteme in Bezug auf genetische Variabilität (Barcoding < cpDNA < Allozyme < SNP = RAPD = AFLP = DArt < Mikrosatelliten), Preis (RAPD < cpDNA <

Mikrosatelliten = AFLP < DArt < SNP) und Reproduzierbarkeit (RAPD < AFLP < Mikrosatelliten = Allozyme) ergibt sich die Eignung für ein Kontrollsystem:

Geeignete Methoden: Mikrosatelliten
cpDNA-PCR-RFLP
AFLP

Ungeeignete Methoden: RAPD (Reproduzierbarkeit umstritten)
DNA-barcoding (nur für Zwischen-Artniveau relevant)
SNP (Preis für Markerentwicklung)
DArt (Markerentwicklung, kommerzielle Anwendung)
Isoenzyme (Frischproben nötig)

Welche der hier als prinzipiell geeignet eingeschätzten Methoden sich praktisch umsetzen lassen, muss in Fallstudien für einzelne Pflanzenarten geprüft werden. In einem Pilotversuch wäre weiter zu bewerten wäre, ob eine einzelne Methode oder eine Kombination z.B. aus **Mikrosatelliten-Markern** (biparentale Vererbung, hoch polymorph) und **cpDNA-Marker** (maternale Vererbung, wenig polymorph) zielführend und praktikabel ist. Für Pflanzenarten, bei denen keine Mikrosatelliten-Marker verfügbar sind, oder aber auch generell, können **AFLP-Marker** eingesetzt werden.

Es gibt bisher nur vereinzelte angewandte Arbeiten bzw. Vorschlägen für den Herkunftsnachweis mittels genetischer Methoden für Forstbaum-Saatgut oder zur Identifikation von Baumstämmen. In diesen werden als Markersystem angewandt bzw. vorgeschlagen: Mikrosatelliten (Nielsen & Kjær 2008; Wypukol *et al.* 2008), AFLP (Nielsen & Kjær 2008) und cpDNA (Deguilloux *et al.* 2003; Deguilloux *et al.* 2004).

4.2 Statistische Verfahren der Herkunftszuordnung

Es existieren eine Reihe von Verfahren, die es erlauben, eine fragliche Einzel- oder Sammel-Probe einer Ursprungspopulation zuzuordnen, je nachdem, welche genetischen Marker vorliegen und wie genetisch variabel und wie stark differenziert die Populationen sind. Es kann hier nur ein kurzer Abriss über die verschiedenen Ansätze gegeben werden, ohne die Verfahren im Detail zu beschreiben.

4.2.1 Privat-Allele

Ist eine Herkunft durch eine ausreichende Zahl oder Frequenz von einem oder mehreren Privat-Allelen gekennzeichnet, können diese ausreichen, um die Herkunft zu bestimmen. Privat-Allele sind solche Allele, die ausschließlich in einer Population vorkommen, so dass

das Vorhandensein des Privat-Allels ausreicht, um die Herkunft anzuzeigen. So konnten Wypukol *et al.* (2008) mehrere Buchenbestände anhand von Privat-Allelen unterscheiden. Die Privat-Allel-Methode setzt allerdings voraus, dass bekannt ist, in welchen Populationen welche Allele vorkommen, um Fehl-Zuordnungen zu vermeiden.

4.2.2 Deskriptive Parameter auf Populationsebene

Die beschreibenden Parameter der genetischen Diversität auf Populationsebene wie Allelzahl (A , A_r), Gendiversität (H_e) oder der Inzuchtkoeffizient (F_{is} , s.o.) charakterisieren die Populationen. Sie sind aber nur schlecht geeignet, diese zu identifizieren, da sie keine Auskunft über die allelische Identität geben. Sie können jedoch die Nicht-Übereinstimmung anzeigen, wenn die fragliche Population sich von potentiellen Herkünften stark unterscheiden.

Computerprogramme (Auswahl): AFLPSurv (Vekemans 2002), GenAlEx (Peakall & Smouse 2006), FStat (Goudet 1995).

4.2.3 Genetische Distanz und genetische Differenzierung

Der Grad der genetischen Unterschiedlichkeit von Populationen ist keine objektive Größe, sondern kann durch diverse Distanzmaße bestimmt werden (z.B. Nei's genetische Distanz (Nei, 1972), Cavalli-Sforza Distanz (Cavalli-Sforza and Edwards, 1967), Reynolds Distanz (Reynolds et al. 1983) und diverse andere). Diese verschiedenen Maße unterscheiden sich in den Annahmen in Bezug auf die wirksamen Faktoren (Drift, Mutation), und auf die Art und Weise wie Allele und Allelfrequenzen behandelt werden. Auch der oben schon dargestellte F_{ST} -Wert und seine verschiedenen Schätzer stellt ein Maß der Unterschiedlichkeit von Populationen dar. Alle diese Maße erlauben es, die Ähnlichkeit von fraglichen Pflanzenpopulationen mit potentiellen Herkünften zu quantifizieren und im Falle der Übereinstimmung sollte die Distanz für alle Distanzmaße nahe Null sein.

Mit Hilfe einer Matrix von Ähnlichkeitsmaßen zwischen verschiedenen Herkünften und Referenzproben kann mittels Clusteralgorithmen, wie z.B. UPGMA, ein Abbild der Ähnlichkeitsmuster erstellt werden (Phänogramm, Ähnlichkeitsbaum), bei dem im Idealfall eine fragliche Herkunft mit minimaler Distanz ihrer Herkunftspopulation zugeordnet wird. Die Qualität einer solchen Ähnlichkeits-Analyse muss mit Hilfe von *bootstrap*-Analysen festgestellt werden, da aufgrund von Zufallseffekten bei der Sammlung und begrenzter Probenzahlen nicht mit 100%iger Übereinstimmung gerechnet werden kann.

Computerprogramme (Auswahl): AFLPSurv (Vekemans 2002), Phylip (Felsenstein 1989), GenAlEx (Peakall & Smouse 2006), NTSys (Rohlf 1998), FStat (Goudet 1995).

4.2.4 Zuweisungs-Tests für einzelne Individuen

Einzelne Pflanzenindividuen können aufgrund ihres Genotypes den Ursprungspopulationen zugewiesen werden. Diese sogenannten „assignment-tests“ beschreiben die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum eines bestimmten Genotyps einer bestimmten Population angehört. Die entsprechenden Algorithmen beruhen in der Regel auf gewissen Annahmen (z.B. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) und quantifizieren auch die Unsicherheit einer Zuordnung. Eine hohe Zuweisungswahrscheinlichkeit liegt immer dann vor, wenn die Populationen stark differenziert sind, d.h. unterschiedliche Allele oder zumindest unterschiedliche Allelfrequenzen aufweisen, womit die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass einzelne Individuen charakteristische Genotypen aufweisen.

Computerprogramme: AFLPOP (Duchesne & Bernatchez 2002), Arlequin (Excoffier *et al.* 2005), BayesAss (Wilson & Rannala 2003), GeneClass2 (Piry *et al.* 2004)

4.2.5 Bayesische Clusterverfahren

Bayesische Clusterverfahren erlauben es, eine Zahl von genotypisierten Individuen in Gruppen einzuteilen, die wiederum sogenannten „gene-pools“ zugeordnet werden, unabhängig von einer vorherigen Einteilung in Populationen. Die so ermittelten Gruppen bzw gene-pools stellen dann homogene genetische Einheiten dar. Die Herkunft einer fraglichen Population kann so über die Zugehörigkeit zu bestimmten gene-pools bestimmt werden, falls sich diese mit Herkunftsregionen decken.

Computerprogramme: STRUCTURE Falush *et al.* 2007, BAPS Corander & Martinen 2006, PSMIX (Wu *et al.* 2006)

5 Herkunftskontrolle: Struktur und Kostenschätzung

Das Ziel der Herkunftskontrolle ist es, für Pflanzen fraglicher Herkunft feststellen zu können, aus welcher Herkunftsregion sie stammen, bzw. ob sie aus einer bestimmten bekannten Herkunft stammen.

Die Herkunftskontrolle mit genetischen Methoden basiert auf Unterschieden zwischen verschiedenen Herkünften in Bezug auf vererbte, d.h. in der DNS festgelegte Merkmale, die unabhängig vom Wuchsort nachgewiesen werden können.

Ein System zur Kontrolle der Herkunft besteht aus mehreren Teilen: (1) einer Referenzdatenbank, die alle Informationen und Methoden über die geo-referenzierten genetischen Merkmale einer Art enthält, (2) eine auf der Basis der in der Datenbank gesammelten genetischen Merkmale erzeugte „genetische Karte“, die den Grad der genetischen Differenzierung zwischen Regionen darstellt und (3) ein statistisches Verfahren, das die Überprüfung einer fraglichen Herkunft ermöglicht. Die nötigen Elemente eines Herkunftskontrollsystems werden im Folgenden skizziert (**Abbildung 5.1**).

5.1 Dokumentation und Referenzdatenbank

Die Basis eines Herkunftskontroll-Verfahrens ist eine Sammlung der genetischen Daten aller untersuchter Herkünfte. Hierzu zählen Rückstellproben von besammelten und vermehrten Pflanzen Beständen, und weitere, möglichst das gesamte Areal einer Art umfassende Aufsammlungen. Diese Daten ermöglichen es, einheimische Herkünfte von nicht-einheimischen abzugrenzen. Alle Methoden, Verfahren und Ergebnisse sind zu dokumentieren und in einer Datenbank zu erfassen.

1. Proben-Stammdaten

Datensatznummer = Herkunft

Pflanzenart

Art der Probe: Freilandsammlung, Vermehrungsgut (z.B. F1, F2)

Art des Materials: Blatt, Samen

Anzahl beprobter Individuen

Geographische Herkunft (Gauß-Krüger-Koordinaten)

Sammel-Datum

Sammler/Anbieter

Angaben zum Standort

2. Methoden-Datenbank

Protokolle zur Probenahme

Markersysteme (AFLP, Mikrosatelliten, cpDNA-PCR-RFLP): Detaillierte Darstellung der Labormethoden, wenn nötig nach Pflanzenart differenziert inklusive Nennung der genetischen Loci.

Statistische Auswert-Methoden, z.B. *F*-Statistik, assignment-Tests, Bayesische Clustermethoden (STRUCTURE, BAPS) siehe 4.2

3. Genotyp-Datei

Individuelle Genotypen: Allel-Angaben aller Loci in Form einer Tabelle (**Abbildung 5.2**). Jeder Genotyp ist identifiziert durch eine individuelle Genotyp-Nummer und eine Herkunftskennung. Die Tabelle ist geeignet, mit gängigen Auswerteprogrammen gelesen zu werden. Diese Datei ist die Grundlage für genetisch-statistische Analysen und stellt den Kern der Datenbank dar.

Populations-Daten: Kennzahlen auf Herkunftsebene, z.B. Allel-Frequenzen der Loci, Herkunft-diagnostische Marker.

Herkunftskontrolle

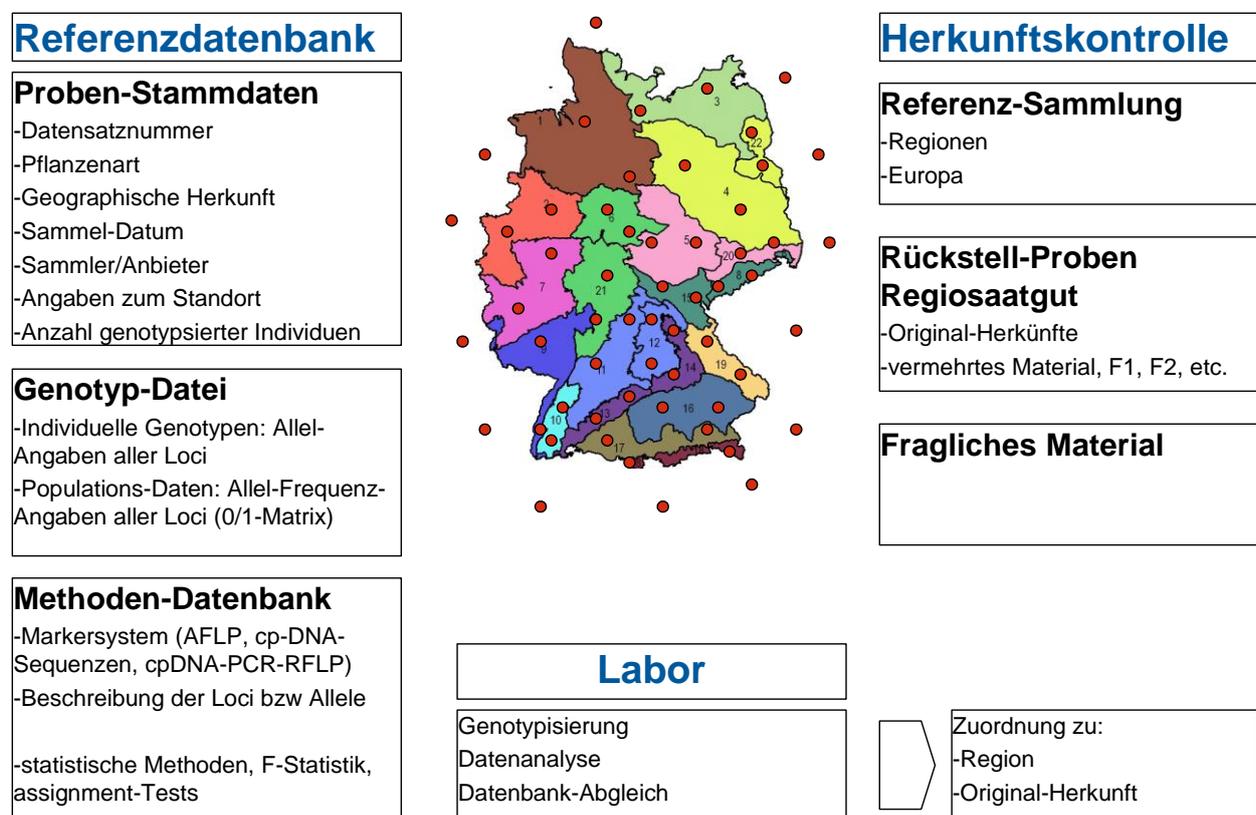


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung eines Systems zur Herkunftskontrolle mittels genetischer Fingerabdruck-Analysen.

5.2 Referenzproben und Genetische Karte

Mit den oben genannten Methoden muss zunächst für jede zu kontrollierende Pflanzenart eine Datenbasis erzeugt werden, die eine „**genetische Grundkarte**“ liefert. Diese gibt Auskunft über die genetische Diversität innerhalb der Art und ihre geographische Verteilung zwischen den einzelnen Populationen und Regionen. Sie zeigt, wie stark die Regionen voneinander differenziert sind und kann so zur Herkunftszuordnung herangezogen werden.

Es werden Referenzproben gewonnen, so dass alle Herkunftsregionen mit mindestens 2 Herkünften vertreten sind. Darüber hinaus sind Herkünfte außerhalb Deutschlands zu gewinnen, vorzugsweise in Gebieten, die als Saatgutlieferanten bekannt sind oder in Frage kommen. Nach Möglichkeit ist das gesamte Verbreitungsgebiet der Art mit weiteren Proben abzudecken. Als „Probe“ einer Herkunft wird hier eine Zahl von bis zu 30 Pflanzen-Individuen angesehen, die zufällig in der gesamten Population (besammelte Wildpopulation, Kultur) beprobt werden (Blattprobe) und als Einzelprobe getrennt behandelt werden. Für jede zu analysierende Pflanzenart sind somit, je nach Größe der Stichprobe mit 540 bis mit bis zu 1800 Pflanzenproben zu untersuchen (>54 Herkünfte, (>44 aus 22 Regionen + 10 außerhalb Deutschlands)) x 10 bzw. x 30 Individuen). Die Zahl der pro Herkunft genetisch zu analysierenden Proben ist methodenabhängig, vgl. richtet sich nach der Methode.

Mit Hilfe dieser Referenzproben kann der Herkunftsnachweis optimiert werden, indem regions- oder populations-spezifische Marker identifiziert werden können, oder die Anzahl nötiger Proben ermittelt werden kann.

5.3 Verfahren der Herkunftskontrolle

Für die Herkunftskontrolle kann die Datenbasis der genetischen Karte herangezogen werden, in der alle Regionen mit Proben vertreten sind. Allerdings ist nicht zwingend zu erwarten, dass es regionsspezifische Merkmale gibt, die eine unabhängige eindeutige Identifikation der Region erlaubt.

Eine sehr hohe Sicherheit zu Identifikation der Herkunft ist dagegen dann gegeben, wenn Vergleichsmaterial der potentiellen Herkünfte in Form von **Rückstellproben** vorliegt. Somit ergibt sich die einfacher zu beantwortende Frage, ob fragliches Pflanzenmaterial einer bestimmten eindeutig benannten Ursprungspopulation entspricht.

1. Anbieter/Sammler liefert von jeder Charge (Pflanzenart, Sammelstandort, Jahr) eine Rückstellprobe. Diese Probe besteht aus Material von 10-30 Pflanzenindividuen
 - Blattmaterial (junges Blatt, d.h. vor der Samenreife gesammelt, rasch getrocknet) vom Sammelstandort
 - oder Samen aus der Wildsammlung
 - oder aus Blattmaterial (rasch getrocknet) der F1-Generation der Aufsammlung

2. Eine fragliche Akzession wird in gleicher Weise beprobt.

3. Die fragliche Akzession, die Rückstellprobe ihrer potentiellen Herkunft und, soweit noch nicht analysiert, weitere Herkünfte werden zentral genotypisiert und in die Referenzdatenbank übernommen.

4. Die **Übereinstimmung einer fraglichen Akzession mit der Rückstellprobe** erfolgt durch Berechnung von genetischen Distanzen (z.B. Nei's Distanz, F_{ST} -Werte, Reynolds Distanz) zwischen diesen beiden und im Vergleich zu weiteren Herkünften. Eine kritische genetische Distanz, die als „Nicht-Übereinstimmung“ zu werten ist, muss vorher durch Parallelversuche ermittelt werden.

5. Der Herkunftsnachweis einer fraglichen Akzession ohne Rückstellprobe kann je nach Markertyp und Grad der vorher festgestellten Differenzierung zwischen möglichen Herkunftsregionen durch verschiedene Analysen ermittelt werden (s. Kap. 4.2):
 1. auf Individuen-Ebene über individuelle Zuweisungsstatistiken (assignment-Tests), die für jedes Individuum angeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit es aus welcher der untersuchten Herkünfte stammt.
 2. auf Populationsebene über die Berechnung genetischer Distanzen (z.B. Nei's Distanz, F_{ST} -Werte, Reynolds Distanz) zu vorhandenen Referenzproben (Rückstellproben und Datenbank mit Europa-weiten Aufsammlungen). Darauf aufbauend erfolgt mittels UPGMA die Erstellung eines Ähnlichkeits-Phänogrammes (Ähnlichkeits-Baum) oder mittels Ordinationsmethoden ein Ähnlichkeitsdiagramm.
 3. auf Individuen/Populationsebene durch modellbasierte bayesische Clustermethoden, die in einer gegebenen Gesamt-Population Genpools abgrenzen und Individuen/Populationen diesen Genpools zuordnen.

5.4 Kostenschätzungen

Für die folgenden Kalkulationen gehen hier davon aus, dass für die Genotypisierung von Mikrosatelliten-Markern als auch AFLP-Markern ein Kapillar-Sequenzierautomat verwendet wird, der zu 4-fach multiplexer Analyse fähig ist (z.B. ABI 3130). Dementsprechend werden fluoreszenzmarkierte PCR-Primer eingesetzt. Die Kosten (netto Verbrauchsmaterial) für die Genotypisierung einer Pflanzenprobe (inklusive DNA-Extraktion, PCR und Fragmentanalyse) sind für Mikrosatelliten und AFLP ähnlich und liegen bei 8€ bis 10€. Die Durchführung solcher Analysen durch kommerzielle Anbieter ist erst dann möglich, wenn die genetischen Marker und Auswerteverfahren optimiert sind. Die Kosten pro Genotypisierung belaufen sich

dann auf ca. 20€ für eine Mikrosatelliten-Genotypisierung inklusive DNA-Extraktion, PCR und Fragmentanalyse (z.B. Fa. Eurofins-MWG-biotech).

5.4.1 Etablierung von genetischen Markersystemen

Für jede Pflanzenart muss ein spezifisches genetisches Markersystem entwickelt werden, das die reproduzierbare Gewinnung von Genotyp-Daten erlaubt, die wiederum zur Herkunftszuordnung geeignet sein sollten, d.h. geographische Differenzierung effizient nachweisen können.

1. Mikrosatelliten

Bei solchen Pflanzenarten, für die Mikrosatelliten-Marker schon beschrieben sind (vgl. Tabelle 3.1). müssen diese für die jeweilige Laborsituation angepasst werden. Dazu zählt die Optimierung der PCR-Reaktion der individuellen Marker und Entwicklung von Multiplexreaktionen, die die spätere Arbeit zeit- und kosteneffizienter machen. Bei einer typischen Zahl von 8 Mikrosatelliten-Markern pro Art muss hier neben der Grundausstattung der fluoreszenz-markierten primer (ca. 800€) mit einem Aufwand von mindestens 100 individuellen Analysen gerechnet werden (ca. 800-1000€). Bei Arten ohne beschriebene Mikrosatelliten-Marker, oder wenn die publizierten Marker nicht praktikabel oder nicht informativ genug sind, ist für die kommerzielle Neuentwicklung mit einem Finanzbedarf von ca. 12.000-15.000€ zu rechnen.

2. AFLP

Die Etablierung von AFLP-Markern besteht im *screening* verschiedener PCR-Primerkombinationen über eine repräsentative Auswahl von Pflanzenproben einer Art. Es erfolgt eine Auswahl der Primerkombinationen nach der Zahl hochwertiger Fragmentlängen-Polymorphismen. In der Regel muss hier mit einem Aufwand von 200 individuellen Analysen gerechnet werden (ca. 2000€).

5.4.2 Erstellung einer Referenzdatenbank, „Genetische Karte“

Der Aufbau einer Referenzdatenbank, die die Markerausstattung (z.B. genetischer Fingerprint) unterschiedlicher Herkunftsgebiete enthält, ist eine Voraussetzung des gesamten Verfahrens, da nur durch einen groß angelegten genetischen Vergleich verschiedener Herkünfte gezeigt werden kann, welche räumlich-genetischen Strukturen vorliegen, und ob im Einzelfall eine Unterscheidung verschiedener Herkünfte möglich ist. Der Aufbau dieser ersten genetischen Karte muss als Vorleistung erbracht werden.

Für die oben veranschlagten 1800 Proben pro Pflanzenart für eine alle Herkunftsregionen umfassende Deutschland- bzw. europaweite genetische Karte ist entsprechend mit Kosten von ca. 14400 bis 18000€ pro Pflanzenart zu rechnen. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, dass die Zahl der Proben, die pro Population nötig sind, noch zu ermitteln ist und zunächst von einer großen Zahl (30) von zu untersuchenden Individuen ausgegangen wird.

5.4.3 Routine- oder Kontrolluntersuchungen an Saat- oder Pflanzgut

Eine Kontrolluntersuchung einer fraglichen Herkunft (Pflanzenart einer bestimmten Herkunft) besteht minimal in der Genotypisierung von Proben der fraglichen Herkunft und der Rückstellprobe dieser Herkunft und einer statistischen Analyse der genetischen Distanzen zwischen diesen Proben. Als Positivkontrolle und als Plausibilitätsnachweis sollten zusätzlich weitere Referenzproben analysiert werden, die aus der geographischen Nähe, also innerhalb der gleichen Region, und aus geographischer Ferne stammen, soweit diese nicht schon in der Datenbank vorliegen.

Je nach Genotypisierungsverfahren sind zwischen 10 (AFLP) und 25 (Mikrosatelliten) Individuen pro Herkunft zu analysieren (Die genannte Zahl der zu untersuchenden Individuen bedarf noch der Überprüfung im Einzelfall und kann sich gegebenenfalls nach unten korrigieren, da sie wiederum vom Grad der genetischen Differenzierung zwischen Populationen abhängt).

Im Ernstfall bei einfach gelagerter Fragestellung, bei der die Übereinstimmung einer fraglichen Samenprobe und der Rückstellprobe der vermeintlichen Herkunft festzustellen ist, entsteht unter den dargestellten Voraussetzungen ein Aufwand von minimal 20 bzw. 50 Genotypisierungs-Analysen, und es ist mit Kosten von ca. 200-500€ zu rechnen.

Bei einer erweiterten Frage mit zusätzlich 4 weiteren alternativen Herkunftsnamen ist mit einem finanziellen Aufwand von ca. 600-1500€ zu rechnen.

Für den Fall, dass die Analyse mit Sammelproben an Stelle von vielen einzelnen Individuen möglich ist, kann sich diese Summe entsprechend erheblich nach unten korrigieren.

5.5 Offene Fragen

Eine Reihe von methodischen Fragen, die ganz wesentlich die Machbarkeit des Herkunftsnachweises mittels genetischer Methoden bestimmen, muss offen bleiben und kann nur durch eine praktische Erprobung, z.B. im Rahmen eines Pilotprojektes geklärt werden:

- Analyse von Samenmaterial an Stelle von Blattmaterial. Die Sammlung von Blattmaterial als Rückstellprobe ist ein erheblicher Aufwand. Die Verwendung von Samen würde den Aufwand auf Seiten der Anbieter stark verringern. Die genetische Analyse von Samen ist grundsätzlich möglich, allerdings sind die DNS-Mengen pro Same z.T. sehr gering, so dass die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der genetischen Analysen beeinträchtigt werden kann. Dies könnte bei der AFLP-Analyse zu Problemen führen, da diese Methode auf gute DNS-Qualität und eine gewisse

DNS-Menge angewiesen ist. Bei Mikrosatelliten-Markern ist dagegen davon auszugehen, dass aus Samen eine Genotypisierung erfolgreich möglich ist.

- Analyse von Sammelproben (bulk-sample) an Stelle von Individuen. Dabei werden nicht einzelne Blatt- bzw. Samenproben individuell analysiert, sondern mehrere Proben vor der DNA-Extraktion vereinigt und die genetischen Analysen mit dieser Mischprobe durchgeführt. Dies würde den Aufwand für Laboranalysen um Faktor 10 verringern. Bei der Analyse von Sammelproben kann keine Aussage über die genetische Diversität innerhalb der Probe gemacht werden. Ein Herkunftsnachweis ist abhängig vom Grad der genetischen Differenzierung zwischen Populationen. Es gibt einzelne Beispiele für die erfolgreiche Anwendung von Sammelproben zur Beschreibung bzw. Identifikation von Kultivaren oder Akzessionen (Divaret *et al.* 1999; Erschadi *et al.* 2000; Sweeney & Danneberger 1997). Ob Sammelproben für den Herkunftsnachweis geeignet sind, ist fraglich, da komplexe genetische Muster entstehen können, bzw. unterschiedlich häufige, insbesondere seltene Allele schlecht reproduzierbare Ergebnisse liefern. Inwieweit die dominierenden häufigen Allele ausreichen, um eine Herkunft zu identifizieren, ist unklar. Die oben genannten Arbeiten untersuchten Kultivare bzw. Akzessionen selbstbestäubter Arten, bei denen eine reduzierte genetische Diversität zu erwarten ist. Dies steht im Gegensatz zu den hier zu untersuchenden Wildsammlungen, für die von hoher genetischer Diversität auszugehen ist, so dass die Eignung von Sammelproben sehr fraglich ist. Aufgrund des hohen Einspar-Potenzials sollte dennoch der Versuch unternommen werden, einen Herkunftsnachweis über Sammelproben durchzuführen.
- Einfluss durch Vermehrung während des Nachbaues. Es ist zu prüfen, wie stark die genetischen Parameter, wie z.B. die genetische Diversität, Allelausstattung, F_{ST} -Werte oder genetischen Distanzen einer Herkunft sich im regulären Nachbau durch nicht zu vermeidende Effekte verändern. So wurde gezeigt, dass allein durch den unterschiedlichen Samenertrag der einzelnen Pflanzen der Elterngeneration in der F1-Generation die Allelfrequenzen verändert sein können (Johnson 1998). Somit kann nicht mehr von einer 100%igen Übereinstimmung der Nachkommen-Generation mit der ursprünglichen Wildsammlung gerechnet werden. Dieser Effekt kann z.B. wegen unterschiedlicher Fitness verschiedener Genotypen auf Grund der Bodenverhältnisse im Nachbau potentiell groß sein. Wie stark solche Effekte sein können, kann nur durch Fallstudien geklärt werden, die vergleichend alle Vermehrungsschritte untersucht: 1) die Individuen der Wildsammlung, 2) die Samen der Wildsammlung, 3) F1-Generation und 4) F2-Saatgut bzw. weitere Generationen. Solche Versuche sollten begleitet werden von Modellrechnungen, die den Grad der genetischen

Differenzierung bestimmen der nötig ist um mit einem bestimmten Aufwand eine Herkunftszuordnung erfolgreich durchführen zu können.

- Herkunftsnachweis von Mischpopulationen. Werden zur Vermehrung verschiedene Herkünfte vereinigt, die an mehreren Orten innerhalb einer Herkunftsregion gesammelt wurden, so entsteht ein Herkunftsgemisch. Der Herkunftsnachweis für dieses neue Herkunftsgemisch kann einfacher sein als der für eine einzelne reine Herkunft, da weniger Herkünfte zu unterscheiden sind. Andererseits kann es ebenso sein, dass der Herkunftsnachweis schwieriger wird, wenn stark differenzierte Herkünfte gemischt werden.

6 Nachweismöglichkeiten des Vermehrungs- bzw. Anbauortes mittels Isotopen-Analysen

Für die Praxis kann es von Bedeutung sein, einen Nachweis darüber führen zu können, ob Saatgut/Pflanzgut aus einem bestimmten Betrieb stammt, unabhängig von der genetischen Identität des Materials. Mögliche Methoden zur Identifizierung des Anbauortes umfassen die Analyse von Element/Spurenelement-Gehalten der Pflanzen und die isotopenchemische Charakterisierung. Ähnliche Fragen wurden schon in anderen Projekten untersucht, und auch im Bereich der Lebensmittelsicherheit werden entsprechende Techniken bereits eingesetzt.

6.1 Methodische und theoretische Grundlagen

Die Hauptelemente der Biomasse liegen in meist 2 natürlichen stabilen Isotopen vor: Wasserstoff (H: 1/2; 2 = Deuterium), Sauerstoff (O: 16/18), Stickstoff (N: 14/15), Kohlenstoff (C: 12/13) und Schwefel (S: 32/34). Allgemein werden die Variationen als Verhältnisse zwischen dem seltenen und dem häufigen stabilen Isotop angegeben, also als D/H-, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnis. Stabile Isotope werden als so genannte δ -Werte in Promille angegeben und geben an, um wie viel Promille das gegebene Isotopenverhältnis von einem allgemein anerkannten Standard abweicht. Positive Werte zeigen eine Anreicherung, negative Werte eine Verdünnung/Abreicherung an. Bei allen chemischen und physikalischen Prozessen kann es unterschiedlich schneller Reaktion der verschiedenen Isotope desselben Elementes kommen. Die dabei auftretende Fraktionierung führt zu Veränderung des Anteils des schweren Isotops. In der Regel reagiert das leichtere Isotop schneller, so dass sich im Restsubstrat das schwere Isotop anreichert. Dies gilt generell. So steigt in Wasser durch Verdunstung der D/H- und der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Gehalt an. Da Verdunstung stark von der Temperatur abhängt, und das Wasser im globalen Wettergeschehen ständig Verdunstungsprozessen unterliegt, ist weltweit, kontinental und national eine starke Differenzierung der entsprechenden Isotopen-Signaturen im Regen- Grund- und Oberflächenwasser zu beobachten (Abbildung 6.1). Pflanzen, die das Wasser an einem bestimmten Ort aufnehmen, tragen damit die Isotopensignatur dieses Ortes. Wasserstoff- und Sauerstoffmoleküle des Wassers werden neben dem Luftsauerstoff in die pflanzliche Biomasse eingebaut, so dass auch trockene Bestandteile, wie Samen, die Signatur der aus dem Wasser stammenden Elemente aufnehmen. Auch Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel zeigen regionale und lokale Isotopensignaturen bedingt durch lokale Reservoirs (z.B. Düngung) und unterschiedliche Umsatzraten. Auch im pflanzlichen Stoffwechsel treten Fraktionierungen auf, so dass es zu unterschiedlichen Isotopensignaturen zwischen verschiedenen Pflanzenorganen, zu Unterschieden zwischen Pflanzen derselben Art und zwischen Arten am selben Standort kommen kann.

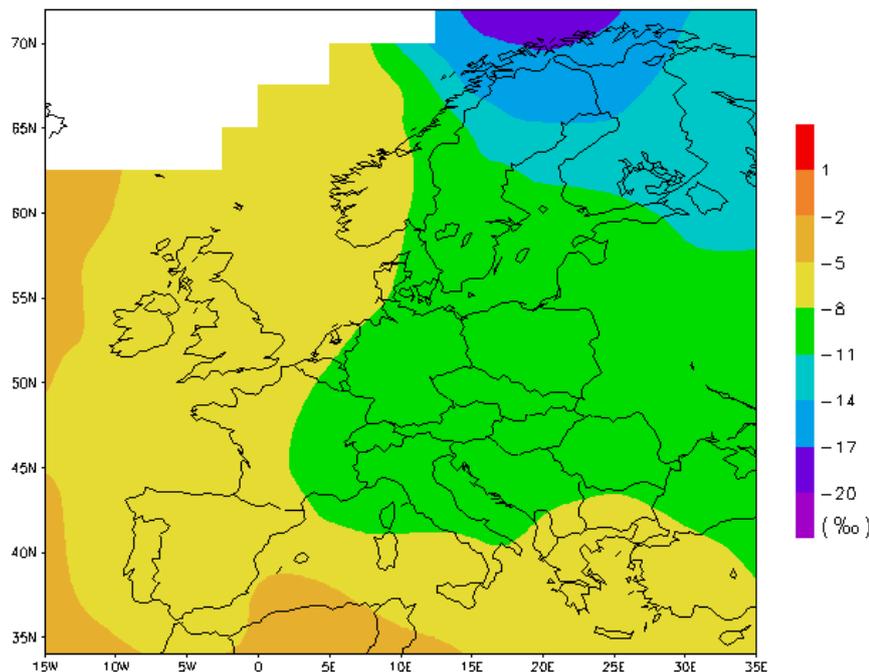
Weighted Annual $\delta^{18}\text{O}$ 

Abbildung 6.1. Isotopensignatur im Niederschlagswasser über Europa (IAEA, Wien).

Bei der Analyse der stabilen Isotope werden die Elemente mittels Pyrolyse oder Verbrennung aus der homogenisierten Probe (wenig mg) gasförmig freigesetzt, elementspezifisch behandelt und mittels Massenspektrometrie in ihrer isotopischen Zusammensetzung quantifiziert.

Die Analyse der stabilen Isotope wird schon heute erfolgreich zur Herkunftsbestimmung landwirtschaftlicher Produkte eingesetzt (Förstel & Gebhardt 2008). Es existieren entsprechende kommerzielle Angebote (<http://www.farm-id.de>).

Auch die Herkunftsbestimmung von forstlichem Saatgut mittels Isotopensignatur ist intensiv untersucht worden (Gebhardt 2008b; Gebhardt *et al.* 2008; Konnert *et al.* 2008; Steiner *et al.* 2008).

Die wichtigsten für den Herkunftsnachweis relevanten Ergebnisse :

- Es gibt große Unterschiede der Isotopensignatur zwischen verschiedenen Bäumen desselben Bestandes bei Eschen und Eichen (Steiner *et al.* 2008), andererseits wird berichtet, dass eine Identifikation individueller beernteter Bäume nicht möglich sei (Gebhardt 2008b). Insgesamt bedeutet dies, dass pro Bestand die Analyse von Mischproben mehrerer Individuen geeignet ist (Gebhardt 2008b; Gebhardt *et al.* 2008; Gebhardt & Schönfelder 2008). Um die Repräsentativität von Proben größerer Saatgutpartien sicherzustellen, sind mehrfache Ziehungen und Wiederholungen der Analysen erforderlich.

- Unterschiede zwischen Regionen existieren zwar, sie lassen sich aber ohne ein System von Referenzproben nicht zu unabhängiger Herkunftsidentifikation nutzen (Steiner *et al.* 2008).
- Für die Lagerung von Referenzproben gibt es klare Regeln: getrocknet in geschlossenen Behältern bei konstanter Temperatur (Gebhardt 2008b).
- Bei lokalen Einträgen von Dünger kann es in Bezug auf $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ zu großen Unterschieden innerhalb eines Bestandes kommen, die einen flächigen Trend aufweisen, womit die Ergebnisse stark vom Sammelort abhängen (Steiner *et al.* 2008).
- δ -Werte aller Elemente, insbesondere aber von Wasserstoff und Sauerstoff weisen große annuelle Unterschiede auf. Referenzproben müssen demnach aus jedem Jahr vorliegen (Gebhardt 2008b; Steiner *et al.* 2008).
- Die Analyse von zwei Isotopen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) erlaubte die Identifikation der Herkünfte von Buchen- und Erlensaatgut unter Einsatz von Diskriminanzanalysen (Gebhardt 2008b).
- Eine sehr zuverlässige Herkunftszuordnung von Saatgutpartien von Bergahorn, Fichte und Weißtanne ist möglich durch multi-Element-Analyse (D/H-, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) bei Kreuzvalidierung mit Referenzproben und mit Hilfe von Diskriminanzanalysen (Gebhardt *et al.* 2008).

6.2 Praktisches Verfahren und Kosten

In Analogie zu den Erfahrungen aus der Lebensmitteluntersuchung und den Versuchen an forstlichem Saatgut ist davon auszugehen, dass Isotopenanalysen prinzipiell in der Lage sind, Herkunftszuordnungen auch an Samen von Krautigen / Zwergsträuchern durchzuführen.

Probenahme Rückstellproben

Von jeder in Frage kommenden Charge (Pflanzenart, Anbauort, Jahr) wird eine repräsentative Stichprobe aus mehreren 1000 Samen bzw. 10 g Samengewicht gewonnen, getrocknet, luftdicht verpackt und kühl und dunkel gelagert. Es ist vom Vermehrer sicherzustellen, dass eine Charge homogen ist, d.h. falls z.B. mehrere Ernten vereinigt werden, muss ausreichend gemischt werden.

Testphase

In einer Testphase ist experimentell zu prüfen, ob Herkunftszuordnung von Regiosaatgut mit Isotopensignaturen mittels einer multi-Element-Analyse (D/H-, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) möglich ist. Dazu werden für mehrere Pflanzenarten je mindestens 10 Herkünfte charakterisiert und mittels Diskriminanzanalyse die Trennschärfe und Zuordnungssicherheit untersucht. Es ist insbesondere zu untersuchen, wie groß die Schwankungsbreiten innerhalb und wie groß die Unterschiede zwischen den

Herkunftsregionen sind. Hierdurch müssen Teststatistiken entwickelt werden (Konfidenzintervalle), die es erlauben, Übereinstimmung bzw. Nicht-Übereinstimmung festzustellen.

Ernstfall

Tritt der Fall ein, dass für fragliches Saatgut die Herkunft festzustellen ist, muss die fragliche Probe, die vermeintliche Ursprungsherkunft und mehrere alternative Herkünfte isotopenchemisch untersucht werden. Mit Hilfe der unabhängig davon gewonnenen Kenntnis über Konfidenzintervalle kann dann über die Identität der fraglichen Probe mit der vermeintlichen Herkunft entschieden werden. Der Abgleich einer einzelnen fraglichen Probe mit einer Datenbank mit anderweitig gewonnenen Daten ist nicht ausreichend, es sei denn, sie stammen aus demselben Jahr. Ebenso ist der Aufbau einer flächendeckenden Referenzdatenbank alleine nicht Ziel führend, da annuelle Schwankungen einen Vergleich zwischen Jahren unmöglich machen.

Analyse

z.B. Agroisolab GmbH, Jülich
Fa. traXperts, Lüneburg

Kosten

Die Kosten für eine sogenannte „Vollanalyse“ (D/H-, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) belaufen sich bei einer Einzelmessung auf ca. 400€ zzgl. MWST. (pers. Mitt. J. Lickfett, Fa. traXperts, Lüneburg)

Die Validierung des Verfahrens während einer Testphase (mindestens 5 Pflanzenarten x 20 Herkünfte) würde entsprechend mehrere 10.000€ umfassen.

Im Ernstfall bei einfach gelagerter Fragestellung, bei der die Übereinstimmung einer fraglichen Samenprobe und der Rückstellprobe der vermeintlichen Herkunft festzustellen ist, ist somit für 2 Vollanalysen mit Kosten von ca. 1000€ zu rechnen.

Bei einer erweiterten Frage mit zusätzlich 4 weiteren alternativen Herkünften ist mit einem finanziellen Aufwand von ca. 3.000€ zu rechnen.

7 Abschließende Bewertung

In den vorhergehenden Kapiteln wurde dargelegt, dass sich Pflanzen verschiedener geographischer Herkünfte sowohl genetisch als auch isotopenchemisch unterscheiden können. Somit können die vorgestellten Methoden mittels genetischer bzw. isotopenchemischer Merkmale zur Charakterisierung von Pflanzenproben verwendet, bzw. einer weiteren Prüfung unterzogen werden, inwiefern die vorhandenen regionalen Unterschiede nachweisbar sind. Allerdings sind die beiden Methoden in ihrer Aussagekraft nicht austauschbar, sondern ergänzen sich, da sie unterschiedliche Sachverhalte wiedergeben: einerseits die vererbte genetische Ebene, andererseits die stoffliche, am Wuchsort erworbene Ebene. Die gleiche genetische Herkunft wird unterschiedliche Isotopensignatur zeigen, wenn sie an unterschiedlichen Orten vermehrt werden. Andererseits werden genetisch unterschiedliche Herkünfte die gleiche Isotopensignatur aufweisen, wenn sie am selben Ort vermehrt werden.

Mit den beiden Methoden können somit unterschiedliche Sachverhalte geklärt werden, so dass das Ziel eines Herkunftsnachweises gegebenenfalls zu spezifizieren ist:

- Mittels genetischer Methoden kann die genetische Herkunft geklärt werden, z.B. von welchem Standort bzw. aus welcher Region das ursprünglich gesammelte Samenmaterial stammt, was entweder direkt vermarktet oder weiter vermehrt wurde. Auch bei über einige Generationen vermehrtem Saatgut ist der Genotyp mit dem der Ursprungspopulation identisch (abgesehen von Selektionseffekten während der Vermehrung)
- Mittels isotopenchemischer Methoden kann der Wuchsort des vermarkteten Saatgutes unabhängig von seinem Genotyp geklärt werden.
- Handelt es sich bei fraglichem Pflanzenmaterial um nicht weiter vermehrtes, sondern direkt gesammeltes Saatgut, so ist Wuchsort und genetische Herkunft identisch und beide Methoden sind geeignet, diesen zu identifizieren. Handelt es sich bei fraglichem Pflanzenmaterial um vermehrtes Saatgut, so ergeben die beiden Methoden unterschiedliche, sich ergänzende Information zu Herkunft und Vermehrungsort.

Sowohl die genetische wie auch die isotopenchemische Analyse sind mit erheblichem Finanzaufwand verbunden. Die bisher möglichen Kostenschätzungen belaufen sich für eine einfach gelagerte Fragestellung, ob eine fragliche Herkunft einer Pflanzenart einer bestimmten Rückstellprobe entspricht, auf mehrere 100€ bis zu 1000€. Durch Optimierung, insbesondere der genetischen Markersysteme, kann möglicherweise eine Kostenreduktion erreicht werden, was nur durch eine Pilotstudie im Praxismaßstab erprobt werden kann.

Literatur

- Abdala-Roberts L, Marquis RJ (2007) Test of local adaptation to biotic interactions and soil abiotic conditions in the ant-tended *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Oecologia* **154**, 315-326.
- Aegisdottir HH, Koller B, Kuss P, Stöcklin J (2000) Development and characterization of microsatellite DNA markers for the Alpine plant species *Campanula thyrsoides*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 996-997.
- Arrigo N, Tuszynski J, Ehrich D, Gerdes T, Alvarez N (2009) Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *BMC Bioinformatics* **10**, 33.
- Becker U, Colling G, Dostal P, Jakobsson A, Matthies D (2006) Local adaptation in the monocarpic perennial *Carlina vulgaris* at different spatial scales across Europe. *Oecologia* **150**, 506-518.
- Becker U, Dostal P, Jorritsma-Wienk LD, Matthies D (2008) The spatial scale of adaptive population differentiation in a wide-spread, well-dispersed plant species. *Oikos* **117**, 1865-1873.
- Bischoff A, Cremieux L, Smilauerova M, *et al.* (2006a) Detecting local adaptation in widespread grassland species - the importance of scale and local plant community. *Journal of Ecology* **94**, 1130-1142.
- Bischoff A, Vonlanthen B, Steinger T, Müller-Schärer H (2006b) Seed provenance matters - Effects on germination of four plant species used for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* **7**, 347-359.
- Bonin A, Bellemain E, Eidesen PB, *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**, 3261-3273.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S (2007a) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* **16**, 3737-3758.
- Bonin A, Nicole F, Pompanon F, Miaud C, Taberlet P (2007b) Population adaptive index: a new method to help measure intraspecific genetic diversity and prioritize populations for conservation. *Conservation Biology* **21**, 697-708.
- Bottin L, Tassin J, Nasi R, Bouvet JM (2007) Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. *Conservation Genetics* **8**, 99-109.
- Broadhurst LM, Lowe A, Coates DJ, *et al.* (2008) Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications* **1**, 587-597.
- Bucci G, Vendramin GG (2000) Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Molecular Ecology* **9**, 923-934.
- Bussell JD, Hood P, Alacs EA, *et al.* (2006) Rapid genetic delineation of local provenance seed-collection zones for effective rehabilitation of an urban bushland remnant. *Austral Ecology* **31**, 164-175.
- Coart E, Van Glabeke S, Petit RJ, Van Bockstaele E, Roldan-Ruiz I (2005) Range wide versus local patterns of genetic diversity in hornbeam (*Carpinus betulus* L.). *Conservation Genetics* **6**, 259-273.
- Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology* **15**, 2833-2843.
- Cremieux L, Bischoff A, Smilauerova M, *et al.* (2008) Potential contribution of natural enemies to patterns of local adaptation in plants. *New Phytologist* **180**, 524-533.

- Deguilloux MF, Pemonge MH, Bertel L, Kremer A, Petit RJ (2003) Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Molecular Ecology* **12**, 1629-1636.
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Petit RJ (2004) DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Annals of Forest Science* **61**, 97-104.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* **50**, 2515-2520.
- Divaret I, Margale E, Thomas G (1999) RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 1029-1035.
- Duchesne P, Bernatchez L (2002) AFLPOP: a computer program for simulated and real population allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* **2**, 380-383.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, LeCorre V, Petit RJ (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* **146**, 1475-1487.
- Durka W (2002) Chromosomenzahlen, Ploidiestufen und DNA-Gehalte. In: *BIOLFLOR - Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland* (eds. Klotz S, Kühn I, Durka W), pp. 57-73, Bonn.
- Edmands S (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* **16**, 463-475.
- Erschadi S, Haberer G, Schöniger M, Torres-Ruiz RA (2000) Estimating genetic diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 633-640.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* **7**, 574-578.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fjellheim S, Rognli OA, Fosnes K, Brochmann C (2006) Phylogeographical history of the widespread meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) inferred from chloroplast DNA sequences. *Journal of Biogeography* **33**, 1470-1478.
- Förstel H, Gebhardt K (2008) Die natürliche Variation und die Messung der stabilen Isotope als Kontrollmethode. In: *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*, pp. 16-36. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden.
- Galeuchet DJ, Husi R, Perret C, Fischer M, Gautschi B (2002) Characterization of microsatellite loci in *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae). *Molecular Ecology Notes* **2**, 491-492.
- Galeuchet DJ, Perret C, Fischer M (2005) Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology* **14**, 991-1000.
- Galloway LF, Fenster CB (2000) Population differentiation in an annual legume: Local adaptation. *Evolution* **54**, 1173-1181.
- Gebhardt K (2008a) Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom

- 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden.
- Gebhardt K (2008b) Unterscheidung von Saatgutpartien der Buche und Roterle anhand der Stabilisotopen- Signaturen ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) und Elementgehalte von Kohlenstoff und Stickstoff. In: *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*, pp. 51-66. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden.
- Gebhardt K, Konnert M, Förstel H (2008) Nachweis der Herkunft von Saatgutpartien des Bergahorns, der Fichte und der Weißtanne mit Hilfe stabiler Isotopen. In: *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*, pp. 101-110. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. M • nden.
- Gebhardt K, Schönfelder E (2008) Differentiation of seedlots of wild cherry by the analysis of stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$). *Austrian Journal of Forest Science* **125**, 121-134.
- Geburek T (2004) Die Weitergabe genetischer Information - eine wichtige Komponente bei der Waldverjüngung. *BFW-Praxisinformation* **Nr. 4**, 18-20.
- Gemeinholzer B, Bachmann K (2005) Examining morphological and molecular diagnostic character states of *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) and *C. spinosum* L. *Plant Systematics and Evolution* **253**, 105-123.
- Godt MJW, Hamrick JL (1998) Allozyme diversity in the grasses. In: *Populations biology of grasses* (ed. Cheplick GP), pp. 11-29. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gömöry D, Hynek V, Paule L (1998) Delineation of seed zones for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Czech Republic based on isozyme gene markers. *Annales des Sciences Forestières* **55**, 425-436.
- Gordon DR, Rice KJ (1998) Patterns of differentiation in Wiregrass (*Aristida beyrichiana*): implications for restoration efforts. *Restoration Ecology* **6**, 166-174.
- Goudet J (1995) FSTAT v-1.2: a computer program to calculate F -statistics. *The Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Grivet D, Petit RJ (2002) Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology* **11**, 1351-1362.
- Grivet D, Petit RJ (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics* **4**, 47-56.
- Gugerli F, Englisch T, Niklfeld H, *et al.* (2008) Relationships among levels of biodiversity and the relevance of intraspecific diversity in conservation - a project synopsis. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **10**, 259-281.
- Hale ML, Wolff K (2003) Polymorphic microsatellite loci in *Plantago lanceolata*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 134.
- Hampe A, Arroyo J, Jordano P, Petit RJ (2003) Rangewide phylogeography of a bird-dispersed Eurasian shrub: contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia. *Molecular Ecology* **12**, 3415-3426.
- Hamrick JL, Godt MJ (1990) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* (eds. Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43-63. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

- Hensen I, Oberprieler C, Wesche K (2005) Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora* **200**, 3-14.
- Hufford KM, Mazer SJ (2003) Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 147-155.
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**, 1898-1914.
- Hyman JR, Ansary ME, Simon PW (2004) Microsatellites for Carrot (*Daucus carota*).
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* **29**, e25.
- Johnson RC (1998) Genetic structure of regeneration populations of annual ryegrass. *Crop Science* **38**, 851-857.
- Joshi J, Schmid B, Caldeira MC, *et al.* (2001) Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecology Letters* **4**, 536-544.
- Jump AS, Hunt JM, Martinez-Izquierdo JA, Penuelas J (2006) Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica* *Molecular Ecology* **15**, 3469-3480.
- Kik C, Linders TE, Bijlsma R (1992) The distribution of cytotypes in ecologically contrasting populations of the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. *Evolutionary Trends in Plants* **6**, 93-98.
- Kik C, Linders TE, Bijlsma R (1993) Ploidy level and somatic chromosome-number variation in *Agrostis stolonifera*. *Acta Botanica Neerlandica* **42**, 73-80.
- Kik C, Vanandel J, Vandelden W, Joenje W, Bijlsma R (1990) Colonization and differentiation in the clonal perennial *Agrostis stolonifera*. *Journal of Ecology* **78**, 949-961.
- Klingenstein F, Wingender R (2000) Erfassung und Schutz der genetischen Vielfalt von Wildpflanzenpopulationen in Deutschland, Münster.
- Klotz S, Kühn I, Durka W (2002) *BIOLFLOR - Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland* Landwirtschaftsverlag, Bonn.
- Knapp EE, Rice KJ (1996) Genetic structure and gene flow in *Elymus glaucus* (blue wildrye): Implications for native grassland restoration. *Restoration Ecology* **4**, 1-10.
- Knapp EE, Rice KJ (1998) Comparison of isozymes and quantitative traits for evaluating patterns of genetic variation in purple needlegrass (*Nassella pulchra*). *Conservation Biology* **12**, 1031-1041.
- Kohlbeck M (2006) *Untersuchungen zur genetischen Variabilität und Populationsstruktur des Silbergrases, Corynephorus canescens* Diploma thesis, Univ. Erlangen-Nürnberg.
- Kölliker R, Enkerli J, Widmer F (2006) Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. *Molecular Ecology Notes* **6**, 50-53.
- Konnert M, Cremer E, Förstel H, Gebhardt K (2008) Umsetzung und Verbesserung des ZüF-Verfahrens mit Hilfe genetischer Analysen und der Stabilisotopen-Methode am Beispiel von Bergahorn, Fichte und Weißtanne. In: *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*, pp. 85-100. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden.

- Korbecka G, Vrieling K, Squirrell J, Hale ML, Wolff K (2003) Characterization of six microsatellite loci in *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Molecular Ecology Notes* **3**, 274-276.
- Krauss SL, He TH (2006) Rapid genetic identification of local provenance seed collection zones for ecological restoration and biodiversity conservation. *Journal for Nature Conservation* **14**, 190-199.
- Kuss P, Pluess AR, Aegisdottir HH, Stocklin J (2008) Spatial isolation and genetic differentiation in naturally fragmented plant populations of the Swiss Alps. *Journal of Plant Ecology*, rtn009.
- Landergott U, Naciri Y, Schneller JJ, Holderegger R (2006) Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 453-465.
- Leimu R, Fischer M (2008) A Meta-Analysis of Local Adaptation in Plants. *PLoS ONE* **3**, e4010.
- Leinonen T, O'Hara RB, Cano JM, Merilä J (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 1-17.
- Linhart YB, Grant MC (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 237-277.
- Macel M, Lawson CS, Mortimer SR, *et al.* (2007) Climate vs. soil factors in local adaptation of two common plant species. *Ecology* **88**, 424-433.
- McKay JK, Christian CE, Harrison S, Rice KJ (2005) "How local is local?" - A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology* **13**, 432-440.
- Medina RF, Barbosa P, Christman M, Battisti A (2006) Number of individuals and molecular markers to use in genetic differentiation studies. *Molecular Ecology Notes* **6**, 1010-1013.
- Mijnsbrugge KV, Bischoff A, Smith B (2009) A question of origin: where and how to collect seed for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* **in press**.
- Mills LS, Allendorf FW (1996) The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology* **10**, 1509-1518.
- Mix C, Arens PFP, Ouborg NJ, Smulders MJM (2004) Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite markers in *Hypochaeris radicata* (Asteraceae). *Molecular Ecology Notes* **4**, 656-658.
- Montalvo AM, Ellstrand NC (2000) Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: Testing the home-site advantage hypothesis. *Conservation Biology* **14**, 1034-1045.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, Grp SNPW (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 208-216.
- Morin PA, Martien KK, Taylor BL (2009) Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. *Molecular Ecology Resources* **9**, 66-73.
- Musche M, Settele J, Durka W (2008) Genetic population structure and reproductive fitness in the plant *Sanguisorba officinalis* in populations supporting colonies of an endangered *Maculinea* butterfly. *International Journal of Plant Sciences* **169**, 253-262.
- Negrini R, Nicoloso L, Crepaldi P, *et al.* (2009) Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. *Animal Genetics* **40**, 18-26.
- Nielsen LR, Kjær ED (2008) Tracing timber from forest to consumer with DNA markers, Electronic publication: www.skovognatur.dk/udgivelser. . Danish Ministry of the Environment, Forest and Nature Agency.

- Noel F, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, *et al.* (2005) Characterization of seven polymorphic microsatellites for the study of two Ranunculaceae: *Ranunculus nodiflorus* L., a rare endangered species and *Ranunculus flammula* L., a common closely related species. *Molecular Ecology Notes* **5**, 827-829.
- Novak J, Lukas B, Bolzer K, Grausgruber G, Degenhardt J (2008) Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* expressed sequence tag. *Molecular Ecology Resources* **8**, 599-601.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* **3**, 93-114.
- Peakall R, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Peter-Schmid MKI, Boller B, Kölliker R (2008a) Habitat and management affect genetic structure of *Festuca pratensis* but not *Lolium multiflorum* ecotype populations. *Plant Breeding*. **127**, 510-517.
- Peter-Schmid MKI, Kölliker R, Boller B (2008b) Value of permanent grassland habitats as reservoirs of *Festuca pratensis* Huds. and *Lolium multiflorum* Lam. populations for breeding and conservation. *Euphytica* **164**, 239-253.
- Petit RJ, Csaikl UM, Bordacs S, *et al.* (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks - Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* **156**, 5-26.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, *et al.* (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* **14**, 689-701.
- Pimentel M, Sahuquillo E, Catalan P (2007) Genetic diversity and spatial correlation patterns unravel the biogeographical history of the European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L., Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 667-684.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, *et al.* (2004) GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-859.
- Prentice HC, Malm JU, Hathaway L (2008) Chloroplast DNA variation in the European herb *Silene dioica* (red campion): postglacial migration and interspecific introgression. *Plant Systematics and Evolution* **272**, 23-37.
- Raabova J, Münzbergova Z, Fischer M (2007) Ecological rather than geographic or genetic distance affects local adaptation of the rare perennial herb, *Aster amellus*. *Biological Conservation* **139**, 348-357.
- Ramakrishnan AP, Meyer SE, Waters J, *et al.* (2004) Correlation between molecular markers and adaptively significant genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae) an inbreeding annual grass. *American Journal of Botany* **91**, 797-803.
- Rapson GL, Wilson JB (1988) Non-adaptation in *Agrostis capillaris* L. (Poaceae). *Functional Ecology* **2**, 479-490.
- Rendell S, Ennos RA (2002) Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe. *Molecular Ecology* **11**, 69-78.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83-109.
- Rice KJ, Knapp EE (2008) Effects of competition and life history stage on the expression of local adaptation in two native bunchgrasses. *Restoration Ecology* **16**, 12-23.

- Rice KJ, Mack RN (1991) Ecological genetics of *Bromus tectorum* 3. The demography of reciprocally sown populations. *Oecologia* **88**, 91-101.
- Rogers DL, Montalvo AM (2004) *Genetically appropriate choices for plant materials to maintain biological diversity* University of California, Lakewood, CO.
- Rohlf FJ (1998) *NTSYS-pc. Version 2.02k* Exeter Software, New York.
- Ronikier M, Costa A, Fuertes Aguilar J, et al. (2008) Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (Ranunculaceae): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. *Journal of Biogeography* **35**, 1650-1664.
- Saltonstall K (2002) Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2445-2449.
- Seitz B, Jürgens A, Hoffmann M, Kowarik I (2005) *Produktion und Zertifizierung herkunftsgesicherter Straucharten - Ein modellhafter Lösungsansatz zur Erhaltung der Biodiversität einheimischer Gehölze in Brandenburg (AZ 17379). Abschlußbericht* TU Berlin.
- Seitz B, Jürgens A, Kowarik I (2007) *Erhaltung genetischer Vielfalt: Kriterien für die Zertifizierung regionalen Saat- und Pflanzguts - Literatur-Studie.*
- Seitz B, Kowarik I (2008) Erhaltung der regionalen genetische Vielfalt durch die Verwendung gebieteigenen Saat- und Pflanzguts. *Natur und Landschaft* **83**, 441-443.
- Severns PM, Liston A (2008) Intraspecific chromosome number variation: a neglected threat to the conservation of rare plants. *Conservation Biology* **22**, 1641-1647.
- Sharbel TF, Albertini E, Galla G, et al. (2006) Developing and mappint molecular markers in *Hypericum perforatum* L. for investigating apomixis. In: *Proceedings of the 50th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Ischia, Italy - 10/14 September, 2006.*
- SKEW SKfdEvW (2003) Empfehlungen zur Gewinnung und Verwendung von standortgerechtem Saat- und Pflanzgut für die Anlage von ökologischen Ausgleichsflächen und die Neubepflanzung von weiteren Lebensräumen mit Artenlisten (inkl. Schwarze Liste), 01.01.2003.
- Smith BM, Diaz A, Daniels R, Winder L, Holland JM (2009) Regional and ecotype traits in *Lotus corniculatus* L., with reference to restoration ecology. *Restoration Ecology* **17**, 12-23.
- Smith RAH, Bradshaw AD (1979) Use of metal tolerant plant-populations for the reclamation of metalliferous wastes. *Journal of Applied Ecology* **16**, 595-612.
- Smith SL, Sher AA, Grant TA (2007) Genetic diversity in restoration materials and the impacts of seed collection in Colorado's restoration plant production industry. *Restoration Ecology* **15**, 369-374.
- Smulders MJ, Rus-Kortekaas W, Vosman B (2000) Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. *Genome* **43**, 208-210.
- Spieth PT (1974) Gene flow and genetic differentiation. *Genetics* **78**, 961-965.
- Squirrel J, Wolff K (2001) Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Plantago major* and *P. intermedia*. *Molecular Ecology Notes* **1**, 179-181.
- Steiner W, Hosius B, Gebhardt K (2008) Umwelt- und pflanzenbedingte Variation von Stabilisotopen. In: *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*, pp. 37-50. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden.

- Storz JF (2005) Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* **14**, 671-688.
- Studer B, Widmer F, Enkerli J, Kolliker R (2006) Development of novel microsatellite markers for the grassland species *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Molecular Ecology Notes* **6**, 1108-1110.
- Sweeney PM, Danneberger TK (1997) RAPD markers from perennial ryegrass DNA extracted from seeds. *Hortscience* **32**, 1212-1215.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- USDA (2009) Native Plant Materials. United States Department of Agriculture.
- van Andel J (1998) Intraspecific variability in the context of ecological restoration projects. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **1**, 221-237.
- Van Glabeke S, Coart E, Honnay O, Roldan-Ruiz I (2007) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Anthyllis vulneraria*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 477-479.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vendramin GG, Anzidei M, Madaghiale A, Sperisen C, Bucci G (2000) Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* **43**, 68-78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* **23**, 4407-4414.
- Weising K, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **42**, 9-19.
- White J, Law JR, MacKay I, *et al.* (2008) The genetic diversity of UK, US and Australian cultivars of *Triticum aestivum* measured by DArT markers and considered by genome. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 439-453.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal $1/(4Nm+1)$. *Heredity* **82**, 117-125.
- Whitlock R, Hipperson H, Mannrelli M, Butlin RK, Burke T (2008) An objective, rapid and reproducible method for scoring AFLP peak-height data that minimizes genotyping error. *Molecular Ecology Resources* **8**, 725-735.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* **163**, 1177-1191.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations, vol. IV, Variability Within and Among Natural Populations* University of Chicago Press, Chicago.
- Wu B, Liu N, Zhao H (2006) PSMIX: an R package for population structure inference via maximum likelihood method. *BMC Bioinformatics* **7**, 317.
- Wypukol H, Liepelt S, Ziegenhagen B, Gebhardt K (2008) Genetische Methoden zur Abstammungsanalyse und Prüfung von Sortenechtheit und -reinheit. In: *Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden. Tagungsband des Symposiums "Herkunftskontrolle" vom 7.-8.2.2008 in Kassel sowie Ergebnisse des gleichnamigen BMBF-Verbundprojektes FKZ 0330587*, pp. 67-84. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden.

Ziegenhagen B, Bialozyt R, Kuhlenkamp V, *et al.* (2003) Spatial patterns of maternal lineages and clones of *Galium odoratum* in a large ancient woodland: inferences about seedling recruitment. *Journal of Ecology* **91**, 578-586.