THÜNEN

Forstpflanzenzüchtung für die Praxis

6. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 16. bis 18. September 2019 in Dresden

Tagungsband

Mirko Liesebach (ed.)

Thünen Report 76

Bibliografische Information:
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikationen in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet unter www.dnb.de abrufbar.

Bibliographic information:
The Deutsche Nationalbibliothek (German National Library) lists this publication in the German National Bibliography; detailed bibliographic data is available on the Internet at www.dnb.de

Bereits in dieser Reihe erschienene Bände finden Sie im Internet unter www.thuenen.de

Volumes already published in this series are available on the Internet at www.thuenen.de

Zitationsvorschlag – *Suggested source citation:*
Liesebach M (ed) (2020) Forstpflanzenzüchtung für die Praxis : 6. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 16. bis 18. September 2019 in Dresden : Tagungsband. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen-Institut, 296p,
Thünen Rep 76, DOI:10.3220/REP1584625360000

Die Verantwortung für die Inhalte liegt bei den jeweiligen Verfassern bzw. Verfasserinnen.

The respective authors are responsible for the content of their publications.

THÜNEN

Thünen Report 76

Herausgeber/Redaktionsanschrift – *Editor/address*

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

thuenen-report@thuenen.de
www.thuenen.de

ISSN 2196-2324
ISBN 978-3-86576-209-2
DOI:10.3220/REP1584625360000
urn:nbn:de:gbv:253-202003-dn062169-3

Genetische Diversität von Douglasiensaatgut aus zugelassenen Erntebeständen und Samenplantagen – Schlussfolgerungen für die Praxis

HEIKE LIESEBACH, JANINE WOJACKI, BIRTE PAKULL und PASCAL EUSEMANN

Zusammenfassung

Die Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*) ist mit ca. 2 % der Waldfläche die häufigste fremdländische Forstbaumart in Deutschland. In zahlreichen Saatguterntebeständen und einigen Samenplantagen wird in Deutschland inzwischen so viel Saatgut geerntet, so dass nahezu eine Selbstversorgung mit Douglasiensaatgut besteht.

In einer Studie mit unterschiedlich großen Saatguterntebeständen und mit Samenplantagen wurden Saatgutproben - teilweise einzelbaumweise geerntet - untersucht. Das Saatgut von kleinen Populationen weist hohe Hohlkornanteile bis zu 40 % auf, was auf hohe Selbstungsanteile schließen lässt. Erwartungsgemäß nimmt die genetischer Diversität mit steigender Populationsgröße zu, bis ein Plateau erreicht wird. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit Mindestanforderungen an Saatguterntebestände der Kategorie „Ausgewählt“ diskutiert. Es wird vorgeschlagen, die Anforderungen für die Zulassung von Saatguterntebeständen der Kategorie „Ausgewählt“ zu aktualisieren. Eine Mindestzahl von 100 Bäumen ohne Fragmentierung wird für alle bestandesbildenden und windbestäubten Baumarten empfohlen.

Schlüsselworte: Forstliches Vermehrungsgut, Mindestanforderungen, *Pseudotsuga menziesii*, Mikrosatelliten-Marker, Elternschaftsanalyse

Abstract

Genetic diversity in Douglas fir seeds from approved seed stands and seed orchard – Conclusions for practice

Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) is the most frequent non-native forest tree species in Germany, covering about 2% of the forest area. Numerous approved seed stands and several seed orchards supply appropriate amounts of seed for a high level of self-sufficiency in Germany.

In the present study, seed stands of different sizes and seed orchards including their offspring samples were analysed. Seed from small populations show proportions of empty seeds up to 40 %, which suggests large amounts of selfing. As expected, the genetic diversity growths with increasing population size up to a plateau.

The results are discussed in relation to the minimum requirements for the approval of seed stands in the category “Selected”. We propose an update of the national regularities for forest reproductive materials. A minimum population size of 100 adult trees is recommended for all stand-forming and wind-pollinated tree species.

Keywords: Forest reproductive material, minimum requirements, *Pseudotsuga menziesii*, microsatellite markers, parentage analysis

Einleitung und Zielstellung

Die Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*) gehört zur Vielzahl der bestandesbildenden Koniferenarten, die im natürlichen Verbreitungsgebiet im Westen Nordamerikas sowohl in Mischung mit anderen Baumarten als auch in Reinbeständen vorkommt.

Die Bestäubungsverhältnisse in natürlichen Douglasienpopulationen wurden in den 1980er Jahren mit Isoenzymmarkern erstmals untersucht, wobei sich Fremdbefruchtungsraten zwischen 86 und 100 % ergaben (EL-KASSABY 1981, NEALE und ADAMS 1985). Selbstbestäubung ist relativ selten, sie kann aber in Samenplantagen, deren Klone mit mehreren Kopien vorhanden sind, bei einzelnen Klonen auf 21 – 44 % ansteigen (SHAW und ALLARD 1982). Nachkommen aus Selbstbestäubung weisen eine deutliche Inzuchtdepression auf. Diese zeigt sich durch geringere Überlebensraten und ein um 29 % geringes Höhenwachstum im Alter 10 im Vergleich zu Nachkommenschaften aus Fremdbefruchtung (SORENSEN und MILES 1982). Selbstbestäubung führt ebenfalls zu einem erhöhten Hohlkornanteil im Saatgut. Die Inzuchtrate, deren verschiedene Levels durch Kreuzungskombinationen hergestellt wurden, korrelierte bei Douglasie streng negativ mit der Anzahl Vollkörner je Zapfen (WOODS und HEAMAN 1989).

Die Einführung der Douglasie nach Europa seit dem 19. Jahrhundert hat in Deutschland zu vielen sehr kleinen und vergleichsweise wenigen größeren Beständen geführt (KOWNATZKI et al. 2011). Viele Douglasienbestände im reproduktiven Alter bringen Naturverjüngungen hervor und werden zur Saatgutgewinnung beerntet. Als Beispiele für Bestandesgrößen seien die Bundesländer Brandenburg und Rheinland-Pfalz genannt, wo 51 % bzw. 44 % der Flachen von zugelassenen Beerntungseinheiten bei Douglasie kleiner als 1 ha sind. Die Populationsgröße (Bestandesfläche und Individuenzahl) und das Vorkommen als Rein- oder Mischbestand sowie die genetische Struktur des Elternbestandes selbst können sich erheblich auf die genetische Struktur des Saatguts und damit auf die Qualität auswirken.

Das in Deutschland überwiegende Vorkommen der Douglasie in kleinen Populationen oder in Mischungen mit anderen Baumarten mit geringerem Mischungsanteil wird als problematisch angesehen. Einerseits kann bei zu geringer Populationsgröße die Anzahl synchron blühender Individuen zu niedrig sein, andererseits kann bei zu kleinem Anteil in Mischbeständen eine freie Bestäubung untereinander durch individuelle räumliche Isolation eingeschränkt sein. In beiden Fällen kann eine Grenze unterschritten werden, bei der ein zu hoher Anteil an Selbstbestäubung auftritt. Der generelle Mangel an Pollen wird neben Selbstbestäubung auch als eine wesentliche Ursache der Entstehung von Hohlkörnern angesehen (KNIGHT et al. 2005).

Der Einsatz von hochvariablen Mikrosatellitenmarkern erlaubt inzwischen weitaus detailliertere Untersuchungen zu Bestäubungsverhältnissen in Beständen und Samenplantagen von Koniferen, als es mit der Methode der Isoenzymanalyse möglich war. Das haben z. B. Untersuchungen an Populationen von *Pinus densiflora* (LIAN et al. 2001), *Thuja plicata* (O'CONNELL et al. 2004) und *Larix occidentalis* (FUNDA et al. 2008) sowie an Douglasien-Samenplantagen (SLAVOV et al. 2005a, EL-KASSABY et al. 2010) gezeigt. Bei einigen Koniferenarten wurden relativ große Inzuchtraten in kleinen Populationen festgestellt, wie bei *Pinus sylvestris* 25 % (ROBLEDO-ARNUNCIO et al. 2004), *Picea sitchensis* 9 – 35 % (MIMURA und AITKEN 2007) und *Abies fraseri* 22 % (POTTER et al. 2008).

Höhere Inzuchtanteile von 21 % wurden im Saatgut bei *Larix occidentalis* (EL-KASSABY und JAQUISH 1996) und ein höherer Hohlkornanteil bei *Picea jezoensis* (TOMITA et al. 2008) gefunden, wenn die entsprechende Baumart nur mit einem geringen Mischungsanteil im Bestand vorkam. Eine geringere Vitalität von Sämlingen aus Beständen geringer Dichte beobachteten ARISTA und TALAVERA (1996) bei *Abies pinsapo*. Generell konstatieren MIMURA und AITKEN (2007) für windbestäubende Arten, dass die Selbstbefruchtungsrate negativ mit der Populationsgröße und -dichte korreliert ist.

Neben den Untersuchungen von Douglasienpopulationen im natürlichen Verbreitungsgebiet gibt es zahlreiche Untersuchungen zu Bestäubungsverhältnissen in amerikanischen und kanadischen Samenplantagen (SLAVOV et al. 2005a, LAI 2009, EL-KASSABY et al. 2010). In europäischen Beständen wurden

dagegen nur wenige Untersuchungen durchgeführt. Der Schwerpunkt deutscher Arbeiten lag bisher auf der genetischen Charakterisierung und Unterscheidung der Küsten- und Inlandsvarietät mit Isoenzymmarkern, die auf eine Arbeit von LI und ADAMS (1989) zurückgeht (HOFFMANN und GEBUREK 1995, LEINEMANN 1996, KLUMPP 1999, KONNERT und RUETZ 2006). Beim Vergleich von Douglasien-Altbeständen und ihrem Saatgut in Frankreich wurden keine wesentlichen Änderungen bei den Allelfrequenzen an Isoenzymgenorten festgestellt, jedoch stieg der Anteil an Homozygoten an, was auf Paarung zwischen Verwandten zurückgeführt wurde (PRAT und ARNAL 1994). Im Saatgut von Douglasienbeständen in der Schweiz wurde ein höherer Inzuchtanteil von 14 – 32 % im Vergleich zu Saatgut aus dem natürlichen Verbreitungsgebiet ermittelt (STAUFFER und ADAMS 1993).

Einen höheren Hohlkornanteil und geringe Keimfähigkeit bei Saatgut aus bayrischen Beständen im Vergleich zu Import-Saatgut aus den USA wurden von KONNERT und RUETZ (2006) beobachtet, was ebenfalls auf erhöhte Inzuchtanteile hinweisen kann.

Es fehlen bisher jedoch detaillierte Daten zu den Bestäubungsverhältnissen sowie zu Fremdbefruchtungs- oder Inzuchtraten in kleineren Populationen, wie sie für diese nichtheimische Baumart in Deutschland typisch sind. Diese Studie soll diese Lücke schließen und aus gut fundierten Analysen Schlussfolgerungen für die praktische Umsetzung in der Saatgutgewinnung in Deutschland sowie zur Aktualisierung der Regularien im Zusammenhang mit dem Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) ableiten. Ziel ist letztendlich die Gewinnung von Saatgut, das für künftige Waldgenerationen besser geeignet ist als das derzeit verfügbare.

Material und Methoden

Charakterisierung der ausgewählten Douglasienpopulationen

Zur populationsgenetischen Analyse des Reproduktionsverhaltens wurden Saatguterntebestände unterschiedlicher Größe (alle der Küstenvarietät zugehörig, *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*, sog. grüne Douglasie), und Samenplantagen (ebenfalls grüne Douglasie) ausgewählt, wobei die Verfügbarkeit von Saatgut, möglichst aus einzelbaumweiser Beerntung, gewünscht war. Ersatzweise wurden auch Saatgut von Rückstellproben oder Jungpflanzen analysiert, um in jedem Fall Elternschaftsanalysen mit zwei beprobten Generationen durchführen zu können. Bei allen Beständen wurden die die Durchmesser der Altbäume ermittelt sowie mit einem LaserAce 1000 Entfernungsmesser ihre räumlichen Positionen über die Messung von Winkel und Entfernung zueinander . Die räumliche Verteilung wird benötigt, um später Bestäubungsdistanzen berechnen zu können. Die Tabelle 1 fasst die wichtigsten Parameter zu den zur Analyse ausgewählten Beständen zusammen.

Drebkau: Saatguterntebestand, 2008 zugelassen in der Kategorie "Ausgewählt", kleinster untersuchter Bestand, der gerade die Mindestanforderungen erfüllt, Mischung mit Kiefer und Fichte, isolierte Lage, aber eine kleine Gruppe von 8 Douglasien befindet sich in ca. 350-400 m Entfernung, Rückstellproben aus den Ernten von 2013 und 2014 waren vorhanden, einzelbaumweise Ernte für Versuchszwecke von 14 Bäumen wurde 2015 durchgeführt

Morschen: Saatguterntebestand, 2006 zugelassen in der Kategorie "Geprüft", nur noch 78 Bäume nach Windwurf, isolierter Bestand, Mischung mit Buche und Fichte, einzelbaumweise Saatgutproben von 24 Mutterbäumen während der kommerziellen Ernte 2016

Romrod: Saatguterntebestand, 2006 zugelassen in der Kategorie "Geprüft", isolierter Bestand, Mischung mit Buche, einzelbaumweise Saatgutproben von 34 Mutterbäumen während der kommerziellen Ernte 2016

Chorin: Saatguterntebestand, 1991 zugelassen in der Kategorie "Ausgewählt", größter untersuchter Bestand mit ca. 500 Bäumen, gemischt mit Kiefer und tlw. Buche, Rückstellprobe aus der Ernte von 2013

war vorhanden, wobei 28 Bäume am südlichen Rand des Bestands beerntet wurden, deshalb wurde die südliche Hälfte des Bestands beprobt

Voigtsdorf: Samenplantage, zugelassen in der Kategorie "Qualifiziert", mit Klonen der Herkunft Humtulips, 85 Bäume beprobt, die zu 16 Klonen gehören, da Saatgut nicht zur Verfügung stand, wurden Proben von Jungpflanzen aus einer Aufforstung im Revier Siedenbollentin verwendet

Niederfinow: Samenplantage, 1991 zugelassen in der Kategorie "Qualifiziert", 37 Klone selektiert aus dem Revier Kiekindemark (Herkunft Humtulips), ursprünglich 365 Pfropflingspflanzen auf 2,2 ha, einzelbaumweise Ernte von 30 Bäumen im Jahr 2014

Tabelle 1: Übersicht zu analysierten Douglasienbeständen und Samenplantagen

Art des Bestands	Population (Land)	Größe [ha	Anzahl Eltern	Dichte	Ca. Alter (Jahre)	Mittl. BHD (cm)	Anzahl Nachkommen
Kleine Ernte-bestände	Drebkau (BB)	0,3	42	140/ha	82	45 (20-70)	283 Samen (172 aus Rückstellproben + 111 einzelbaumweise)
	Morschen (HE)	0,7	78	111/ha	88	61 (26-89)	240 Samen einzelbaumweise
Große Ernte-bestände	Romrod (HE)	0,6	169	281/ha	80	49 (17-80)	310 Samen einzelbaumweise
	Chorin (BB)	3,5	253	72/ha	80	48 (17-71)	234 Samen aus Rückstellprobe
Samen-plantagen	Niederfinow (BB)	2,2	37 Klone		28		277 Samen einzelbaumweise
	Voigtsdorf (MV)	1,0	16 Klone, 85 Bäume		52		< 50 Jungpflanzen

Methoden zur Genotypisierung und Datenauswertung

Während der Präparation der Embryonen aus dem Saatgut (sowohl einzelbaumweise geerntet als auch bei Mischproben) wurde die Anzahl der vollen und hohlen Körner dokumentiert.

Die DNA-Extraktion aus Nadelproben sowie aus dem präparierten Embryo bei Saatgut erfolgte nach einem modifizierten ATMAP-Protokoll (DUMOLIN et al. 1995). Zur genetischen Charakterisierung der Elternbestände und des Saatguts wurden nukleare Mikrosatelliten eingesetzt, die sich zur Untersuchung von Bestäubungsverhältnissen bei vielen Arten bewährt haben. Für Douglasie standen solche Marker zur Verfügung (SLAVOV et al. 2004, SLAVOV et al. 2005b, KRUTOVSKY et al. 2009). Neun der 22 von SLAVOV et al. (2004) publizierten Mikrosatelliten-Marker konnten erfolgreich in zwei Multiplex-Sets mit sechs und drei Markern etabliert werden . Methodische Details wurden bereits publiziert (WOJACKI et al. 2019).

Nach der Erstellung von Genotypentabellen mit allen analysierten Individuen der Eltern- und Nachkommengeneration der untersuchten Bestände wurden mit Hilfe verschiedener Softwarepakete die benötigten Parameter berechnet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Software zur Auswertung populationsgenetischer Daten

Ziel	Benutzte Software	Literatur
Beurteilung der Markerqualität	CERVUS	KALINOWSKI et al. (2007)
Elternschaftsanalysen	COLONY	WANG (2004), WANG und SANTURE (2009), JONES und WANG (2010), WANG (2013)
Parameter zur Charakterisierung der genetischen Diversität	GenAlex, COLONY	PEAKALL und SMOUSE (2012)
Abstammungsdiagramme	Pedigree Viewer	KINGHORN und KINGHORN (2015)

Ergebnisse

Beurteilung der Markerqualität

Bei den im Jahr 2004 von Slavov entwickelten Mikrosatellitenmarkern für die Douglasie handelt es sich um „Marker der 1. Generation“, die sich zwar durch eine große Anzahl von Allelen auszeichnen, aber auch große Fragmentlängenbereiche besitzen. Dadurch sind sie grundsätzlich weniger multiplexgeeignet und anfällig für Alleldropouts im langen Fragmentbereich. Wie sich zudem herausgestellt hat, besitzen viele dieser Marker zahlreiche out-of-ladder-Allele und teilweise ausgeprägte Stotterbanden, was eine korrekte Allelidentifizierung erschwert.

Die hohe Variabilität der verwendeten Markerkombination und ihre sehr gute Eignung für Elternschaftsanalysen zeigt sich in den berechneten Ausschlusswahrscheinlichkeiten bei der Identifizierung von Elternpaaren in vier analysierten Douglasienerntebeständen, die zwischen $1{,}8 * 10^{-11}$ und $9{,}6 * 10^{-14}$ liegen. Die ermittelten geringen Fehlerraten zwischen 0,018 und 0,031 basierend auf den Elternschaftsanalysen zeigen, dass eine Auswertung auch schwieriger Marker zuverlässig möglich ist.

Saatgutqualität

In Tabelle 3 werden die mittleren Hohlkornanteile der einzelnen analysierten Saatgutpartien dargestellt. Die Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit des mittleren Hohlkornanteils in nicht gereinigten Saatgutproben in Abhängigkeit von der Populationsgröße der Elterngeneration. Bei zunehmender Populationsgröße sinkt der Hohlkornanteil im Saatgut deutlich ab. Der Zusammenhang zur Selbstungsrate und zum insgesamt vorhandenen Pollen und seiner Durchmischung wird später dargestellt. Abweichend mit einem deutlich unter der Kurve liegenden Hohlkornanteil liegt die Saatgutprobe aus der Samenplantage Niederfinow.

Tabelle 3: Hohlkornanteil von nicht gereinigten Saatgutproben

Population	Ernte-jahr	Anzahl beernteter Eltern	Anzahl präparierte Samen	Mittl. Hohlkorn-anteil	Anmerkung
Drebkau (BB)	2014		185	46 %	Rückstellprobe
Drebkau (BB)	2015	14	263	41 % (0-100)	Einzelbaumweise
Drebkau (BB)	2015	8	179	67 % (17-100)	Kleine Gruppe ca. 350-400 entfernt vom Erntebestand
Morschen (HE)	2016	24	736	26 % (0-97)	Einzelbaumweise
Romrod (HE)	2016	34	528	17 % (0-97)	Einzelbaumweise
SP Niederfinow (BB)	2014	32	435	16 % (0-52)	Einzelbaumweise

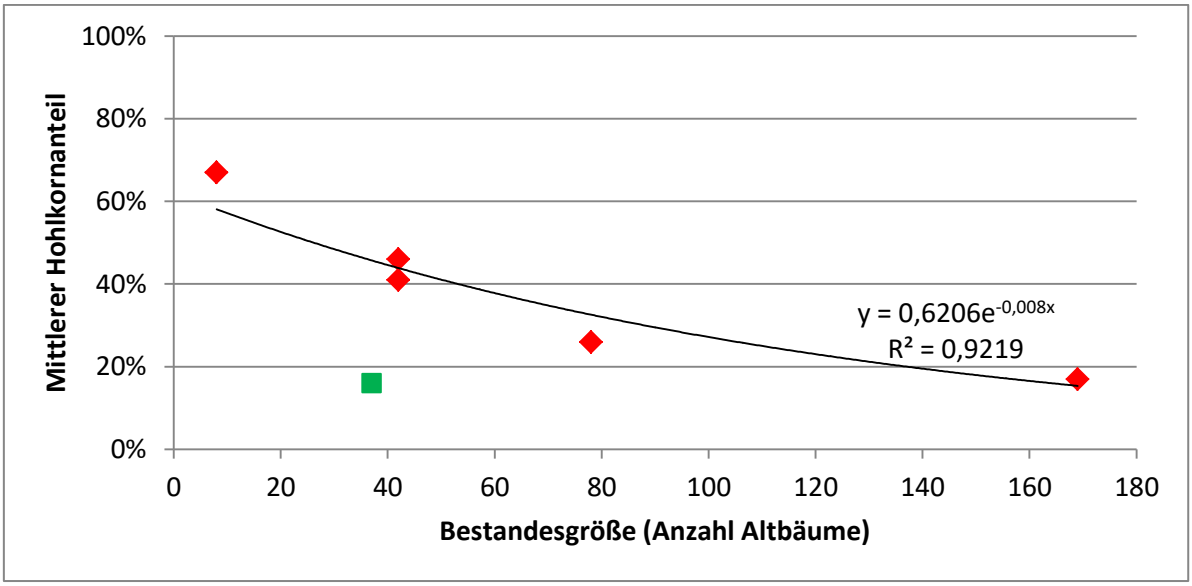

Abbildung 1: Mittlerer Hohlkornanteil in nicht gereinigten Saatgutproben von Douglasienpopulationen unterschiedlicher Größe (rot: Saatguterntebestände und beerntete kleine Gruppe, grün: Samenplantage mit 37 Klonen)

Genetische Diversität in der Eltern- und Nachkommengeneration

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über einige Parameter der genetischen Diversität als Mittelwerte über die 9 untersuchten Mikrosatellitenmarker.

Es wird deutlich, dass bei allen vier Saatguterntebeständen ein Verlust an genetischer Diversität im Saatgut im Vergleich zur Elterngeneration zu verzeichnen ist, wenn die mittlere oder die effektive Anzahl der Allele betrachtet wird. Die beobachtete und erwartete Heterozygotie bleiben als Charakteristikum der verwendeten Marker über die beiden analysierten Generationen hinweg weitgehend konstant. Eine Ausnahme bildet hier der kleinste Erntebestand Drebkau, bei dem durch einen hohen Selbstungsanteil im Saatgut (s. u.) die beobachtete Heterozygotie ebenfalls abnimmt.

Bei Saatgut aus der Samenplantage Niederfinow dagegen ist keine Abnahme bei der Anzahl der Allele und nur ein leichter Rückgang bei der effektiven Allelanzahl zu verzeichnen. Für die Samenplantage Voigtsdorf stand nur die sehr begrenzte Anzahl von weniger als 50 Individuen aus der Nachkommengeneration zur Verfügung. Auf eine Kalkulation populationsgenetischer Parameter wurde deshalb verzichtet.

Tabelle 4: Mittelwerte populationsgenetischer Parameter der Eltern bzw. Nachkommen von 5 Populationen für 9 Marker. N= Probenanzahl, A= Anzahl verschiedener Allele, Ae= Anzahl effektiver Allele, Ho= beobachtete Heterozygotie, He= erwartete Heterozygotie.

			Populationsgenetische Parameter				
	Population	**Generation**	**N**	**A**	**Ae**	**Ho**	**He**
Bestände unterschiedlicher Größe	Drebkau	Eltern	42	26,1	16,2	0,69	0,93
		Nachkommen	283	23,3	9,8	0,61	0,89
	Morschen	Eltern	78	33,3	16,8	0,69	0,93
		Nachkommen	240	31,7	14,2	0,70	0,92
	Romrod	Eltern	169	39,8	15,2	0,67	0,93
		Nachkommen	310	30,1	12,6	0,68	0,92
	Chorin	Eltern	253	39,7	16,8	0,63	0,93
		Nachkommen	234	30,1	12,4	0,63	0,91
Samenplantage	Niederfinow	Eltern	37	23,2	13,5	0,65	0,92
		Nachkommen	277	24,7	11,9	0,66	0,91

Ergebnisse der Elternschaftsanalysen

Von vier unterschiedlich großen Saatguterntebeständen und zwei Samenplantagen wurden jeweils die Eltern- und die Nachkommengeneration genotypisiert, um Elternschaftsanalysen zur Rekonstruktion der Bestäubungsverhältnisse durchzuführen. Dabei wurde die Software COLONY eingesetzt, die sich als am leistungsfähigsten erwiesen hat, wenn es um die Berücksichtigung von Nullallelen und evtl. Genotypisierungsfehlern handelt. Bei der Wiederholung der Analysen mit verschiedenen random seeds zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse und damit eine zuverlässige Datenanalyse, die auf ausreichend großen Stichproben und ausreichender Markervariabilität beruht.

Im Ergebnis der Elternschaftsanalyse (Tabelle 5) kann festgestellt werden, dass der Selbstungsanteil im Saatgut mit steigender Bestandesgröße von 13 % auf 1 % abnimmt. Bei den weitgehend isolierten Beständen Drebkau, Morschen und Romrod beträgt der Anteil an Fremdpollen an der Betäubung zwischen 11 und 18 %. Die 8 beprobten Bäume der kleinen Gruppe in der Nähe des Bestandes Drebkau haben nicht zur Bestäubung beigetragen. Bei der Population Chorin wurden 31 % „Fremdpollen“ ermittelt, wobei dieser Pollen wahrscheinlich größtenteils aus der nördlichen, nicht beprobten Hälfte des Bestandes stammt.

Bei der Elternschaftsanalyse des Saatguts aus der Plantage Niederfinow zeigt sich ein weitgehend mit den Erwartungen übereinstimmendes Ergebnis, wobei der überwiegende Teil der Nachkommen aus Bestäubungen innerhalb der Plantage stammt und der Selbstungsanteil sehr gering ist (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnisse der Elternschaftsanalysen von vier Douglasien-Saatguterntebeständen unterschiedlicher Größe und einer Samenplantage

Population	Drebkau	Morschen	Romrod	Chorin	SP Nieder-finow
Anzahl Eltern/Klone	42	78	169	253	37
Anzahl analysierter Nachkommen	283	240	310	234	286
Nachkommen mit zugeordnetem Elternpaar p>0,95	273 (96,6 %)	237 (98,8 %)	303 (97,6 %)	216 (92,3 %)	280 (97,9 %)
Fremdbestäubte Nachkommen, beide Eltern im Bestand	215 (76,1 %)	201 (83,9 %)	238 (76,9 %)	158 (67,5 %)	193 (67,5 %)
Fremdbestäubte Nachkommen, Pollen von außerhalb des Bestands	32 (11,3 %)	27 (11,3 %)	55 (17,7 %)	73 (31,2 %)	79 (27,7 %)
Nachkommen aus Selbstung	36 (12,7 %)	12 (5,0 %)	17 (5,6 %)	3 (1,3 %)	5 (1,8 %)
Anzahl reproduktiv erfolgreicher Eltern im Bestand	27	52	80	83	32
Geschätzte Anzahl Bestäuber von außerhalb des Bestands	4	18	22	26	11
Bestäubungsdistanz (Median), ohne Selbstungen	17,3 m	25,6 m	13,0 m	29,3 m	-

Die Mediane der Bestäubungsdistanzen für die vier analysierten Saatguterntebestände liegen zwischen 13 und 30 Metern. Je nach Bestand stammen 54 – 90 % der Pollenbeiträge aus einem Umkreis von 50 m um den Mutterbaum (Selbstungen sind hier nicht berücksichtigt). Die Mediane der Bestäubungsdistanzen (kein Mittelwerte wegen leptokurtischer Verteilung) verhalten sich umgekehrt proportional zur Bestandesdichte mit einem Korrelationskoeffizienten von r = - 0,9. In dichten Beständen sind die Bestäubungsdistanzen deutlich kleiner als in aufgelockerten oder mit Mischbaumarten durchsetzen Beständen. Bestäubungen finden überwiegend von benachbarten Pollenspendern statt, mehr oder weniger unabhängig davon, wie weit diese durchschnittlich entfernt sind. Zu große Entfernungen jedoch führen zur relativen Isolation, und damit sind erhöhte Selbstungsanteile zu erwarten.

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse von Elternschaftsanalysen als Abstammungsdiagramm wird in Abbildung 2 gezeigt. Dabei befinden sich in der oberen Zeile die Bäume der Elterngeneration und in der unteren Zeile die untersuchten Nachkommen. Jeder Nachkomme ist durch 2 Linien mit der

Elterngeneration verbunden. Eine rote Linie steht für die mütterliche Abstammung und eine blaue Linie für die väterliche (sichere Unterscheidung der Geschlechter nur bei bekannter Mutter bei einzelbaumweiser Beerntung). Eine grüne Linie symbolisiert Selbstung. Es wird deutlich, dass für das Beispiel des Bestandes Drebkau wenige Elternbäume sehr große Anteile zur Nachkommenschaft beitragen, während die Mehrzahl der Elternbäume genetisch nur wenig in der Nachkommenschaft repräsentiert ist. Besonders hervorzuheben ist der große Anteil des Baums A1 an der Nachkommenschaft (Abb.3). Dieser Baum hat den größten Durchmessser (67 cm) aller Douglasien dieses Bestandes und die größte Krone. Bei der einzelbaumweisen Beerntung zeigte er einen Hohlkornanteil von 47 % und in den insgesamt analysierten Vollkörnern eine Selbstungsrate von 30 %. Offensichtlich hat dieser Baum in den untersuchten Samenjahren eine so starke Pollenwolke ausgebildet, dass andere Bestäuber wenig konkurrenzfähig waren.

Bei den anderen drei untersuchten Beständen sind die genetischen Beiträge der Einzelbäume zur Nachkommenschaft mit zunehmender Bestandesgröße ausgewogener, und sowohl Hohlkornanteil als auch Selbstungsrate nehmen deutlich ab.

Das Abstammungsdiagramm (Abbildung 4) der analysierten Nachkommen der Samenplantage Niederfinow zeigt, dass im einzelklonweise geernteten Saatgut einheitlich große weibliche Beiträge vorliegen, jedoch deutlich unterschiedlich große Pollenbeiträge der Elternklone zu verzeichnen sind.

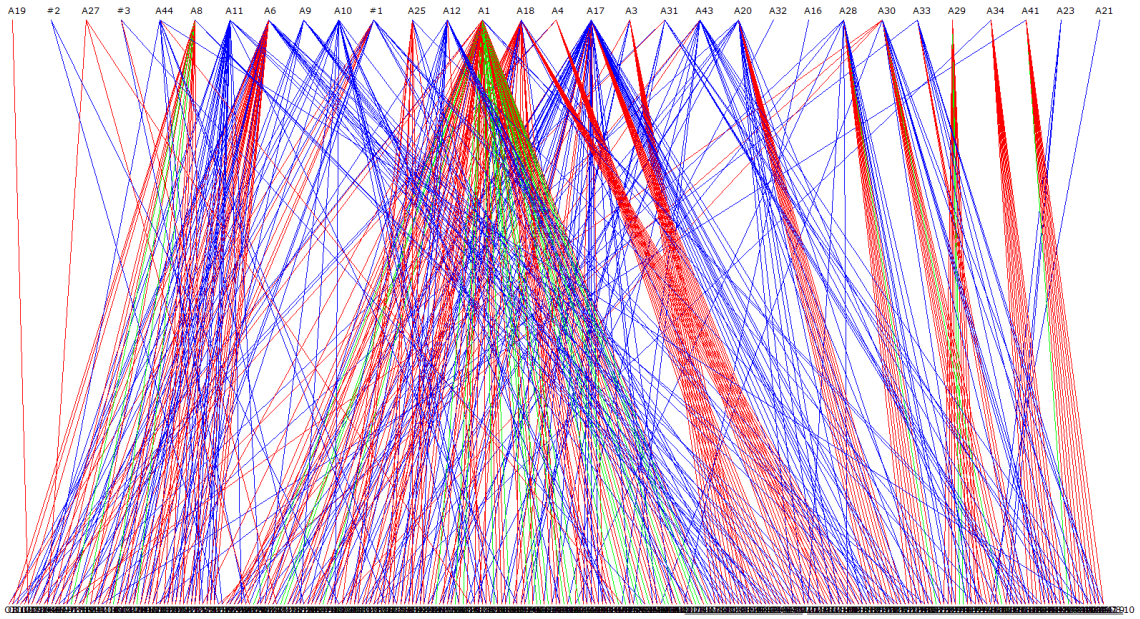

Abbildung 2: Abstammungsdiagramm im Saatguterntebestand Drebkau: Abstammung der meisten Samen von nur sehr wenigen Eltern

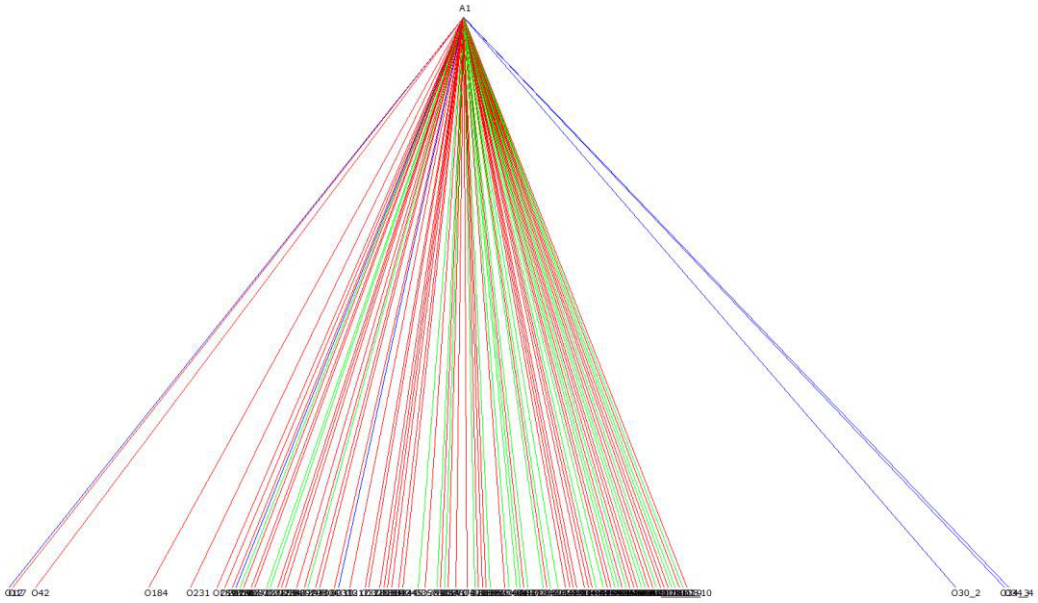

Abbildung 3: Abstammungsdiagramm im Saatguterntebestand Drebkau: Ausschnitt der Nachkommenschaft von Baum A1

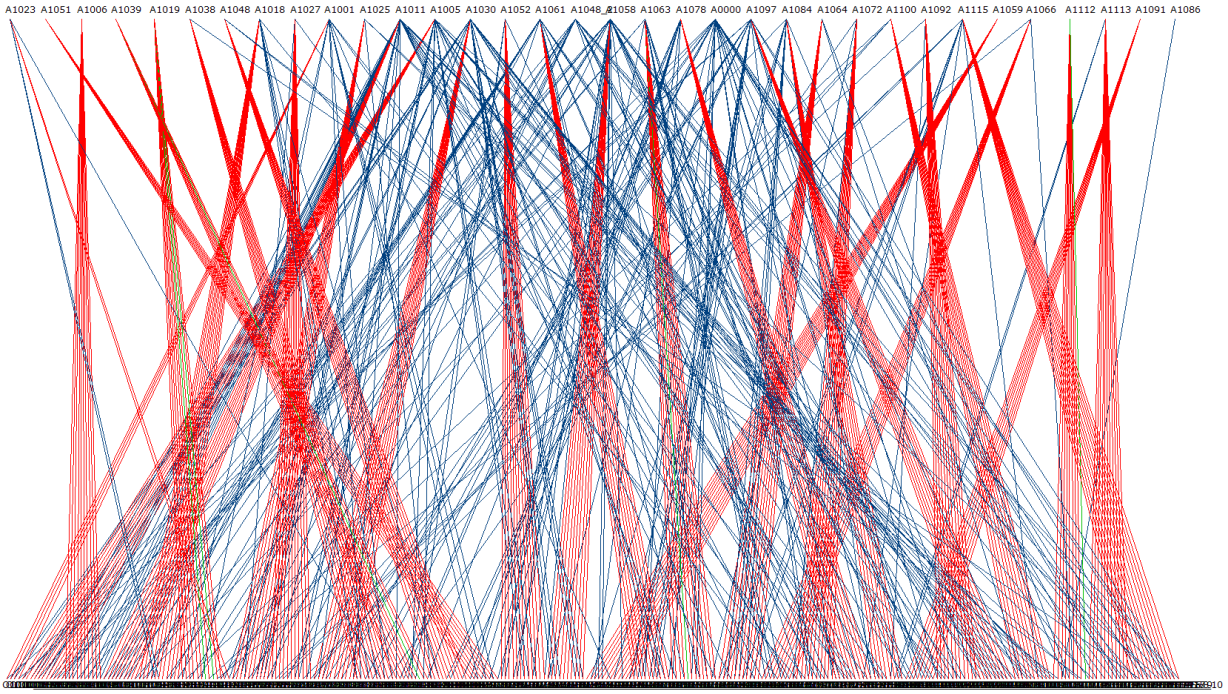

Abbildung 4: Abstammungsdiagramm der Samenplantage Niederfinow: einzelklonweise geerntetes Saatgut zeigt einheitlich große weibliche Beiträge im Saatgut, jedoch deutlich unterschiedlich große Pollenbeiträge der Elternklone

Schlussfolgerungen

Die Anzahl der Elternbäume, die genetisch zur Nachkommenschaft beiträgt und die mehr oder weniger ausgewogenen Anteile dieser einzelnen Eltern haben einen großen Einfluss auf die genetische Diversität in

der Nachkommenschaft. Die in der Populationsgenetik üblichen Mittelwerte von Parametern, die über die einzelnen Marker hinweg berechnet werden (Tabelle 4) können hier nur einen Teil der Informationen liefern.

Die Abbildung 5 fasst alle ermittelten Parameter zusammen und bezieht zusätzlich die sog. effektive Populationsgröße mit ein. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Bäume des Elternbestands dargestellt, die hier die Werte 42, 78, 169 und 253 für die vier untersuchten Bestände annimmt. Auf der y-Achse sind die Parameter der jeweiligen Nachkommenschaften aufgetragen. In rot dargestellt sind Qualitätseigenschaften des Saatguts als Vollkornanteil und als Fremdbefruchtungsanteil. Sie nehmen mit steigender Größe des Elternbestands zu. Mit blauen Symbolen werden die Mittelwerte der populationsgenetischen Parameter verdeutlicht, die nur vom kleinsten Bestand mit 42 Bäumen zum nächsten mit 78 Bäumen zunehmen und dann ein Plateau erreicht haben. Die effektiven Populationsgrößen (schwarze Symbole) im Saatgut berücksichtigen die Verwandtschaftsbeziehungen der Nachkommenschaftsindividuen untereinander. Je weniger Eltern zum Saatgut beitragen und je ungleichmäßiger deren Anteile verteilt sind, desto enger ist die Verwandtschaft und damit sinkt die effektive Populationsgröße. Dieser Parameter ist zusätzlich zu den Mittelwerten wie Anzahl der Allele oder Heterozygotie zu betrachten und erreicht ein Plateau erst beim dritten Bestand mit 169 Altbäumen.

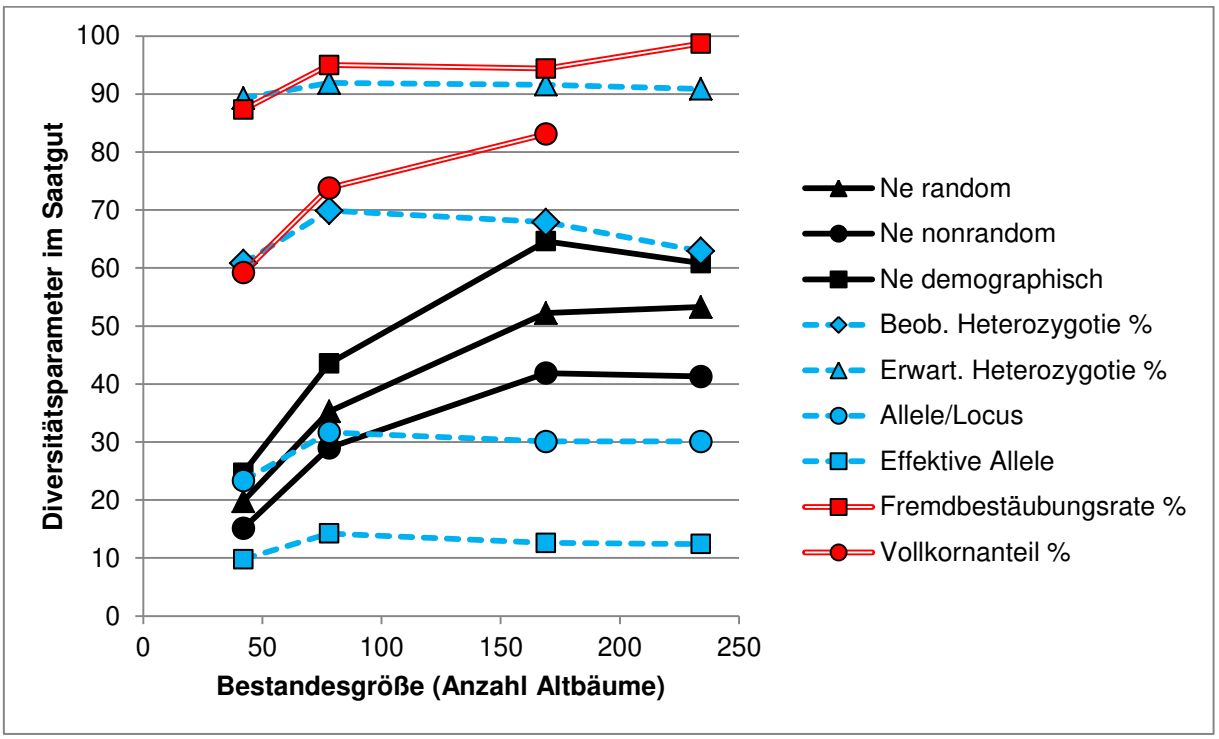

Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung der Saatguteigenschaften (y-Achse) in Abhängigkeit von der Größe des Elternbestands (x-Achse) bei vier untersuchten Douglasienbeständen, detaillierte Erklärungen im Text

Die bisher vorliegenden Daten zu Elternschaftsanalysen in Douglasiensamenplantagen sind noch zu lückenhaft, um schon gut fundierte Schlussfolgerungen für die Anlage zukünftiger Plantagen abzuleiten. Weitere Untersuchungen sind durchgeführt worden und werden derzeit noch ausgewertet.

Als vorläufiges Ergebnis kann festgestellt werden, dass trotz geringer Klonzahl (kleiner als beim kleinsten untersuchten Erntebestand) insgesamt eine größere Pollenproduktion stattfindet und durch die wiederholte und randomisierte Anordnung der Klone auf der Fläche eine viel bessere Durchmischung

stattfindet. Zu große lokale Pollenwolken eines einzigen Klons werden so eher vermieden und damit sinkt auch die Wahrscheinlichkeit der Selbstbestäubung.

Mit einer relativ gleichmäßigen Beerntung aller Plantagenklone kann eine gut ausgewogene Verteilung der mütterlichen genetischen Beiträge angestrebt werden. Die Pollenbeiträge variieren erwartungsgemäß stärker.

Empfehlungen zur Aktualisierung der Anforderungen für die Zulassung von Saatguterntebeständen in Deutschland

Aus dem Vergleich und der Bewertung der Analyseergebnisse von unterschiedlich großen Saatguterntebeständen und Samenplantagen lassen sich folgende wesentliche Empfehlungen ableiten:

Zugelassene Saatguterntebestände der Douglasie sollen aus mindestens 100 Altbäumen bestehen.

- Die Saatgutqualität (Vollkornanteil, Fremdbefruchtungsanteil) nimmt mit steigender Bestandesgröße zu.
- Die ermittelten Parameter der genetischen Diversität nehmen ebenfalls mit steigender Bestandesgröße zu, wobei ein Plateau erst bei Beständen mit deutlich mehr als 100 Altbäumen erreicht wird.
- Die Mindestzahl von 100 reproduktionsfähigen Bäumen zur Zulassung als Erntebestand wäre ein Kompromiss aus dem Vorteil, den in Deutschland produziertes Saatgut bieten könnte, welches wahrscheinlich schon einen gewissen Anpassungsprozess durchlaufen hat, und einem Mindestmaß an Qualität und genetischer Diversität, um ein Anpassungspotential zu erhalten. Diese Mindestzahl als Zulassungskriterium ist aus populationsgenetischer Sicht **generell für bestandesbildende und windbestäubte Baumarten** zu empfehlen. Bei einheimischen Baumarten dürfte das Erreichen dieser Mindestzahl kein Problem darstellen, bei anderen fremdländischen Baumarten wäre dieses aber ebenso zu berücksichtigen.

Zugelassene Douglasien-Saatguterntebestände sollen eine wirkliche Bestäubungseinheit bilden, d. h. sie dürfen nicht fragmentiert sein.

- Die ermittelten Bestäubungsdistanzen zeigen, dass der überwiegende Anteil des bestäubenden Pollens aus unmittelbarer Nähe kommt und dass die Anteile an Bestäubungen von außerhalb des Bestands (fremdländische Baumart mit ca. 2 % Waldanteil) relativ gering sind. Im Mittel kommen 75 % des Pollens aus einem Umkreis von 50 m um den Mutterbaum.
- Die Zusammenfassung von bis zu 200 m voneinander getrennten Populationen, die allein nicht die Zulassungskriterien erfüllen würden, zu einer Ernteeinheit ist nicht zu empfehlen.

Bei Samenplantagen, die aus selektierten Klonen bestehen und die in mehrfacher Wiederholung auf größerer Fläche angepflanzt sind, gelten andere Kriterien als bei Erntebeständen.

- Die Mindestzahl kann hier deutlich geringer sein als 100 Klone, da hier insgesamt größere Pollenmengen produziert werden und durch die randomisierte Anordnung auf der Fläche eine viel bessere Durchmischung stattfindet. Bei der Beerntung soll auf eine ausgewogene Beerntung aller Plantagenklone geachtet werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich ganz herzlich beim Waldklimafonds für die Förderung der Verbundprojekte “FitForClim” und “AdaptForClim”, bei Frau Diana Ahnert und Herrn Falk Schäfer aus dem Thünen-Institut für Forstgenetik in Waldsieversdorf für die exzellente Laborarbeit zur Genotypisierung bzw. für die Unterstützung bei der Feldarbeit, bei

Frau Dagmar Schneck von der Landesstelle Forstliches Vermehrungsgut in Waldsieversdorf für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial sowie bei allen beteiligten Forstämtern und Waldbesitzern für die Zusammenarbeit auf den jeweiligen Flächen und Unterstützung bei der Probenahme.

Literatur

ARISTA M, TALAVERA S (1996) Density effect on the fruit-set, seed crop viability and seedling vigour of *Abies pinsapo*. Annals of Botany 77: 187-192

DUMOLIN S, DEMESURE B, PETIT RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. TAG Theoretical and Applied Genetics 91 (8): 1253-1256

EL-KASSABY YA (1981) Estimation of the outcrossing rate of Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] using allozyme polymorphisms. Silvae Genetica 30 (6): 182-184

EL-KASSABY YA, FUNDA T, LAI BSK (2010) Female Reproductive Success Variation in a *Pseudotsuga menziesii* Seed Orchard as Revealed by Pedigree Reconstruction from a Bulk Seed Collection. Journal of Heredity 101 (2): 164-168

EL-KASSABY YA, JAQUISH B (1996) Population Density and Mating Pattern in Western Larch. Journal of Heredity 87 (6): 438-443

FUNDA T, CHEN CC, LIEWLAKSANEEYANAWIN C, KENAWY AMA, EL-KASSABY YA (2008) Pedigree and mating system analyses in a western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) experimental population. Annals of Forest Science 65 (7): 705

HOFFMANN C, GEBUREK T (1995) Allozyme variation of indigenous Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO] populations and their descendants in Germany. Silvae Genetica 44 (5-6): 222-225

JONES OR, WANG J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Molecular Ecology Resources 10 (3): 551-555

KALINOWSKI ST, TAPER ML, MARSHALL TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology 16 (5): 1099-1106

KLUMPP RT (1999) Untersuchungen zur Genökologie der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco). 1-242 p Göttingen, Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie der Georg-August-Universität

KNIGHT TM, STEETS JA, VAMOSI JC, MAZER SJ, BURD M, CAMPBELL DR, DUDASH MR, JOHNSTON MO, MITCHELL RJ, ASHMAN T-L (2005) Pollen limitation of plant reproduction: Pattern and Process. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 36 (1): 467-497

KONNERT M, RUETZ W (2006) Genetic aspects of artificial regeneration of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in Bavaria. European Journal of Forest Research 125 (3): 261-270

KOWNATZKI D, KRIEBITZSCH W-U, BOLTE A, LIESEBACH H, SCHMITT U, ELSASSER P(2011) Zum Douglasienanbau in Deutschland - Ökologische, waldbauliche, genetische und holzbiologische Gesichtspunkte des Douglasienanbaus in Deutschland und den angrenzenden Staaten aus naturwissenschaftlicher und gesellschaftspolitischer Sicht. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany, 67 p, Landbauforschung - vTI Agriculture and Forestry Research

KRUTOVSKY KV, ST.CLAIR J, SAICH R, HIPKINS VD, NEALE DB (2009) Estimation of population structure in coastal Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*] using allozyme and microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes 5 (4): 641-658

LAI BSK (2009) Pollinaton dynamic in an advanced generation Douglas-fir seed orchard. Vancouver: The University of British Columbia, 1-59 p

LEINEMANN L (1996) Genetic Differentiation of Damaged and Healthy Douglas-Fir Stands in Rheinland-Pfalz with Respect to Their Origin. Silvae Genetica 45 (5-6): 250-256

LI P, ADAMS WT (1989) Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). Canadian Journal of Forest Research 19 (2): 149–161

LIAN C, MIWA M, HOGETSU T (2001) Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. Heredity 87 (1): 88-98

MIMURA M, AITKEN SN (2007) Increased selfing and decreased effective pollen donor number in peripheral relative to central populations in *Picea sitchensis* (Pinaceae). American Journal of Botany 94 (6): 991-998

NEALE DB, ADAMS WT (1985) The mating system in natural and shelterwood stands of Douglas-fir. TAG Theoretical and Applied Genetics 71 (2): 201-207

O'CONNELL LM, RUSSELL J, RITLAND K (2004) Fine-scale estimation of outcrossing in western redcedar with microsatellite assay of bulked DNA. Heredity 93 (5): 443-449

PEAKALL R, SMOUSE PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics 28 (19): 2537-2539

POTTER KM, FRAMPTON J, JOSSERAND SA, NELSON CD (2008) Genetic variation and population structure in Fraser fir (*Abies fraseri*): a microsatellite assessment of young trees. Canadian Journal of Forest Research 38: 2128-2137

PRAT D, ARNAL S (1994) Allozyme variation and mating system in three artificial stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) planted in Europe. Silvae Genetica 43 (4): 199-206

ROBLEDO-ARNUNCIO JJ, ALÍA R, GIL L (2004) Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. Molecular Ecology 13: 2567-2577

SHAW DV, ALLARD RW (1982) Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. TAG Theoretical and Applied Genetics 62 (2): 113-120

SLAVOV GT, HOWE GT, ADAMS WT (2005a) Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. Canadian Journal of Forest Research 35 (7): 1592-1603

SLAVOV GT, HOWE GT, GYAOUROVA AV, BIRKES DS, ADAMS WT (2005b) Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. Molecular Ecology 14 (10): 3109-3121

SLAVOV GT, HOWE GT, YAKOVLEV IA, EDWARDS KJ, KRUTOVSKY KV, TUSKAN GA, CARLSON JE, STRAUSS SH, ADAMS WT (2004) Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations. TAG Theoretical and Applied Genetics 108 (5): 873-880

SORENSEN FC, MILES RS (1982) Inbreeding Depression in Height, Height Growth, and Survival of Douglas-fir, Ponderosa Pine, and Noble Fir to 10 Years of Age. Forest Science 28: 283-292

STAUFFER A, ADAMS WT (1993) Allozyme variation and mating system of three Douglas-fir stands in Switzerland. Silvae Genetica 42 (4-5): 254-258

TOMITA M, SAITO H, SUYAMA Y (2008) Effect of local stand density on reproductive processes of the sub-boreal conifer *Picea jezoensis* Carr. (Pinaceae). Forest Ecology and Management 256 (6): 1350-1355

WANG J (2004) Sibship Reconstruction From Genetic Data With Typing Errors. Genetics 166 (4): 1963-1979

WANG J (2013) An improvement on the maximum likelihood reconstruction of pedigrees from marker data. Heredity 111 (2): 165-174

WANG J, SANTURE AW (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. Genetics 181 (4): 1579-1594

WOJACKI J, EUSEMANN P, AHNERT D, PAKULL B, LIESEBACH H (2019) Genetic diversity in seeds produced in artificial Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) stands of different size. Forest Ecology and Management 438: 18-24

WOODS JH, HEAMAN JC (1989) Effect of different inbreeding levels on filled seed production in Douglas-fir. Canadian Journal of Forest Research 19 (1): 54-59

Autoren

Dr. HEIKE LIESEBACH, Dr. BIRTE PAKULL
Thünen-Institut für Forstgenetik, Sieker Landstraße 2, 22927 Großhansdorf
heike.liesebach@thuenen.de

JANINE WOJACKI, Dr. PASCAL EUSEMANN
Thünen-Institut für Forstgenetik, Eberswalder Chaussee 3 a, 15377 Waldsieversdorf

THÜNEN

Thünen Report 76
Herausgeber/Redaktionsanschrift

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

www.thuenen.de

ISBN 978-3-86576-209-2
9 783865 762092