

Darleitertagung Bernkastel-Kues – 04.-07. Juni 2013

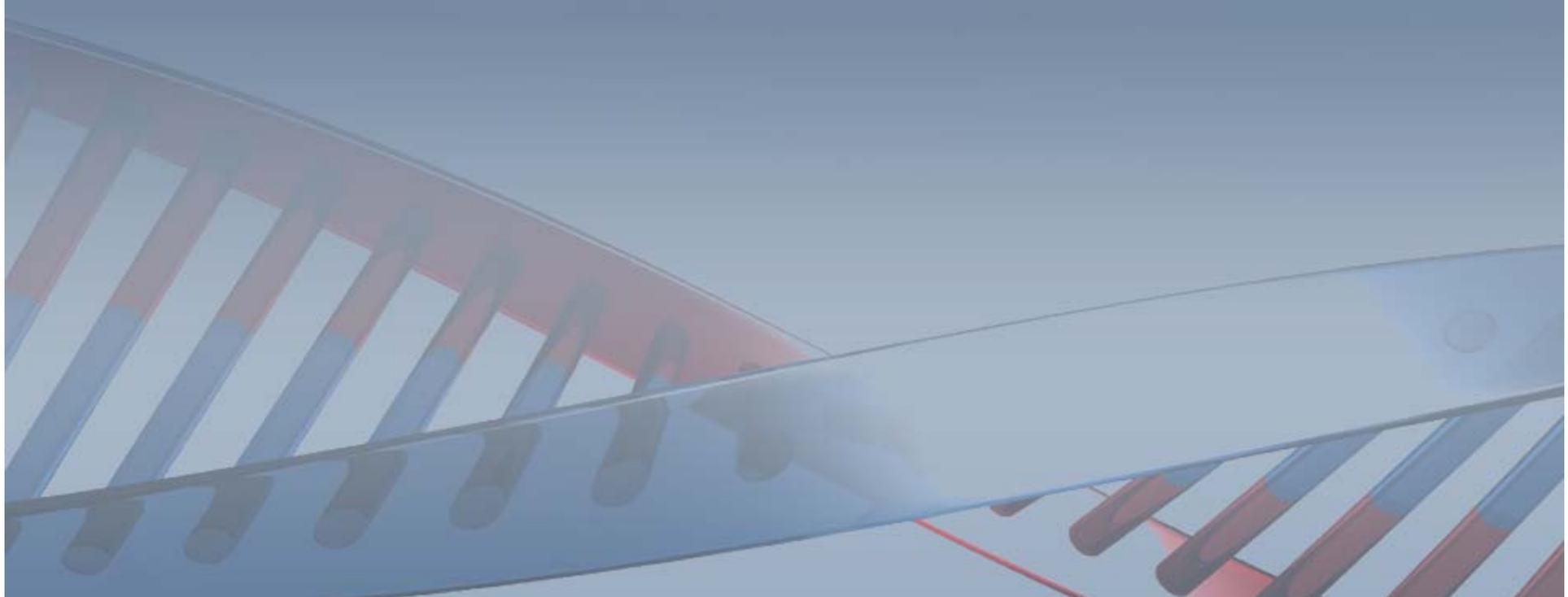
Assignment-Methoden zur Herkunftsidentifizierung von forstlichen Vermehrungsgut: Baumarten mit unterschiedlichen Reproduktionssystemen

Aki M. Höltken¹, Bernd Degen² & Martin Rogge³

¹Plant Genetic Diagnostics GmbH, Großhansdorf

²Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf

³Landesbetriebe Wald & Holz NRW, Arnsberg



Übersicht

- Nachfrage nach Rückverfolgbarkeitssystemen
- Assignmentmethoden an Vermehrungsgut der Stieleiche und der Vogelkirsche
- Untersuchte Bestände und deren Nachkommen
- Genetische Verfahren: Labormethoden, Statistik
- Ergebnisse: Wind- vs. Insektenbestäubung
- Diskussion: Wie aussagekräftig sind direkte Zuordnungsverfahren?

Nachfrage nach Rückverfolgbarkeitssystemen

Forst- und Holzwirtschaft

Holzhandel



Forstliches Vermehrungsgut



Fotos: C. Jolivet, A.M. Höltnen

Nachfrage nach Rückverfolgbarkeitssystemen

Forstliches Vermehrungsgut

Die Herkunftswahl von forstlichem Vermehrungsgut ist von entscheidender Bedeutung für das Erreichen sowohl ökologischer als auch ökonomischer Bestandesziele

- Genetische Ausstattung ist die Grundlage für leistungsfähige und hochwertige Waldbestände: Geradschaftigkeit, Drehwuchs, Holzfaserlänge, Austriebszeitpunkt
- Anpassung und Anpassungsfähigkeit an bestehende und zukünftig sich ändernde Umweltbedingungen: Entscheidend für ökologisch stabile Waldbestände
- Lange Produktionszeiträume: Fehler in der Herkunftswahl können kaum mehr behoben werden

⇒ FoVG (seit dem 01.01.2003)

⇒ mehrere Zertifizierungsverfahren (FfV, ZüF)

⇒ Genetische Überprüfungsmethoden (Rückstellproben)

⇒ Direkte Zuordnungsmethoden (Assignment)?

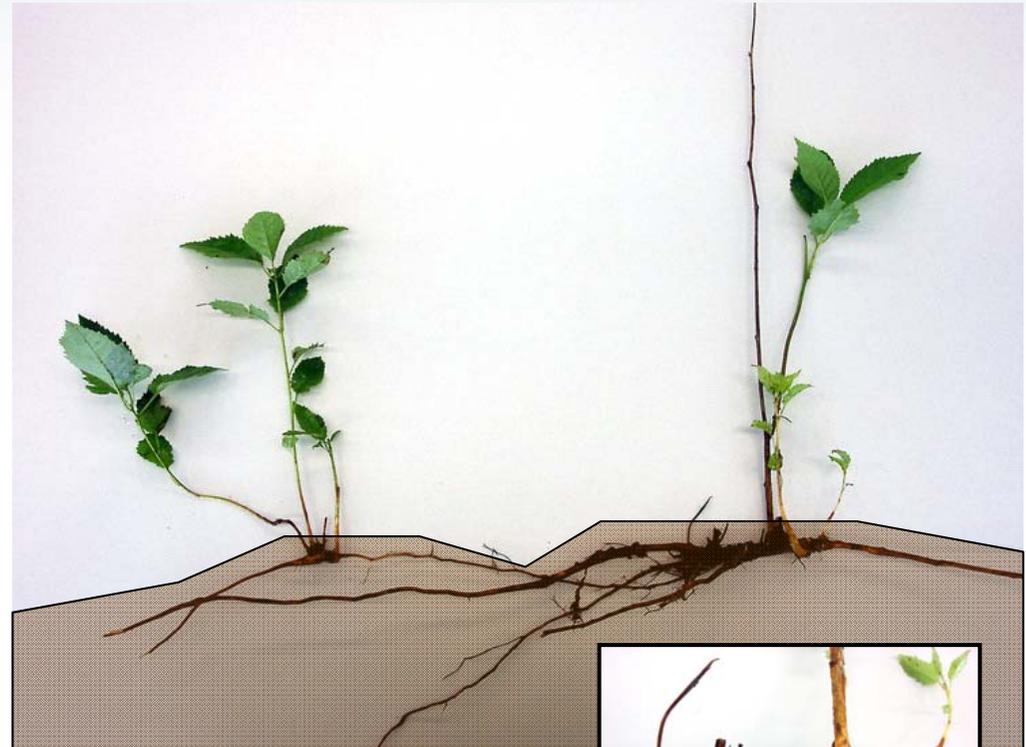
Vermehrungsgut der Stieleiche und der Vogelkirsche

Reproduktionssystem der Vogelkirsche (*Prunus avium* L.)

Ausbreitung über Samen
(Zoochorie)



Foto: B. Thiel (Waldwissen.net)



Vegetative Ausbreitung über Wurzelbrut,
Fotos: A.M. Höltken



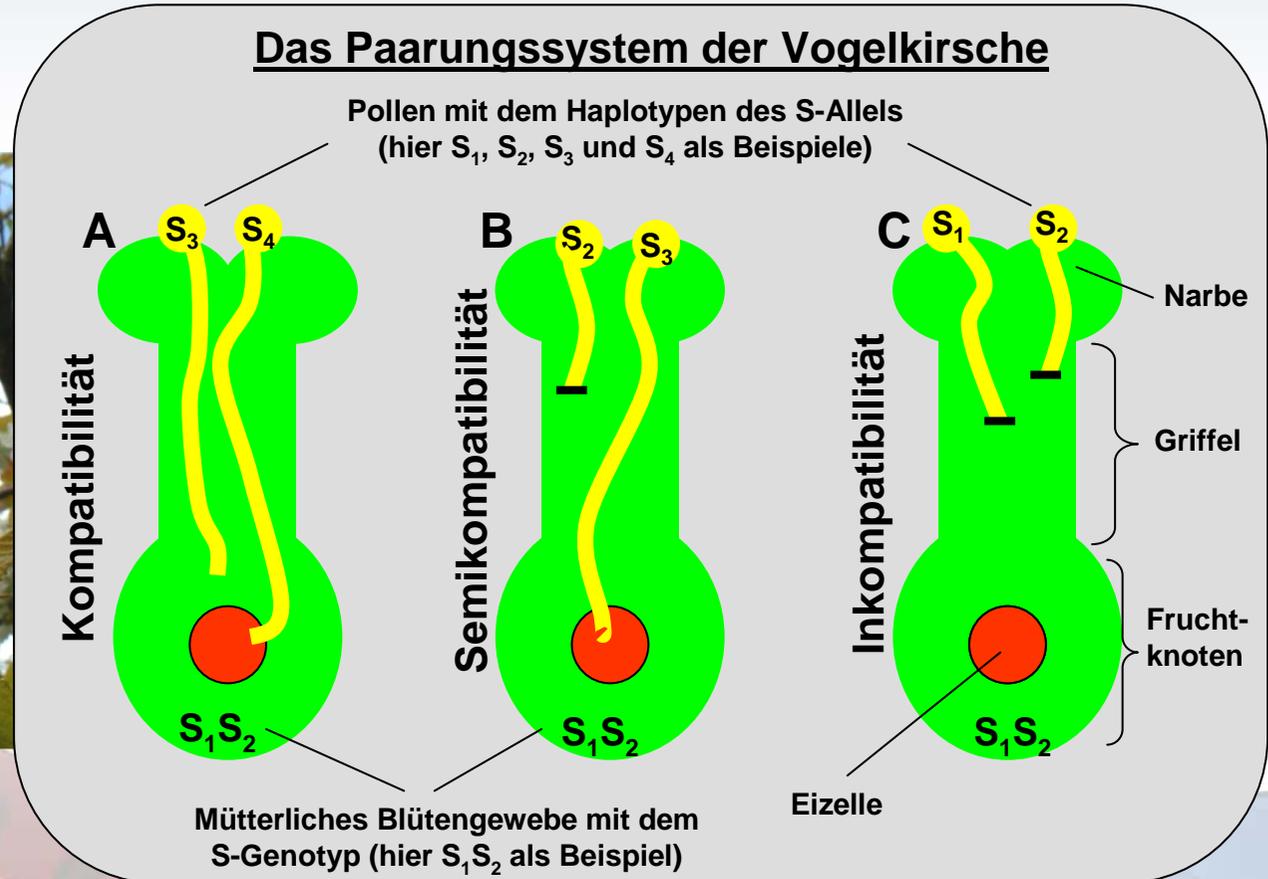
Wurzelknospen, aus denen sich Wurzel-sprosse entwickeln (Wurzelbrut)

Vermehrungsgut der Stieleiche und der Vogelkirsche

Reproduktionssystem der Vogelkirsche (*Prunus avium* L.)



Insektenbestäubung durch eine Hummel,
Foto: A.M. Höltken



Pollenausbreitungsdistanzen richten sich nach den maximalen Flugweiten der Insekten, sehr effiziente Pollenausbreitung innerhalb der Bestände
→ höhere genetische Differenzierung zwischen den Beständen und geringere genetische Vielfalt innerhalb der Bestände (meist kleinere, räumlich isoliertere Vorkommen)

Vermehrungsgut der Stieleiche und der Vogelkirsche

Reproduktionssystem der Stieleiche (*Quercus robur* L.)



Blütenstand einer Stieleiche,
Foto: A.M. Hötken

Pollenausbreitungsdistanzen richten sich nach den Windverhältnissen und können extreme Entfernungen zurücklegen (Buschbom et al. 2011, 2012)

- Erhalt hoher genetischer Diversität, auch in geographisch isolierten Beständen
- geringe genetische Differenzierung zwischen Beständen

Buschbom J., Yanbaev Y. & Degen B. (2011) *Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand*. Journal of Heredity 102: 464-472.

Buschbom J., Gimmthal S., Kirschner P., Schüler S., Schlünzen H. & Degen B. (2012) *Spatial composition of pollen-mediated gene flow in sessile oak*. Forstarchiv 83: 12-18.

Vermehrungsgut der Stieleiche und der Vogelkirsche

Wie sicher sind Zuordnungsverfahren zur Herkunftsidentifizierung von Vermehrungsgut?

Untersuchung grundlegender Parameter:

Strukturen genetischer Diversität und Differenzierung an Vorkommen der Vogelkirsche und der Stieleiche als Repräsentanten unterschiedlicher Reproduktionssysteme

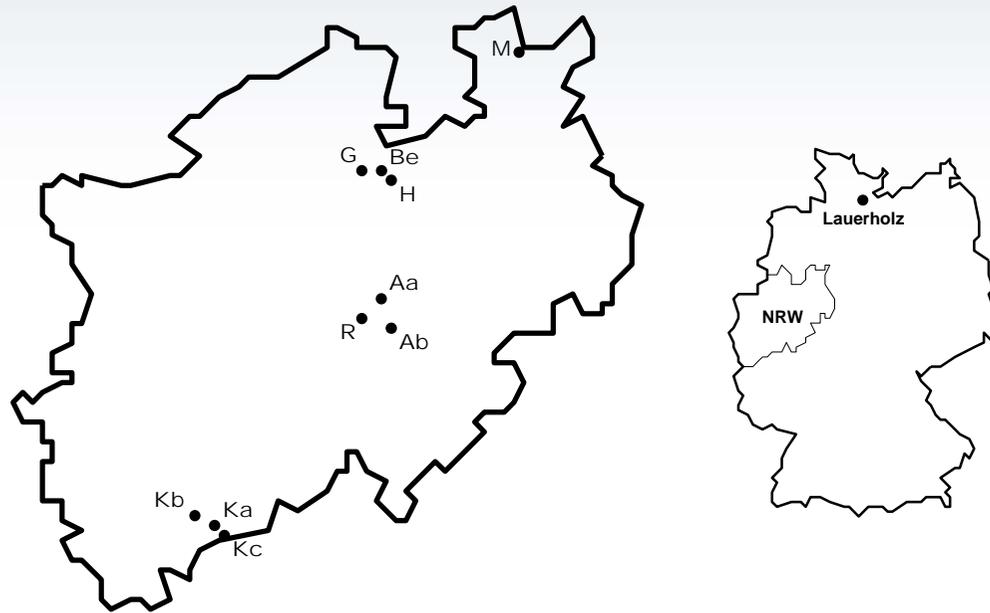
Test eines Assignmentverfahrens (Zuordnungsverfahren):

Können Nachkommen (Samen, Jungpflanzen aus einer Baumschule) direkt ihren Ausgangsbeständen oder bestimmten Referenzproben zugeordnet werden?

Gelingt diese Zuordnung auch mit nur sehr wenigen Individuen (entscheidend für die Kosten von Untersuchungsmethoden)?

Untersuchte Bestände und deren Nachkommen

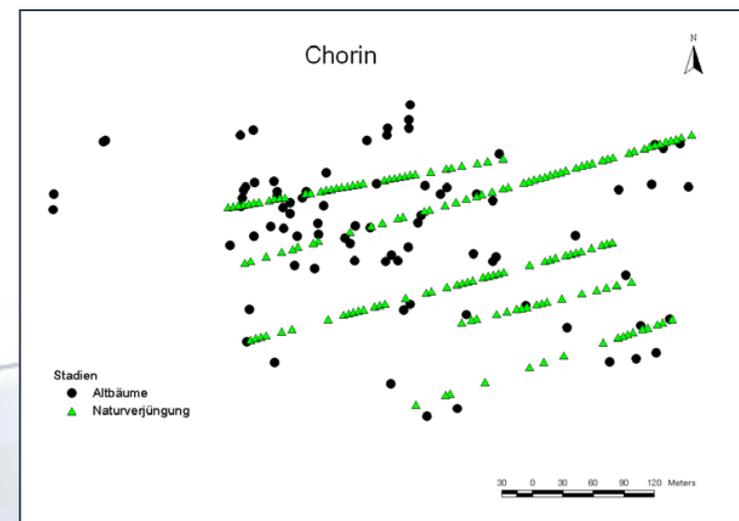
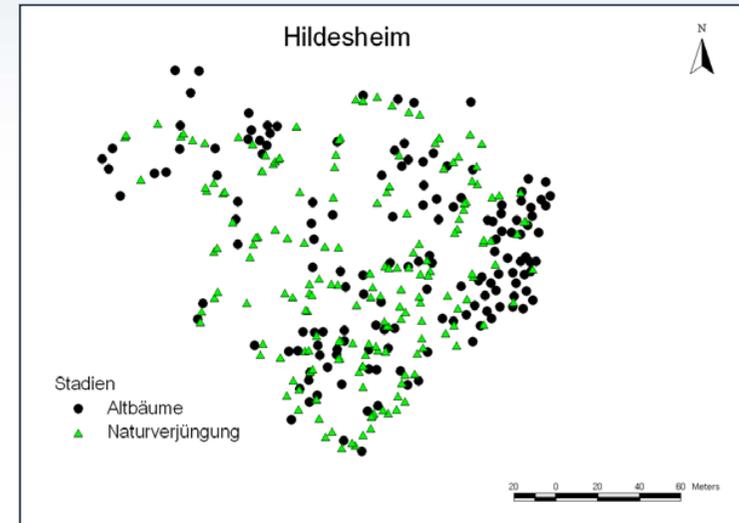
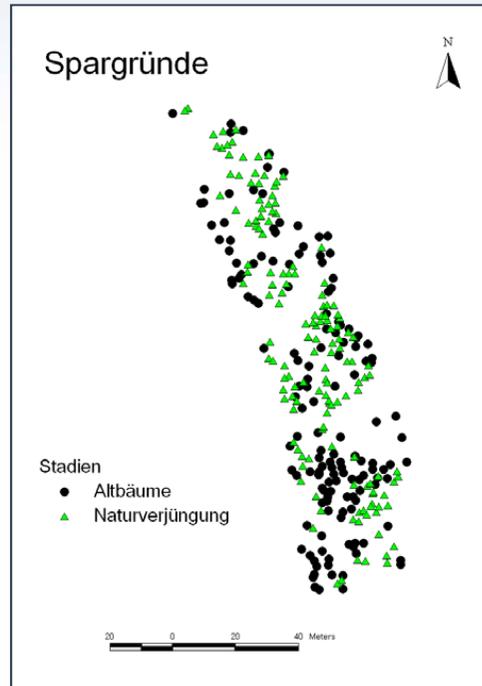
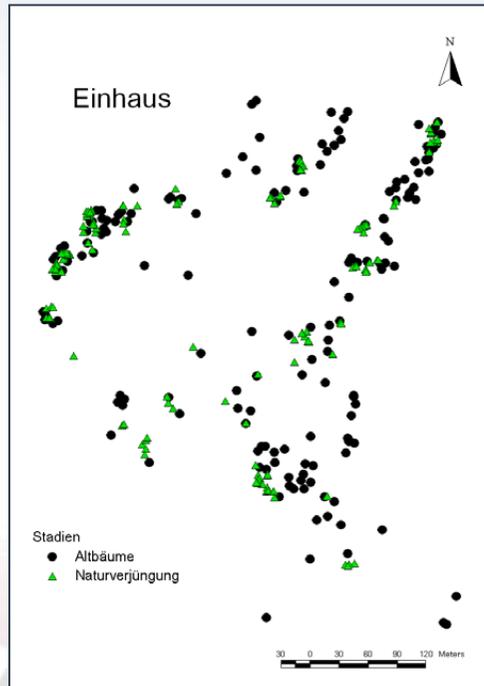
Stieleiche (*Quercus robur* L.)



Bez.	Standort	Bundesland	Abt.	EZR-Nr.	Altbestand	Keiml.	Samen	Baumschule
M	Mindener Wald	NRW	159 A/ B	052 81703 004 2	82	34	0	0
G	Geisterholz	NRW	99 A/ B	052 81701 188 2	91	34	0	0
H	Habichtshorst	NRW	33 C/F	052 81701 011 2	85	0	19	0
Be	Beelen	NRW	50B/51E	052 81701 012 2	85	0	0	34
R	Rumbeck	NRW	405 D	052 81706 008 2	89	33	0	0
Aa	Stadt Arnsberg	NRW	102 D	052 81706 022 2	84	0	35	0
Ab	Stadt Arnsberg	NRW	34 C	052 81706 004 2	81	0	35	0
Ka	Kottenforst	NRW	74 A/85	051 81701 0122	57	27	0	0
Kb	Kottenforst	NRW	39/40	051 81701 030 2	85	0	36	0
Kc	Kottenforst	NRW	180	051 81701 019 2	83	0	35	0
Lh	Lauerholz	SH	137a	011 81702 107 2	119	0	0	31*

Untersuchte Bestände und deren Nachkommen

Vogelkirsche (*Prunus avium* L.)



Genetische Verfahren

Labormethoden

DNA-Extraktion

Die DNA-Aufreinigung erfolgte an Kambium, Blättern oder Embryonalgewebe durch ein modifiziertes Verfahren nach Dumolin et al. (1995)

PCR (=Polymerase-Ketten-Reaktion):

Amplifikation von acht Kern-Mikrosatelliten (SSRs) in jeweils zwei Multiplex-Reaktionen sowohl für die Vogelkirsche als auch für die Stieleiche

Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese:

ABI 3730 (Life Technologies) mit 48 Kapillaren, Probenkapazität innerhalb von 16 Stunden:
1532 Proben

Genetische Verfahren

Statistik

Genetische Vielfalt und Diversität

Anzahl genetischer Varianten

Effektive Anzahl genetischer Varianten

Genetische Differenzierung

Relative Unterschiede zwischen Beständen (Anteile genetischer Varianten, die ausgetauscht werden müssen, um identische genetische Strukturen zu erhalten)

Signifikanz dieser Unterschiede

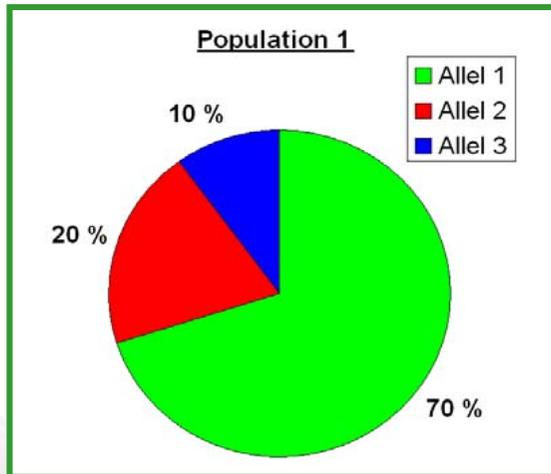
Einteilung in Reproduktionseinheiten

Das Programm STRUCTURE 3.2.3 clustert die einzelnen Individuen, so dass die entstehenden Gruppen möglichst nah am Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen (Gruppen mit Zufallspaarung)

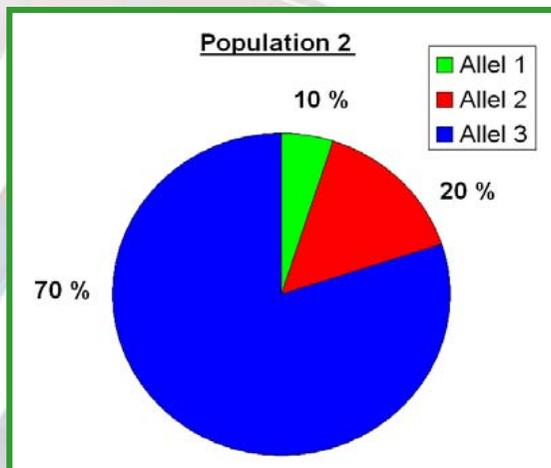
Genetische Verfahren

Statistik

Wie funktioniert das Assignment-Verfahren?

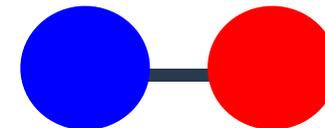


$$L = 0.1 \times 0.2 \times 2 = \underline{0.04}$$



$$L = 0.7 \times 0.2 \times 2 = \underline{0.28}$$

Genotyp eines
Nachkommens



Ergebnisse

Wind- vs. Insektenbestäubung: Genetische Vielfalt

Quercus robur L.

Genort	M	G	H	Be	R	Aa	Ab	Ka	Kb	Kc	Lh
QrZAG11	21	25	23	26	25	21	19	22	24	24	30
QrZAG96	11	14	14	15	12	15	13	14	16	19	22
QrZAG110	17	12	16	15	19	12	15	14	16	17	21
QrZAG112	16	19	20	18	20	17	16	20	17	16	27
QrZAG5b	30	32	34	33	34	31	31	23	31	33	29
QrZAG20	16	13	15	16	16	16	15	16	18	17	14
QrZAG65	30	27	31	30	32	32	28	29	31	34	27
QrZAG87	21	23	25	24	23	22	20	20	23	25	20
Summe	162	165	178	177	181	166	157	158	176	185	190

Prunus avium L.

Genort	E	H	C	S
UDP96_001	4	3	3	3
UDP98_021	4	4	4	3
UDP98_411	5	6	5	6
BPPCT_034	9	7	9	7
UDP98_411	8	6	6	6
UDP98_412	9	8	10	9
BPPCT_040	7	12	9	6
UDP96_005	5	5	5	3
Total	51	51	51	43

Anzahl beobachteter Allele $n_{(a)}$ an den jeweils acht untersuchten Mikrosatelliten-Genorten der Stieleiche (*Quercus robur* L.) und der Vogelkirsche (*Prunus avium* L.)

Ergebnisse

Wind- vs. Insektenbestäubung: Genetische Vielfalt

Quercus robur L.

Genort	M	G	H	Be	R	Aa	Ab	Ka	Kb	Kc	Lh
QrZAG11	10,01	10,37	8,67	9,81	13,22	9,92	9,22	12,23	12,21	12,51	13,44
QrZAG96	1,76	1,85	1,73	1,84	1,75	2,28	1,84	1,87	2,22	2,25	2,45
QrZAG110	2,61	2,54	3,11	3,11	3,18	2,75	3,11	3,06	3,7	2,82	2,77
QrZAG112	6,09	5,44	6,75	7,49	6,4	4,65	6,27	5,73	4,51	5,16	6,88
QrZAG5b	14,94	14,6	15,42	13,89	15,33	17,67	13,52	11,85	12,61	12,34	13
QrZAG20	6,63	4,61	6,37	6,37	6,09	7,06	6,97	7,03	5,93	6,06	6,65
QrZAG65	19,91	16,91	22,76	20,74	20,29	21,39	12,1	19,52	21,6	23,08	20,2
QrZAG87	9,59	9,14	9,19	8,01	8,26	11,5	9,52	9,21	9,39	9,67	11,11
Summe	8,94	8,18	9,25	8,91	9,31	9,65	7,82	8,81	9,02	9,24	9,56

Prunus avium L.

Genort	E	H	C	S
UDP96_001	1,57	2,21	2,26	2,91
UDP98_021	2,55	3,85	2,11	2,81
UDP98_411	3,4	4,04	2,41	2,27
BPPCT_034	4,68	4,49	3,41	3,87
UDP98_411	2,9	3,49	3,39	2,12
UDP98_412	3,83	3,28	3,99	2,99
BPPCT_040	3,52	5,34	3,89	4,21
UDP96_005	4,14	2,91	3,28	2,39
Genpool	3,32	3,7	3,09	2,95

Effektive Anzahl allelischer Varianten an den jeweils acht untersuchten Mikrosatelliten-Genorten sowie effektive Anzahl der Allele des Genpools

Ergebnisse

Wind- vs. Insektenbestäubung: Paarweise genetische Abstände zwischen Beständen

Quercus robur L.

	M	G	H	Be	R	Aa	Ab	Ka	Kb	Kc	Lh
M		0,208	0,281	0,285	0,2	0,263	0,256	0,218	0,246	0,205	0,287
G	***		0,302	0,286	0,214	0,247	0,265	0,237	0,247	0,228	0,298
H	***	***		0,182	0,281	0,321	0,34	0,309	0,306	0,26	0,282
Be	***	***	n.s.		0,268	0,302	0,3	0,302	0,275	0,247	0,245
R	**	***	***	***		0,254	0,266	0,219	0,23	0,204	0,3
Aa	***	***	***	***	***		0,293	0,265	0,232	0,217	0,301
Ab	***	***	***	***	***	***		0,308	0,288	0,271	0,314
Ka	**	***	***	***	n.s.	***	***		0,251	0,227	0,304
Kb	***	***	***	***	***	***	***	**		0,191	0,251
Kc	n.s.	***	***	***	*	*	***	n.s.	n.s.		0,264
AH	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	

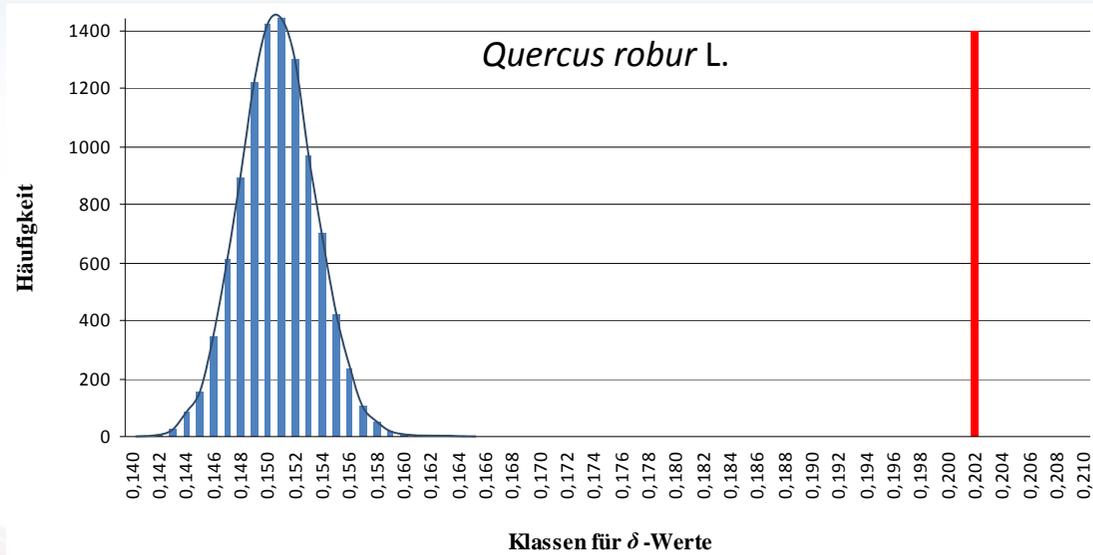
Prunus avium L.

	E	H	C	S
E		0,276	0,309	0,382
H	***		0,339	0,333
C	***	***		0,366
S	***	***	***	

Genetische Abstände zwischen jeweils zwei Beständen (oberhalb der Diagonalen);
mit dem Permutationstest ermittelte Signifikanzen (unterhalb der Diagonalen)

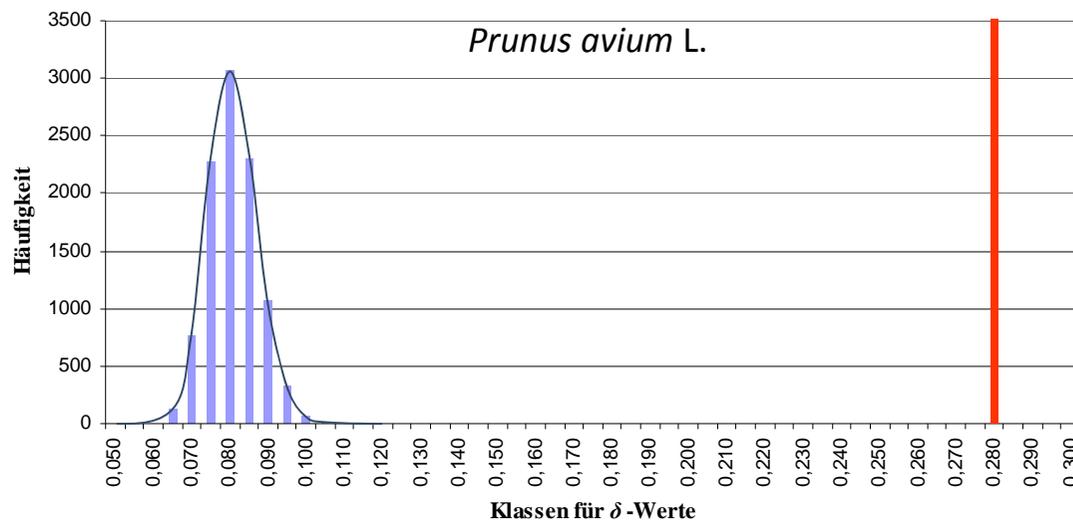
Ergebnisse

Wind- vs. Insektenbestäubung: Gesamtdifferenzierung



- Häufigkeitsverteilung der durch Permutation (10.000X) erzeugten δ -Werte (blau)

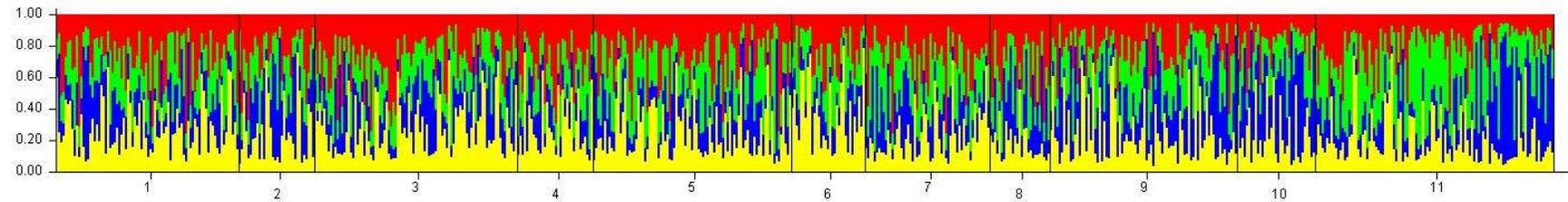
- beobachtete Gesamtdifferenzierung der untersuchten Bestände (roter Balken)



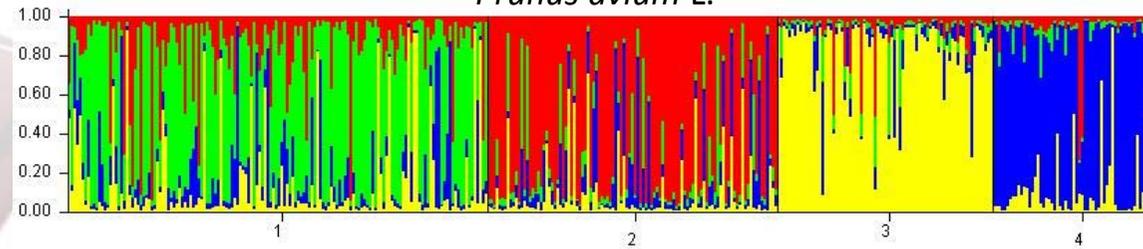
Ergebnisse

Wind- vs. Insektenbestäubung: Reproduktionseinheiten

Quercus robur L.



Prunus avium L.



Ergebnisse

Assignment-Methode am Beispiel Vogelkirsche (*Prunus avium* L.)

LOG₍₁₀₎ (-X) für 30 Samen

Nachkommenkollektive	Referenzpopulationen Vogelkirsche			
	Einhaus	Hildesheim	Chorin	Spargründe
Einhaus	247,96	356,26	361,55	384,48
Hildesheim	309,65	231,56	331,69	383,29
Chorin	326,50	340,83	212,70	398,90
Spargründe	326,70	337,80	316,27	237,21

LOG₍₁₀₎ (-X) für 5 Samen

Nachkommenkollektive	Referenzpopulationen Vogelkirsche			
	Einhaus	Hildesheim	Chorin	Spargründe
Einhaus	43,85	62,12	67,46	59,40
Hildesheim	61,14	37,79	63,39	79,82
Chorin	67,91	67,19	37,16	71,70
Spargründe	56,06	56,68	51,50	39,81

Nachkommenkollektive	Ref.-Pop. Vogelkirsche			
	E	H	C	S
E	1,000	0,000	0,000	0,000
H	0,000	1,000	0,000	0,000
C	0,000	0,000	1,000	0,000
S	0,000	0,000	0,000	1,000

Score

$$Score_{p,A} = \frac{Pr_{p,A}}{\sum_{j=1}^P Pr_{j,A}}$$

Pr_{p,A} = Wahrscheinlichkeit der Abstammung einer Nachkommenschaft aus einem bestimmten Bestand des Referenzdatensatzes (A)

Ergebnisse

Assignment-Methode am Beispiel Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Scores für die Stieleiche

Nachkommen- kollektive	Referenzpopulationen Stieleiche (<i>Quercus robur</i> L.)										
	M	G	H	Be	R	Aa	Ab	Ka	Kb	Kc	SH
M	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
H	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Be	0,000	0,000	0,641	0,359	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
R	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Aa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ab	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ka	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Kb	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Kc	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
Lh	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000

Scores für die Zuordnung der einzelnen Nachkommen-Kollektive zu den inventarisierten Ausgangsbeständen. Theoretisch sollte eine Nachkommenschaft immer ihrem ausgewiesenen Ausgangsbestand zugeordnet werden.

graue Kästchen: korrekte Zuordnung

gelbe Kästchen: falsche Zuordnung

Diskussion und Fazit

Genetische Strukturen unserer Waldbaumarten geeignet für Assignment-Methoden

Unterschiedliche Reproduktionssysteme haben signifikante Auswirkungen auf die genetischen Strukturen unserer Waldbaumarten (Genetische Vielfalt und Differenzierung)

- Insektenbestäubung: Geringere genetische Vielfalt, höhere genetische Differenzierung
- Windbestäubung: Höhere genetische Vielfalt, geringere genetische Differenzierung

Trotz dieser Unterschiede bieten „Assignment-Methoden“ zuverlässige Aussagen für die Zuordnung von forstlichem Saat- und Pflanzgut

- direkt zu ihren Ausgangsbeständen
- zu verschiedenen Partien von Rückstellproben

Diskussion und Fazit

Assignment-Methode

Zuverlässige Ergebnisse:

- Korrekte Zuordnung, auch bei nur geringen zu prüfenden Individuenzahlen
- Eingebaute Fehler werden erkannt
- Stabil gegenüber Störungen (Nullallele etc.)

In Entwicklung:

Ausschlusswahrscheinlichkeiten für falsch-positive Zuordnungen



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsig

ELSEVIER

FSI GENETICS

Forensic Population Genetics—Original Research

Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints

B. Degen^{a,*}, S.E. Ward^b, M.R. Lemes^{c,1}, C. Navarro^d, S. Cavers^e, A.M. Sebbenn^f

^aJohann Heinrich von Thünen-Institut (vTI), Institut für Forstgenetik, Steker Landstrasse 2, D-22927 Grosshansdorf, Germany

^bMahogany for the Future Inc., San Juan, PR 00928, USA

^cLaboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Av. André Araújo 2936, CEP 69083-000 Manaus, AM, Brazil

^dUniversidad Nacional, Calle 9, Avenidas 0 y 9, Costa Rica

^eCentre for Ecology & Hydrology, Pentacik, Midlothian, Scotland EH26 0QB, United Kingdom

^fInstituto Florestal de São Paulo, CP 1322, São Paulo, SP 01059-970, Brazil