

Asexuelle und sexuelle Reproduktion
bei der Vogelkirsche (*Prunus avium* L.)



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Dierk Kownatzki

geboren in Eckernförde

Göttingen 2002

D 7

1. Berichtstatter: Prof. Dr. H. H. Hattemer

2. Berichtstatter: Prof. Dr. F. Gruber

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2001

Diese Arbeit wurde durch die Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek, Platz der Göttingen Sieben, 37073 Göttingen, unter folgender Internet-Adresse veröffentlicht:

<http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2002/kownatzki/index.html>

Meiner Familie

Vorwort

Die Idee zu der vorliegenden Arbeit entstand aus einem von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen finanziell unterstützten Vorhaben, das in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Forstlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt wurde. Die Arbeit selbst konnte in wesentlichen Teilen erst nach Abschluß des Vorhabens angefertigt werden, wobei eine Vielzahl weiterer Ergebnisse und daraus resultierende Erkenntnisse Eingang gefunden haben. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank den Herren Professoren Dr. H. H. Hattemer und Dr. H.-R. Gregorius, die mich zu dieser Arbeit ermutigt und mir jederzeit die dazu notwendigen Arbeitsbedingungen ermöglicht haben.

Darüber hinaus danke ich Herrn Professor Hattemer für die gute fachliche Betreuung der Arbeit. Herr Professor Gregorius hat durch gelegentliche Gespräche und Diskussionen ebenfalls zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin bin ich der Baumschule C. Appel in Darmstadt, den Landesforstverwaltungen in Rheinland-Pfalz und Nordrhein-Westfalen für den Zugang zu Untersuchungsmaterial und die Erlaubnis zur Verwendung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zu Dank verpflichtet.

Frau Dr. E. Gillet danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Anwendung der von ihr selbst entwickelten Programme GSED und DIPLOGEN sowie für die kritische Durchsicht der englischen Zusammenfassung (Summary).

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. K. Tobutt vom Horticulture Research International (HRI) in East Malling (Großbritannien) verpflichtet, der mir zwei einwöchige Forschungsaufenthalte beim HRI und die direkte Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Bošković ermöglicht hat. Herrn Dr. Bošković danke ich zudem für die intensive labortechnische Betreuung während dieser Aufenthalte und die selbstlose Weitergabe seiner teilweise unveröffentlichten Forschungsergebnisse. In gleichem Umfang bin ich Frau Professorin em. Dr. H. Schmidt zu speziellem Dank verpflichtet, die mich auch noch nach ihrer offiziellen Verabschiedung mit den herkömmlichen Techniken von Bestäubungsversuchen vertraut gemacht hat. Herrn Professor Dr. J. Grunewaldt, dem Leiter des Instituts für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg, danke ich in diesem Zusammenhang für die Gastfreundschaft, die er Frau Professorin H. Schmidt und mir während unseres Arbeitsaufenthalts in Ahrensburg entgegengebracht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mit Geduld die Entstehung der Arbeit begleitet und mir stets die notwendige Zuversicht zu ihrer Fertigstellung gegeben hat.

Göttingen, im Mai 2001

1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Einleitung	1
1.1.1	Kurzporträt der Vogelkirsche	2
1.1.2	Besonderheit der Vogelkirsche für populationsgenetische Betrachtungen rezedenter Arten	2
1.2	Problemstellung	3
1.2.1	Reproduktionsmodus	4
1.2.2	Paarungssystem	4
1.2.3	Genflußsystem	4
2.	Material und Methoden	5
2.1	Material	5
2.2	Methoden	11
2.2.1	Analyse des Inkompatibilitätssystems	11
2.2.1.1	Künstliche Bestäubungen am blühphänologisch isolierten Einzelbaum ..	15
2.2.1.2	Bestäubungsversuche und Pollenschlauchwachstum nach etablierten Ver- fahren	16
2.2.1.3	Analyse von <i>S</i> -RNasen	18
2.2.2	Isoenzymanalysen	19
2.2.3	Analyse des Vererbungsmodus	21
2.2.3.1	Beschreibung der Zymogramme	21
2.2.3.2	Spaltungsanalyse	22
2.2.4	Erhebung der Bestandesstruktur	24
2.2.5	Erhebung der Phänologie und Samenmorphologie	25
2.2.5.1	Phänologie	25
2.2.5.2	Erhebung der Samenmorphologie	27
2.2.6	Datenanalyse	27
2.2.6.1	Verwendete statistische Methoden	27
2.2.6.2	Verwendete Parameter zur Beschreibung genetischer Strukturen	28
2.2.7	Analyse des Genflußsystems	30
2.2.7.1	Vaterschaftsanalyse nach dem Ausschlußprinzip	31
2.2.7.2	Vaterschaftsanalyse nach der Maximum-Likelihood-Methode	31
2.2.7.3	Vaterschaftsanalyse unter Bildung von Pollenelterfraktionen	33
2.2.8	Analyse des Reproduktionsmodus bei der Vogelkirsche	33
3.	Ergebnisse	37
3.1	Analyse des Inkompatibilitätssystems	37
3.1.1	Künstliche Bestäubungen und freie Abblüte am blühphänologisch iso- lierten Einzelbaum	41
3.1.2	Pollenschlauchwachstum	42
3.1.3	Nachweis von <i>S</i> -RNasen in ausgewählten Vogelkirschen	44
3.1.4	Vergleich der drei vorgestellten Verfahren und ihrer Ergebnisse	49
3.2	Analyse des Vererbungsmodus	51
3.2.1	Erläuterung der Zymogramme anderer Isoenzyme	51

3.2.2	Kopplungsanalyse	53
3.2.2.1	Vorbemerkungen	53
3.2.2.2	Nachweis von Kopplung	55
3.3	Genetische Strukturen verschiedener Vogelkirschenvorkommen	57
3.3.1	Genetische Strukturen verschiedener Samenplantagen	57
3.3.2	Genetische Strukturen der Vogelkirsche in einem Mischbestand	63
3.3.2.1	Variation der untersuchten Enzymgenloci	63
3.3.2.2	Nachweis von klonalen Strukturen anhand der Verteilung der Multilocus-Genotypen	65
3.3.2.3	Nachweis von generativen Abstammungsbeziehungen	67
3.3.3	Schätzung des durch Pollen vermittelten Genflusses für eine isolierte Population	68
3.4	Bestandesstruktur und Phänologie in Abteilung 1 a_1	71
3.4.1	Verteilung der Vogelkirsche im Vorkommen Wibbecke	71
3.4.2	Verteilung der Phänologie	73
3.4.2.1	Blühverlauf	73
3.4.2.2	Blattmorphologie	75
3.5	Samenmorphologie der Vogelkirsche	80
4.	Diskussion	83
4.1	Mechanismen der asexuellen und sexuellen Reproduktion	83
4.1.1	Bedeutung der gametophytischen Inkompatibilität	83
4.1.2	Bedeutung des Genflusses für die effektive Größe einer Population	86
4.1.2.1	Durch Pollen vermittelter Genfluß	86
4.1.2.2	Samenmorphologie und -verbreitung der Vogelkirsche	87
4.1.3	Vegetative Ausbreitung	88
4.2	Selbstfertilität als Voraussetzung für den Zusammenbruch des Inkompatibilitätssystems	93
5.	Schlußfolgerungen	95
5.1	Erhalt der Funktionsfähigkeit der Mechanismen des genetischen Systems	95
5.2	Erhalt effektiver Populationsgrößen	95
6.	Zusammenfassung	97
7.	Summary	103
8.	Literaturverzeichnis	106
	Anhang	114

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Die Schaffung und nachhaltige Bewirtschaftung möglichst arten- und strukturreicher Mischwälder streben moderne Forstverwaltungen und Waldbesitzer meist unter dem Gesichtspunkt einer verbesserten betrieblichen Sicherheit an. Bei der waldbaulichen Behandlung der einzelnen Bestände wird oft die Frage nach der Mischungsregulierung oder der anzustrebenden Zielbestockung gestellt und diskutiert. Populationsökologische oder gar genetische Gesichtspunkte treten vielfach in den Hintergrund.

Ein Mischbestand ist ein Kollektiv, das sich kleinräumig aus mehreren, mindestens jedoch zwei, Baumarten zusammensetzt. Struktur und Systematik der Mischungsform können sehr unterschiedlich sein. Die Differenzierung der beteiligten Arten in Haupt- und Nebenbaumart erfolgt unter ökologischen Gesichtspunkten, meist nach deren Konkurrenzkraft. Wegen ihrer Vorherrschaft im Bestand werden die Hauptbaumarten in der Ökosystemforschung dominante Arten genannt, während die meist weniger konkurrenzkräftigen Nebenbaumarten als rezedente Arten bezeichnet werden. Rezedente (seltener) Arten, i. e. nicht dominante und daher meist zerstreut vorkommende, bilden jedoch die Basis für alle Anstrengungen, Biodiversität in Ökosystemen nachhaltig zu erhalten. Insbesondere die vergleichsweise geringe Populationsdichte der rezedenten Arten ermöglicht einerseits das Nebeneinander vieler verschiedener Arten auf kleiner Fläche, birgt andererseits aber die permanente Gefahr einer lokalen Extinktion.

Allein das Vorhandensein rezedenter Arten in der Lebensgemeinschaft dominanter wirkt sich in jedem Fall biodiversitätserhöhend aus. Ihre Funktion für die Stabilität von Ökosystemen ist bisher wenig untersucht. Allgemein bekannt ist jedoch, daß diese Arten sich durch spezielle Ausbreitungsmechanismen auszeichnen, die es ihnen ermöglichen, entstandene Lücken schnell zu schließen. Sie sorgen dadurch für Kontinuität im Nährstoffkreislauf, bis diese ehemaligen Lücken wieder von konkurrenzstärkeren Arten besetzt werden. Somit spielen die rezedenten Baumarten eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung von Ökosystemen gegenüber meist kleinräumigen Störungen.

Die Stabilität eines Ökosystems basiert im wesentlichen auf der Angepaßtheit und Anpassungsfähigkeit der Populationen aller Arten, die das Ökosystem repräsentieren. Angepaßtheit und Anpassungsfähigkeit an heterogene Umweltbedingungen fußen auf der Existenz und Ausnutzung der genetischen Variation für die Anpassung (GREGORIUS 1996). Dies trifft in besonderem Maße für Waldökosysteme zu. Eine nachhaltige Bewirtschaftung biologischer Ressourcen muß daher mit dem Vorhandensein und der Dauerhaftigkeit von ausgeglichenen Anteilen genetischer Variation innerhalb der Arten und ihren Populationen einhergehen. Die Erhaltung und Erzeugung genetischer Variation wird durch die Mechanismen des genetischen Systems der Arten gesteuert. Sie leisten somit einen wesentlichen Beitrag zur Sicherung des Artenbestands. Wegen ihrer räumlichen (sozialen) Isolation und der vielfach als gering einzustufenden Populationsgröße benötigen rezedente Arten sehr gut abgestimmte Mechanismen des genetischen Systems (Reproduktionsmodus, Paarungssystem und Genflußsystem) für die Erhaltung der genetischen Variation innerhalb der Arten.

Stellvertretend für eine rezedente Art ist die Vogelkirsche (*Prunus avium* L.) aus der Familie der Rosaceen als zu untersuchende Modellbaumart vorgesehen.

1.1.1 Kurzporträt der Vogelkirsche

Die Vogelkirsche (*Prunus avium* L.) wird botanisch der Familie der Rosaceen zugeordnet, die sich wiederum in mehrere Unterfamilien gliedert. Die Prunusarten werden aufgrund der ihnen eigenen Steinfrüchte in der Unterfamilie *Prunoideae* geführt. Die Begriffe Wild- bzw. Waldkirsche werden in der Literatur für die Vogelkirsche synonym verwendet. Auch der ehemalige botanische Name *Cerasus avium* (L.) MOENCH ist in älteren Werken zu finden. Es handelt sich um eine diploide Laubbaumart ($2n=16$), die als forstlich wertvolle Mischbaumart der Edellaubholzgesellschaften unter günstigen Wuchsverhältnissen Baumhöhen bis zu 30 Metern erreichen kann. Häufig kommt sie jedoch an Waldrändern oder als Einzelbaum in der freien Landschaft vor. Neben holzwirtschaftlichen haben auch landschaftsästhetische Aspekte zur Verbreitung der Vogelkirsche beigetragen. Das Kirschenholz wird in der Möbel- und Furnierherstellung gern verwendet. Archäologische Funde in den Pfahlbauten am Bodensee zeigen, daß Vogelkirschen wegen ihrer wohlschmeckenden Früchte bereits im 9. Jh. v. Chr. gesammelt wurde. Schon die Griechen und Römer beherrschten Vermehrungs- und Veredelungstechniken für Zier- und Obstgehölze. Der Ursprung der Kirschenkultur in Mitteleuropa wird in frühe germanisch-römische Verbindungen datiert (KÜPPERS 1979). Das Verfahren hat sich bis in die Gegenwart erhalten. Die Kultursorten werden auf Unterlagen von Vogelkirsche oder anderen Prunusarten gepfropft. Neben der züchterischen Auslese von Süßkirschen war die Wildform in den Wäldern eine gesuchte Baumart der Waldimker, auch Zeidler genannt. Solange Honig der einzige Stoff zum Süßen war, hat die Vogelkirsche durch den Menschen eine bewußte Förderung erhalten. Lichte Waldbewirtschaftungsformen wie Nieder- oder Mittelwald haben die Vogelkirsche begünstigt, da sie sich in diesen sowohl generativ als auch vegetativ ausbreiten konnte.

1.1.2 Besonderheit der Vogelkirsche für populationsgenetische Betrachtungen rezedenter Arten

Die Vogelkirsche (*Prunus avium* L.) bildet aus waldbaulich ökologischer Sicht keine zusammenhängenden Waldbestände und wird wegen ihres in Mischwäldern meist zerstreuten Vorkommens den rezedenten Waldbaumarten zugeordnet. Als wärmeliebende Mischbaumart nährstoffreicher Buchen- und besonders Eichenwälder ist die Vogelkirsche besonders häufig in ehemaligen Mittelwäldern vertreten. Eine Vielzahl kirschenreicher Mischbestände unterliegen einer nennenswerten Habitatzerstörung sowie als insektenbestäubte Art einer heftigen Pollenkontamination durch Kulturkirschensorten. Gerade der zuletzt genannte Aspekt stellt die genetische Integrität der Art in Frage, da auch eine Vielzahl anerkannter Saatgutbestände und Produktionssamenplantagen in nicht allzu großer Entfernung zu Kulturkirschenvorkommen in Obstplantagen oder Hausgärten liegen und der Umfang des effektiven Pollenfluges zwischen Vogel- und Kulturkirsche kaum bekannt ist. Die Samenverbreitung erfolgt meist durch Säugetiere und Vögel (TURCEK 1961), soweit die herabgefallene Frucht nicht im unmittelbaren Kronenbereich

des Samenalters liegenbleibt.

Als Pionierbaumart ist die Vogelkirsche in der Lage, offene Lücken oder freie Flächen schnell zu besiedeln. Dabei wird sie häufig räumlich und zeitlich von ihrem Ursprungsbestand so stark reproduktiv isoliert, daß ihr zunächst nur das Vermögen, Wurzelbrut zu bilden, ein längerfristiges Überleben am Ort sichert. Darüber hinaus verfügen diploide Rosaceen, somit auch die Vogelkirsche, über ein gametophytisches Inkompatibilitätssystem, das Selbstbefruchtungen sowie Paarungen zwischen Individuen mit identischem *S*-Genotyp verhindert. CRANE & LAWRENCE (1929) haben dies erstmals für die Süßkirsche beschrieben. Asexuelle Reproduktion durch Wurzelbrut und ein gametophytische Inkompatibilitätssystem bei einer Pionierbaumart, wie der Vogelkirsche, scheinen ein ökologisches Paradoxon zu sein, das den reproduktiven Zusammenhalt der Art eher gefährdet als sichert. Entstehen durch Wurzelbrut eine Vielzahl von Kopien des ursprünglichen Individuums, tragen diese auch den gleichen *S*-Genotyp und sind daher bei Erreichen des Blühalters vollständig inkompatibel. Ein Fruchtansatz kann somit erst nach Fremdbefruchtung erwartet werden. Für isolierte Einzelbäume und weit verstreute Vorkommen der Vogelkirsche ist daher der Pollenflug zwischen den Individuen unterschiedlichen *S*-Genotyps von größter Bedeutung. Der reproduktive Zusammenhalt basiert somit auf dem Paarungskontakt der Population zu anderen. Der Transport von Genen zwischen den Individuen (Genfluß) ist ein weiterer Aspekt des Pollenflugs.

1.2 Problemstellung

Die Fragestellung der vorgelegten Arbeit wird sich mit der Analyse der Mechanismen des genetischen Systems, die einen wesentlichen Einfluß auf den reproduktiven Zusammenhalt einer Art haben, befassen. Konkret untersucht werden der Reproduktionsmodus, das Paarungs- und Genflußsystem im Hinblick auf deren Beitrag für die Erhaltung der genetischen Variation innerhalb der Art.

Da jeder evolutionäre Anpassungsprozeß auf genetischer Variation basiert und sich in der Häufigkeitsverteilung genetischer Typen einer Population niederschlägt, kann die Veränderung genetischer Strukturen zur Abschätzung der Anpassungsfähigkeit einer Population genutzt werden. Die Zahl unterschiedlicher genetischer Typen an einzelnen Genorten entzieht sich ihrer direkten Beobachtung. Da nur Genmarker mit hoher Umweltstabilität und bekanntem Vererbungsmodus sich für diese Zwecke eignen, sind zur Beobachtung genetischer Marker bei Waldbäumen biochemisch-genetische oder molekularbiologische Methoden erforderlich. Zu den bei Waldbäumen gegenwärtig gebräuchlichsten Verfahren zur Erfassung genetischer Strukturen gehört die Stärkegelelektrophorese von Isoenzymen, die im Stoffwechsel spezifische katalytische Funktionen besitzen. Eine Klasse der Isoenzyme bilden die Ribonukleasen (E.C. 3.1.4.23), kurz RNasen, die in den weiblichen Reproduktionsorganen verschiedener Angiospermen deren Inkompatibilität gegenüber Eigenpollen manifestieren und daher *S*-RNasen genannt werden. Eine detaillierte Darstellung des gametophytischen Inkompatibilitätssystems wird in 2.2.1 erfolgen. Eine wesentliche Grundlage für die nachfolgenden Analysen bildet die Erfassung genetischer Variation an einzelnen Genloci der Vogelkirsche, darunter auch am *S*-Genlocus.

Mit Hilfe von Genmarkern soll versucht werden, den Mechanismen des genetischen Systems nachzuspüren und deren Einfluß auf den reproduktiven Artzusammenhalt zu verdeutlichen.

1.2.1 Reproduktionsmodus

Grundsätzlich kann die Vogelkirsche sowohl generativ als auch asexuell reproduzieren. Das genaue Ausmaß ist noch weitgehend unbekannt. Eine ausschließliche asexuelle Reproduktion würde die Bildung von sexuellen Reproduktionsorganen überflüssig erscheinen lassen, da hiermit ein enormer Verbrauch an Ressourcen verbunden ist. Genetische Variation läßt sich andererseits durch die generative Reproduktion erhalten. In diesem Kontext stellen sich daher folgende Fragen:

- a) Wie groß sind die Anteile asexueller und generativer Reproduktion in verschiedenen Vorkommen der Vogelkirsche?
- b) Welche räumliche Verteilung ergibt sich für die vegetativen Abkömmlinge in Populationen?
- c) Welche Konsequenzen ergeben sich aus dieser Zusammensetzung für die langfristige Erhaltung einer Population?

1.2.2 Paarungssystem

Die Vogelkirsche besitzt ein gametophytisches Inkompatibilitätssystem, das nur Paarungen zwischen kompatiblen Individuen zuläßt. Die Pollen werden von Insekten transportiert. Die Reichweite des Insektenflugs bestimmt die Transportweite des Pollens, die somit eine zentrale Funktion für das Paarungsgeschehen einer Population einnehmen. Sowohl Inkompatibilität als auch räumlich beschränkter Insektenflug bestimmen potentiell den reproduktiven Zusammenhalt der Vogelkirsche. Es gilt daher zu klären, ob

- a) Vogelkirschen bevorzugt mit ihren Nachbarbäumen oder eher zufallsmäßig mit allen potentiellen Paarungspartnern paaren,
- b) tatsächlich alle in einer Population möglichen Paarungen realisiert werden und
- c) das Selbstinkompatibilitätssystem einen Einfluß auf die Zusammensetzung der potentiellen Paarungspartner hat.

1.2.3 Genflußsystem

Der Austausch genetischer Information zwischen Individuen oder Kollektiven verhindert eine Differenzierung und fördert somit den reproduktiven Artzusammenhalt. Das Ausmaß, mit dem Genfluß stattfindet, ist bei der Vogelkirsche noch weitgehend unbekannt. Daher sollen in diesem Zusammenhang folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Wie hoch sind die Anteile importierten Pollens?
- b) Spielt die asexuelle Reproduktion eine Rolle für den Genfluß?
- c) Welche Auswirkungen hat das gametophytische Inkompatibilitätssystem auf den Genfluß innerhalb und zwischen Kollektiven?

Anhand dieser wenigen Fragen wird bereits klar, daß das gametophytische Inkompatibilitätssystem eine zentrale Stellung bei den Analysen einnehmen wird. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Analysen sollen abschließend Schlußfolgerungen für eine nachhaltige Bewirtschaftung von Vorkommen der Vogelkirsche abgeleitet werden.

2. Material und Methoden

Zu Beginn eines jeden Untersuchungsprogramms muß die Eignung des Untersuchungsmaterials hinsichtlich der Beantwortung der eingangs genannten Fragestellungen überprüft werden. Jeder Mechanismus des Reproduktionssystems bei der Vogelkirsche erfordert möglicherweise eine spezielle Zusammensetzung der zu untersuchenden Kollektiven, so daß letztlich mehrere unterschiedliche Vorkommen zur Erklärung aller Fragen genetisch zu inventieren sind. Ein wichtiges Kriterium zur Abgrenzung der unterschiedlichen Vorkommen bildete z. B. die vermutete Form ihrer Regeneration aus Samen, Wurzelbrut oder Stockausschlag. Im Folgenden werden in 2.1 die untersuchten Vorkommen, die jeweils untersuchten Gewebearten (Knospen, Griffel oder Samen) sowie deren besondere Eignung zur Beantwortung der gestellten Fragen erläutert. Daran anschließend werden in 2.2 ff. die auf einzelne Fragestellungen abgestimmten und verwendeten Methoden zur Analyse vorgestellt.

2.1 Material

Die Grundlage für die Analyse des genetischen Systems bilden genetische Strukturen einer Art, die in verschiedenen ontogenetischen Stadien (Zygoten, Gameten) erhoben werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden die genotypischen Strukturen verschiedener Vogelkirschenvorkommen und von Saatgut mit Hilfe von Isoenzymgenmarkern inventiert. Für die Typisierung der Individuen einer Population wurden Knospen im Ruhezustand untersucht. Die Strukturen werden für die Analyse des Reproduktionsmodus (asexuelle und sexuelle Reproduktion) benötigt und bilden die Basis für die Vererbungs- und Kopplungsanalyse. Demgegenüber stellen Samen das erste mit Isoenzymen analysierbare Stadium einer Zygotenpopulation nach sexueller Reproduktion dar (Paarungs- und Genflußsystem). Einzelbaumweise geerntete Samen eignen sich bei Kenntnis des sameneltherlichen Genotyps für Vererbungsanalysen und unter sehr speziellen Voraussetzungen auch für Kopplungsanalysen. Für die Analyse des Inkompatibilitätssystems wurden *S*-RNasen, gewebespezifische Isoenzyme, aus Griffeln der Kirschblüte isoliert und elektrophoretisch getrennt. Auch die Blühphänologie einer Population entscheidet, welche Individuen potentiell paaren können (Paarungssystem). Neben Enzymgenmarkern bildet die individuelle Blattmorphologie ein weniger verlässliches, jedoch manchmal zusätzliches Charakteristikum, das zur Klonidentifikation herangezogen werden (Reproduktionsmodus) kann. In Ermangelung genetischer Marker, die die Zuordnung eines Samens nach seiner Verbreitung zu seinem Samenelther ermöglichen, wurden die morphologische Eigenschaften des Samens erfaßt, um ihre Eignung für den Nachweis von Genfluß einzuschätzen.

Keines der ausgewählten Vorkommen ist geeignet, alle eingangs aufgelisteten Fragen umfassend zu beantworten. Daher werden die verschiedenen Aspekte in unterschiedlichen Populationen behandelt. Insgesamt wurden drei Vogelkirschenvorkommen in der Umgebung von Göttingen, vier westdeutsche Samenplantagen und Saatgut von 16 Populationen für die vorliegende Arbeit ausgewählt, die im Folgenden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Eignung beschrieben sind.

Um Beerntungen und Beobachtungen ohne erheblichen Zeitaufwand durchführen zu können, wurden drei Vogelkirschenvorkommen in der Umgebung von Göttingen gesucht, die in der Übersichtskarte (Abbildung 2-1) wiedergegeben sind.

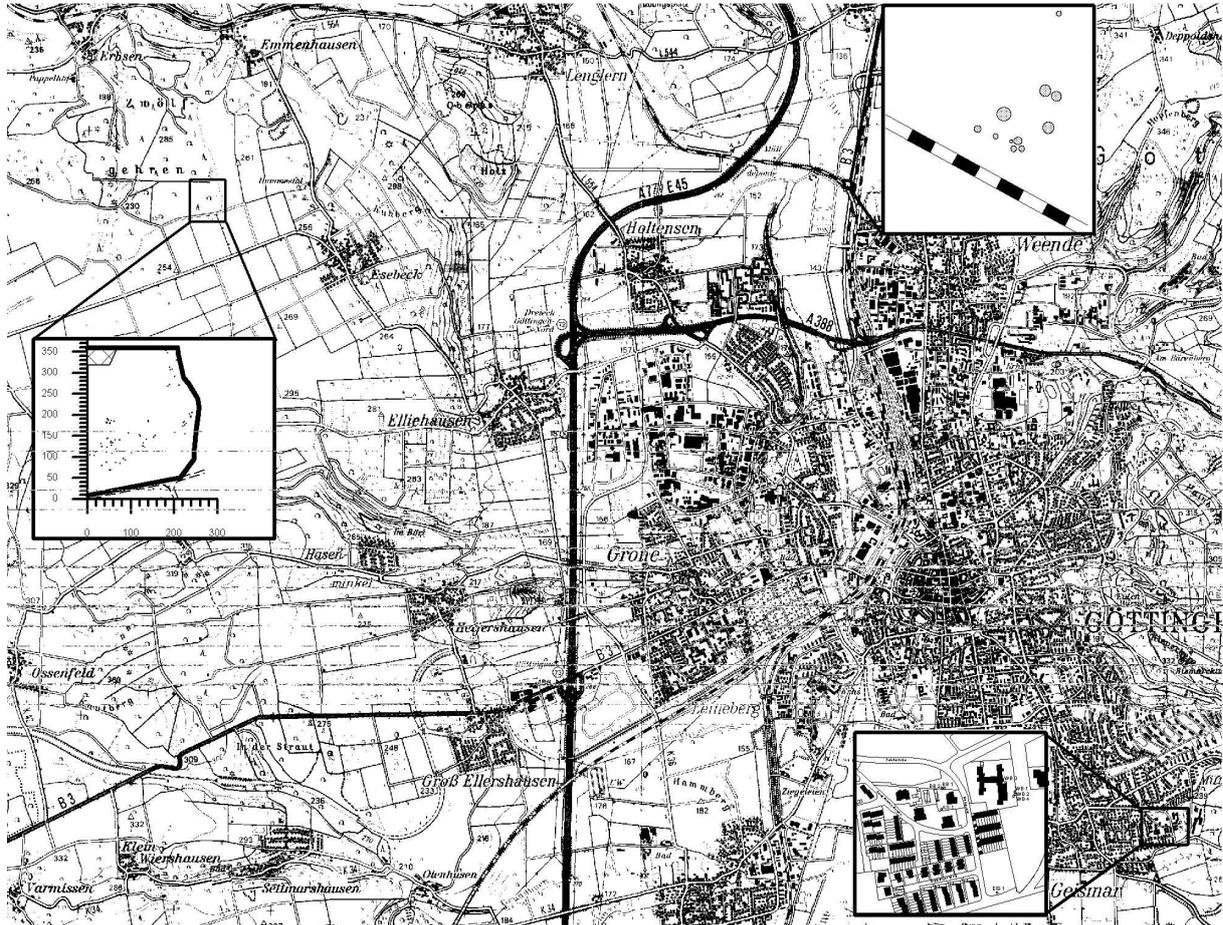


Abb. 2-1: Übersichtskarte der Göttinger Vogelkirschenvorkommen

(1) Da ein isoliertes Einzelbaumvorkommen nicht verfügbar war, wurde eine weitgehend isolierte, aus 11 einzelnen Bäumen bestehende Population, deren Abstammung aus asexueller Reproduktion anhand der einheitlichen Blühphänologie, Fruchtfarbe und -größe vermutet wurde, in die Untersuchungen einbezogen. Es handelt sich um eine Gründerpopulation, da in einem Umkreis von ca. 600 Metern keine Vogelkirschen vorhanden sind. Die Isolation ergibt sich aus den Entfernungen zur Bebauungsgrenze (Hausgärten mit Süßkirsche) und zum nächsten Waldbestand mit Vogelkirsche. Das Vorkommen, das im Folgenden mit **Weende** bezeichnet wird, befindet sich an der nord-exponierten Seite des Bahndammkörpers der eingleisigen Nebenstrecke von Göttingen nach Bodenfelde unmittelbar nach deren Abzweigung von der ehemaligen Hauptstrecke in Richtung Hannover. Alle Vogelkirschen wurden für die Dauer der Untersuchung nummeriert und unter der Kurzbezeichnung BD 1 bis BD 11 (BD von **Bahndamm**) geführt. Die Lage der Bäume ist in Abbildung 2-2 wiedergegeben. Die Kreisdurchmesser in Abbildung 2-2 entsprechen den Proporzionen der Stammdurchmesser in 1,3 Meter Höhe.

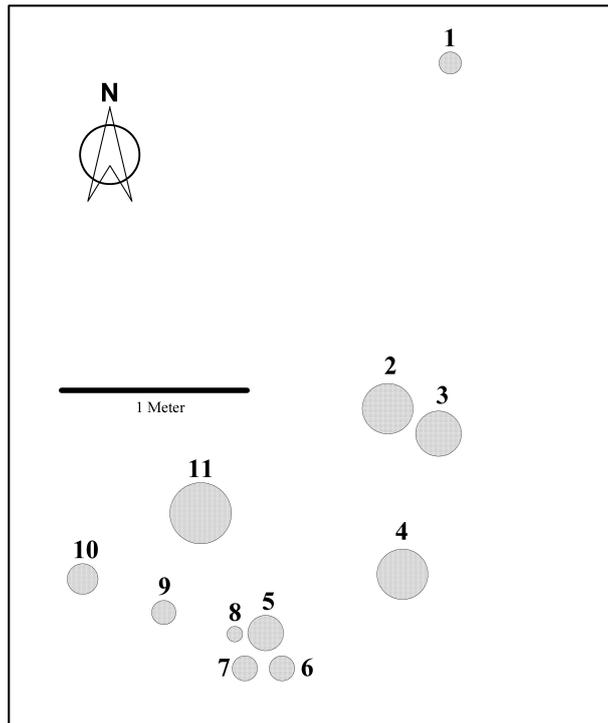


Abb. 2-2: Lage der Vogelkirschen im Vorkommen *Weende*

Für die genetischen Inventuren wurden von allen Bäumen Zweige mit Knospen im Ruhezustand sowie zu einem späteren Zeitpunkt Blühreiser gewonnen. Für die Analyse des Inkompatibilitätssystems wurden Pollen und Griffel einzelbaumweise gewonnen. 1998 wurden die Früchte einzelbaumweise für die Vererbungs- und Kopplungsanalyse sowie für die Genflußuntersuchungen geerntet und aufbereitet. 1998 konnten mit Ausnahme der Kirsche BD 1, die keine Früchte trug, alle beerntet werden. 1999 fiel der Fruchtersatz gegenüber 1998 deutlich geringer aus, so daß nur eine vergleichsweise kleine Erntemenge von jedem Baum gewonnen und aufbreitet werden konnte. Daher wurden nur Saatgutstichproben des Samenjahres 1998 genetisch untersucht.

(2) Die Vogelkirschen in einem zweischichtigen Traubeneichenbestand mit unterständiger Hainbuche sind, auf der Bestandesbeschreibung der Forsteinrichtung von 1991 fußend, vorwiegend aus Stockausschlag hervorgegangen und eignen sich wegen dieser Vorinformation gut für die Überprüfung ihres tatsächlichen Reproduktionsmodus. Neben der Vogelkirsche enthält der Bestand weitere seltene Laubbaumarten des mesophilen Kalkbuchenwalds, wie Elsbeere, Feld- und Spitzahorn. Dieser Bestand wird unter der Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke geführt und wurde gesichert über längere Zeit als Mittelwald bewirtschaftet. Seine Fläche umfaßt 10,1 ha. Der Kirschenanteil wird mit 0,5 ha angegeben. Das wirtschaftliche Alter der Vogelkirsche wird mit 90 Jahren beziffert (Stand: 1991). Der Bestand wird im Norden gleichermaßen durch Wald eines anderen Eigentümers wie durch einen Fichtenriegel (Abteilung 1 a_2) umschlossen. Im Osten und Süden ist er durch die sich anschließende, kirschenfreie Feldmark begrenzt, wobei sich am Südrand ein ca. 0,25 ha großes Feldgehölz mit fünf Vogelkirschen befindet.

Nach Westen setzt sich die Bestandesstruktur fort, wobei in einer Tiefe von ca. 100 Metern keine weiteren Vogelkirschen vorhanden sind. Die einzelbaum- bis gruppenweise vorkommenden Kirschen sind wegen der außerordentlichen Schaftqualität von der Deutschen Kontrollvereinigung für forstliches Saat- und Pflanzgut e. V. als Teilbestand der Kontrollzeichenherkunft **Göttinger Wald** anerkannt.

Die Zweige aller Vogelkirschen in dem Bestand sowie von weiteren fünf aus einem vorgelagerten Feldgehölz wurden mit Hilfe der Tell-Methode (WALDSCHMIDT 1992) geworben, was bei Baumhöhen zwischen 20 und 25 Metern bei der Reisergewinnung teilweise nur mit erheblichem technischen und zeitlichen Aufwand möglich war. Neben der genetischen Inventur der Vogelkirschen wurden phänologische Studien zur Einschätzung der Blühverlaufs, der unmittelbaren Auswirkungen auf das Paarungssystem hat, durchgeführt. Eine Vogelkirsche (Nr. 23) ist während der Untersuchungen im Rahmen einer Durchforstung gefällt worden, so daß zwar deren Knospen genetisch untersucht sind, aber keine phänologischen Daten vorliegen. Das Vogelkirschenvorkommen wird im Folgenden unter der Bezeichnung **Wibbecke** geführt. Die Verteilung der Vogelkirsche in dem Bestand ist in Abbildung 2-3 dargestellt.



Abb. 2-3: Verteilung der Vogelkirschen im Vorkommen **Wibbecke**

(3) Ein blühphänologisch weitgehend isolierter Einzelbaum AS 1 in der Gemarkung Geismar befindet sich im Dreieck der Straßen Adolf-Sievert-Straße, Bornbreite und Teichstraße und bildet mit sieben Kirschen (BB 1 und 2, EIS 1, WB 1 bis 4) der näheren Umgebung das dritte zu untersuchende Vorkommen, das in der vorliegenden Arbeit mit **Geismar** bezeichnet wird. Die relativ frühblühende, daher zeitlich isolierte Vogelkirsche AS 1 wurde 1999 als weiblicher Paarungspartner für die Kreuzungsversuche im Freiland und Bestäubungsversuche *in vitro* verwendet. Der Fruchtansatz nach künstlicher Bestäubung bzw. freier Abblüte bildete die Grundlage für die Einschätzung des Befruchtungserfolgs. Knospen im Ruhezustand bildeten das Material für die genetischen Untersuchungen. Darüber hinaus wurden Blüten geerntet, die als Griffel bzw. Pollen in den Inkompatibilitätsuntersuchungen Verwendung fanden.

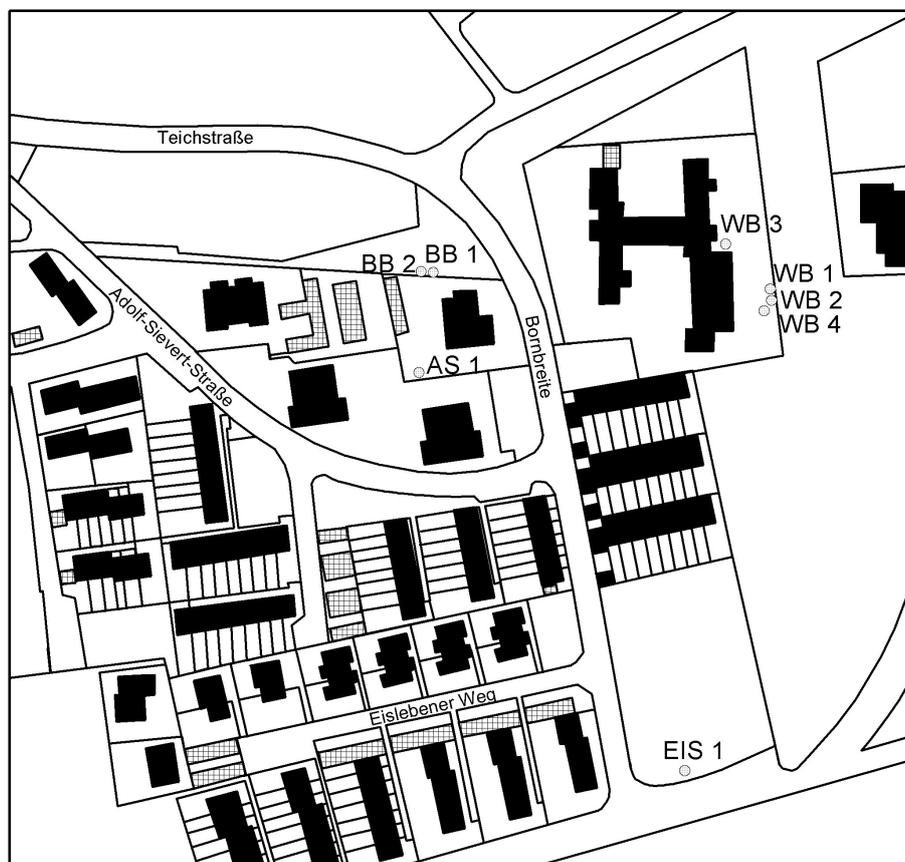


Abb. 2-4: Lage der Vogelkirschen im Vorkommen **Geismar**

(4) Samenplantagen der Vogelkirsche, deren Pflöpfung aus einer Vielzahl von Populationen geworben wurden, bieten eine einigermaßen hinreichende Gewähr dafür, daß sie einen repräsentativen Querschnitt von unterschiedlichen regionalen Vorkommen in Westdeutschland bilden. Vier Samenplantagen wurden mit Hilfe von biochemisch-genetischen Markern charakterisiert und bilden die Grundlage für Aussagen zur genetischen Variation der Vogelkirsche in Deutschland. Es handelt sich um zwei Erhaltungs- sowie zwei Produktionssamenplantagen. Die Erhaltungssamenplantagen sind von der Forstverwaltung des Landes Rheinland-Pfalz angelegt worden. Eine der beiden Produktionsplantagen befindet sich im Eigentum der Forstverwaltung des Landes Nordrhein-Westfalen und

die andere im Privatbesitz der Firma C. Appel mit Geschäftssitz in Darmstadt. Es ist verbürgt, daß jede Samenplantage aus vollständig verschiedenen Ausgangspopulationen abgepfropft wurde. In ihrer Gesamtheit bieten sie daher einen verbesserten Überblick der genetischen Variation in westdeutschen Vogelkirschenvorkommen.

(5) Für orientierende Untersuchungen zur Samenmorphologie wurde Saatgut verschiedener Einzelbäume aus den Vorkommen Göttingen-*Geismar*, Göttingen-*Weende*, *Hüttners Hochzucht* und *Süddeutschland* sowie Saatgutmischproben weiterer Vogelkirschenvorkommen verwendet und gegenübergestellt. Die verwendeten Vorkommen sind zusammen mit den untersuchten Samenplantagen in Abbildung 2-5 kartenmäßig wiedergegeben.



Abb. 2-5: Karte der samenmorphologisch untersuchten Vorkommen bzw. biochemisch-genetisch charakterisierten Samenplantagen

2.2 Methoden

Markergestützte Inventuren der ausgewählten Vorkommen, phänologische Beobachtungen sowie räumliche und soziologische Erhebungen dienen der Herleitung von Hypothesen über Mechanismen des genetischen Systems, die die genetische Variation erhalten und generieren. Dies betrifft im wesentlichen den Reproduktionsmodus, das Paarungs- und Genflußsystem. Das Inkompatibilitätssystem, ein Untersystem des Paarungssystems, spielt eine zentrale Rolle für alle weiteren Betrachtungen.

Beginnend mit Bestäubungsversuchen am Baum, fortsetzend mit Versuchen zum Pollenschlauchwachstum *in vitro* und abschließend mit neueren Techniken zur Identifikation von Inkompatibilitätstypen mittels Elektrophorese werden die verwendeten Methoden zur Analyse des Inkompatibilitätssystems im Folgenden dargestellt.

2.2.1 Analyse des Inkompatibilitätssystems

Einen bedeutenden Beitrag zur Erhaltung der genotypischen Variation als Basis einer ausreichenden Anpassungsfähigkeit leistet das Paarungssystem einer Population. Das Inkompatibilitätssystem als wichtige Komponente des Paarungssystems einer Population beeinflusst das Paarungsverhalten zwischen den an den Paarungen beteiligten Individuen durch Wechselwirkungen zwischen den Inkompatibilitätsgenen dieser Individuen. Die Interaktionen sind an bestimmte Phasen der genetischen Information (Haplo- bzw. Diplophase) der beteiligten Individuen gebunden.

STEINER (1992) definiert Inkompatibilität allgemein als die Abwesenheit von Zufallsfusion zwischen den eine Bestäubungseinheit bestäubenden Pollen und den über diese Bestäubungseinheit erreichbaren Eizellen. Im Idealfall ist Zufallsfusion realisiert, wenn jeder auf einer Narbe gelandeter Pollen die gleiche Chance hat, um die Befruchtung der über diese Narbe erreichbaren Eizellen zu konkurrieren. Im Gegensatz dazu hat sowohl die Zurückweisung oder Wachstumshemmung einzelner Pollentypen als auch die Förderung bestimmter anderer Pollentypen eine Abweichung von der Zufallsfusion zur Folge. Sind diese Typisierung der Pollen und die anschließende Hemmungsreaktion genetisch bedingt, läßt sich das Inkompatibilitätsverhalten analysieren.

Inkompatibilität ist ein Mechanismus, der bei kosexuellen Pflanzen Selbstbefruchtung verhindert. Aus genetischer Sicht bietet sich eine Einteilung der Inkompatibilitätssysteme nach der Art ihrer genetischen Kontrolle an, was der klassischen Unterscheidung nach sporophytischen und gametophytischen Systemen entspricht. Im Fall des sporophytischen Systems sind die jeweiligen diploiden Genotypen des Pollenspenders und -empfängers für den möglichen Erfolg einer Bestäubung verantwortlich; die Pollenkeimung unterbleibt, wenn das gleiche dominante Allel im Pollen der bestäubenden und in der Narbe der bestäubten Pflanze aktiv ist. Beim gametophytischen System treten der haploide Genotyp des Pollens (Gametophyt) und der diploide Genotyp des Pollenempfängers in Wechselwirkung und lösen bei Übereinstimmung des Allels im Pollen mit einem der beiden kodominanten Allele des bestäubten Sporophyten die Inkompatibilitätsreaktion aus. In beiden Fällen ist es aufgrund der genetischen Steuerung der Erkennungsreaktion unerheblich, ob es sich um Eigenpollen oder Pollen einer inkompatiblen anderen Pflanze handelt. Die Be-

fruchtung und ein Fruchtausatz bleiben aus, wenn die beschriebene Art der genetischen Übereinstimmungen zwischen Pollen und Fruchtknoten bestehen. In Kreuzungen zwischen jeweils zwei Individuen lassen sich deren Inkompatibilitätsreaktionen nachweisen und sich diese anschließend bestimmten Inkompatibilitätsgruppen zuordnen. Gametophytische Inkompatibilität ist an Rosen- und Nachtschattengewächsen nachgewiesen worden (EAST & MANGELSDORF (1925), CRANE & LAWRENCE (1929)). Die biochemischen Reaktionen des Inkompatibilitätslocus bei inkompatiblen und kompatiblen Pollen hat DE NETTANCOURT (1977) in folgendem Schema, das in Abbildung 2-6 wiedergegeben wird, skizziert.

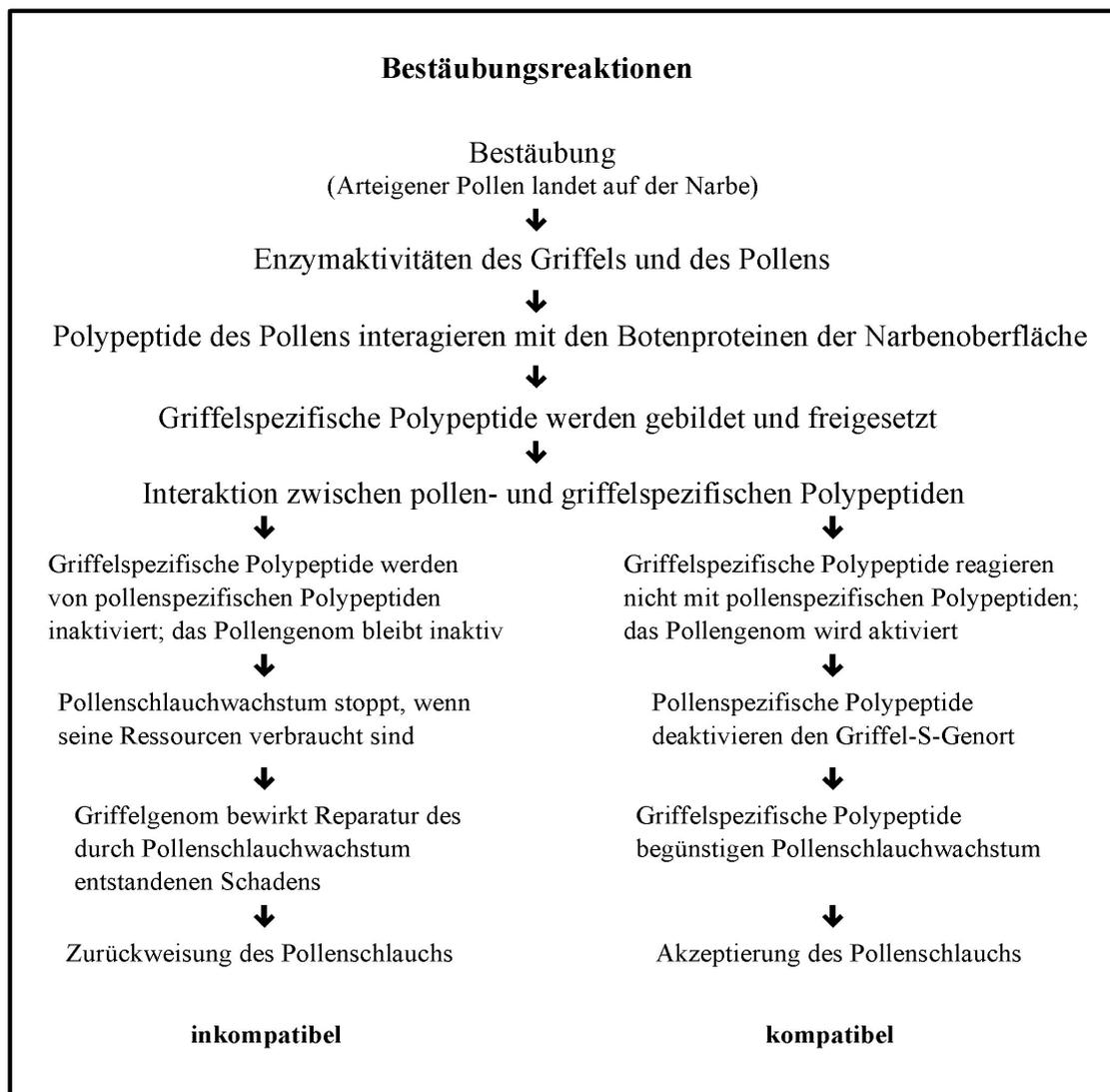


Abb. 2-6: Reaktionen nach Bestäubung mit inkompatiblen und kompatiblen Pollen (nach DE NETTANCOURT 1977)

Aus Abbildung 2-6 wird ersichtlich, daß beim gametophytischen Inkompatibilitätssystem die Hemmung des Pollenschlauchs erst während des Pollenschlauchwachstums im Griffelgewebe stattfindet. Ein erster Nachweis von *S*-RNAsen als Genprodukten des *S*-Genlocus gelang McCLURE et al. (1989) in der Blüte vom Tabak (*Nicotiana glauca*).

Verschiedene genetische Varianten von griffelbürtigen *S*-RNasen bei der Kulturkirsche haben BOŠKOVIĆ & TOBUTT (1996) identifiziert und damit einen wesentlichen Beitrag zur Beobachtbarkeit des Inkompatibilitätssystems geleistet. CERTAL et al. (1999) weisen *S*-RNasen im Griffel entlang des wachsenden Pollenschlauches beim Apfel nach.

KAO & McCUBBIN (1996) stellen zwei physiologische Wege vor, nach denen die Hemmung des Pollens erfolgen könnte, und identifizieren *S*-RNasen als Proteinklasse, die für die Inkompatibilitätsreaktionen verantwortlich sind. Die Wechselwirkung mit dem *S*-Allel im Pollen ist noch völlig ungeklärt (KAO & McCUBBIN 1996).

DE NETTANCOURT (1977) hat erste Vorstellungen entwickelt, wie die pollen- und griffelspezifischen Reaktionen im Genom aktiviert bzw. deaktiviert werden. Demnach setzt sich der Inkompatibilitätsgenlocus aus drei Segmenten der DNA zusammen, von denen eines der kodierende Bereich der Inkompatibilität, das Spezifizierungssegment S_i , darstellt, während die beiden anderen A_p bzw. A_s für die Aktivierung des Spezifizierungssegments S_i zuständig sind. A_p aktiviert dabei nur im Pollen und A_s nur im Griffel die Spezifizierungsregion S_i , wie in Abbildung 2-7 für die drei Kompatibilitätsklassen (inkompatibel, semikompatibel und vollständig kompatibel), die für Paarungen von jeweils zwei *S*-Genotypen existieren, dargestellt ist.

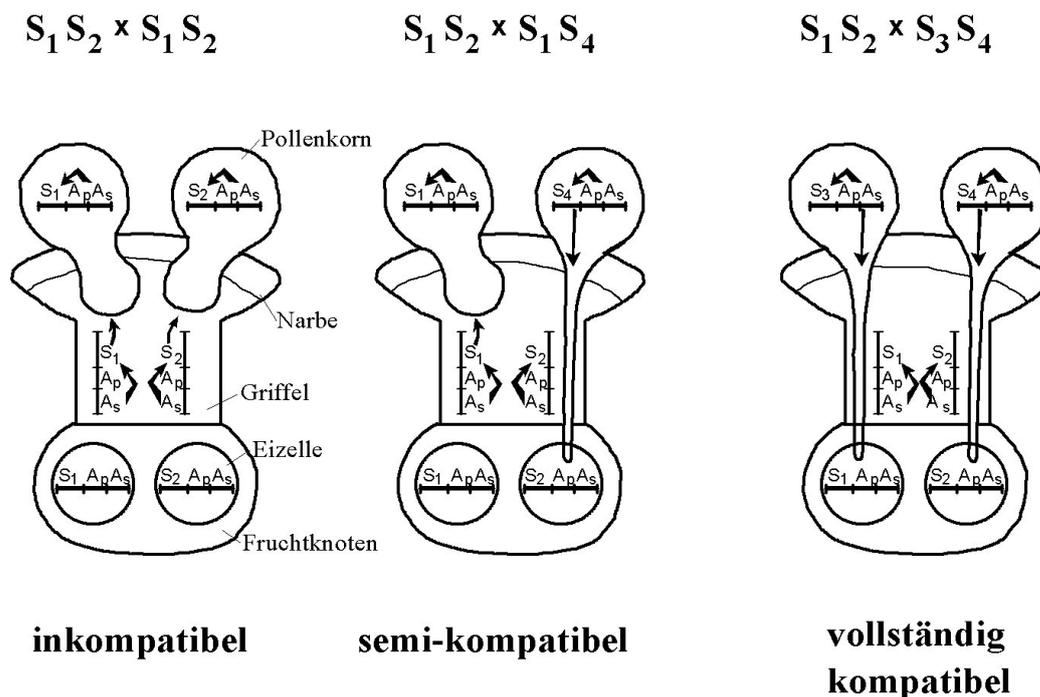


Abb. 2-7: Funktion des *S*-Genlocus eines *S*-Genotyps nach der Paarung mit unterschiedlichen Polleneltern (verändert nach DE NETTANCOURT 1977)

DE NETTANCOURT (1977) begründet das Vorhandensein von phasenspezifischen Aktivierungssegmenten mit der Tatsache, daß Pollen durch Mutationen in eine inaktivierte Form überführt werden kann und anschließend selbstfertil ist, während das Griffelgewebe seine Inkompatibilitätseigenschaft beibehält. Die Wirkungsweise der Aktivierung

und Deaktivierung wird in Abbildung 2-7 an drei Kreuzungen eines S -Genotyps mit drei unterschiedlichen S -Genotypen schematisch aufgezeigt, wie sie bereits bei ARASU (1968) beschrieben ist.

In Abbildung 2-7 sind drei Blüten des Genotyps S_1S_2 schematisch dargestellt, wobei eine Reduktion auf Narbe, Griffel, Fruchtknoten und zwei Eizellen erfolgt ist. Nur S_1 - und S_2 -Pollen werden gehemmt, während S_3 - und S_4 -Pollen zur Befruchtung der Eizellen führen. Im ersten Fall spricht man von Inkompatibilität. Da sich auf der zweiten Narbe nach der Bestäubung durch Pollen einer Pflanze mit dem Genotyp S_1S_4 nur S_4 -Pollen entwickeln kann und der S_1 -Pollen gehemmt wird, kann es dennoch zu einer Befruchtung einer der Eizellen kommen. Diese Kreuzung ist daher nur zur Hälfte kompatibel bzw. inkompatibel und wird mit dem Begriff semikompatibel belegt. Von Pollenschläuchen beider Pollentypen S_3 und S_4 kann der Griffel erfolgreich durchwachsen werden, wie es beim dritten Griffel der Fall ist. Diese Kreuzung ist somit vollständig kompatibel.

Da der S -Genotyp eines Individuums vor der Einführung biochemisch-genetischer Marker nicht direkt beobachtet werden konnte, bildeten seine Paarungen mit anderen die Grundlage für die Zuordnung jeder Paarung zu einer der drei Kompatibilitätsklassen. Im Kreuzungsexperiment lassen sich semi- und vollständig kompatible Paarungen erst nach einer Rückkreuzung der Nachkommen mit beiden Eltern unterscheiden. Unter der Annahme von Zufallsfusion unter den kompatiblen Gameten ergeben sich die folgenden Kompatibilitätsverhältnisse:

- (1) Jeder Nachkomme aus einer vollständig kompatiblen Kreuzung ist zu jedem der beiden Eltern und zur Hälfte aller Nachkommen semikompatibel. Zu einem Viertel der Nachkommen besteht vollständige Kompatibilität und zum anderen Viertel Inkompatibilität.
- (2) Während die Nachkommen aus einer semikompatiblen Kreuzung zu ihrem Samenerter immer semikompatibel sind, ist nur eine Hälfte der Nachkommen zum Pollenerter semikompatibel und die andere Hälfte inkompatibel. Untereinander verhalten sie sich jeweils zur einen Hälfte semikompatibel und zur anderen inkompatibel.

Trotz der Einstufung der Kompatibilität einer Paarung bleibt die Identität des S -Genotyps unbekannt. Um jedoch den S -Genotyp eines Individuums durch den Besitz ganz bestimmter Allele exakt charakterisieren können, muß ausgehend von einem festgelegten Genotyp S_1S_2 in zahlreichen Kreuzungsexperimenten, bei denen jedes nachweislich neue S -Allel eine fortlaufende Nummer erhält, ein Referenzkollektiv für alle nachgewiesenen S -Genotypen aufgebaut werden, wie TSUKAMOTO et al. (1999) das für *Petunia axillaris* praktiziert haben.

CRANE & LAWRENCE (1931) beobachteten den Fruchtansatz von Kreuzungen zwischen 19 Kirschenkultursorten und ordneten diesen fünf Inkompatibilitätsgruppen zu. KOBEL et al. (1938) untersuchten das Inkompatibilitätssystem der Kulturkirschen in der Schweiz mit ähnlichen Ergebnissen wie CRANE & LAWRENCE (1931). Aufbauend auf späteren Arbeiten von CRANE & BROWN (1955) wurden von MATTHEWS & DOW (1969) die zu der Zeit bekannten Inkompatibilitätsgruppen, i. e. verschiedene Kultur-

sorten der Süßkirsche mit jeweils gleichem *S*-Genotyp, mit *S*-Allelbezeichnungen versehen, die noch heute als Richtlinie für die Bestimmung neuer Sorten dienen (SCHMIDT et al. 1999a). Für die Kulturkirsche zeigen SCHMIDT & TIMMANN (1997) die seit langem praktizierten Möglichkeiten auf, einerseits mit Hilfe von Kreuzungen am Baum und andererseits durch Beobachtung von Pollenschlauchwachstum *in vitro* einzelne Kultivare hinsichtlich ihres *S*-Genotyps zu charakterisieren. Aus der Sicht der Züchtung ist dies eine langjährige Prozedur, da die Kreuzungen jährlich zur Absicherung der Ergebnisse wiederholt und beim Erscheinen neuer Sorten durchgeführt werden müssen. Die von SCHMIDT & TIMMANN (1997) beschriebenen Methoden sind auch im Rahmen der vorgelegten Arbeit verwendet worden und werden im Folgenden vorgestellt.

2.2.1.1 Künstliche Bestäubungen am blühphänologisch isolierten Einzelbaum

Künstliche Bestäubungen mit Einzelbaumpollen wurden mit dem Ziel, die Kreuzbarkeit und den Kreuzungserfolg verschiedener Vogelkirschen der räumlich isolierten Population **Weende** zu dokumentieren, an einem blühphänologisch isolierten Einzelbaum AS 1 durchgeführt. Der benötigte Pollen wurde Ende März 1999 nach Einstellen von Blühreisern ins Gewächshaus geworben. Dazu wurden geöffnete Blüten gepflückt und deren Antheren mit einer Pinzette in eine Petrischale abgestreift. In der pollendicht verschlossenen Petrischale springen die Pollensäcke nach kurzer Lagerung bei Zimmertemperatur auf. In diesem Zustand werden die Pollen in den Petrischalen im Kühlschrank bei etwa 4 °C bis zur Einkreuzung aufbewahrt. Mit Ausnahme der Vogelkirschen BD 6 und BD 8, die kaum Blütenansatz an den eingestellten Blühreisern zeigten, konnte von allen Bäumen Pollen gewonnen werden. Ziel der durchgeführten Kreuzungen ist die Differenzierung des Vorkommens in kompatible und inkompatible Individuen in Bezug auf den ausgewählten Einzelbaum AS 1. Da die Struktur der Inkompatibilitätstypen zum Zeitpunkt der Bestäubung unbekannt war, wurden acht Fremdbestäubungen sowie die obligatorische Selbstbefruchtung von AS 1 durchgeführt. Sieben Pollenspender aus dem Vorkommen **Weende**, von denen ausreichend Pollen zur Verfügung stand, kamen zur Anwendung. Im einzelnen waren dies die Bäume mit den Nummern BD 1, 2, 4, 5, 7, 9 und 10. Zusätzlich wurde noch ein Vertreter aus dem Vorkommen **Geismar**, der Baum BB 2, eingekreuzt. Dieselbe Pollensammlung, ergänzt um Pollen einiger weiterer Vogelkirschen, wurde auch für die Bestäubungsversuche *in vitro* verwendet, womit eine zusätzliche Methode zur Überprüfung der Pollenviabilität zur Verfügung stand.

Bei naßkalter Witterung wurden am 15. April 1999 zunächst an den für die Kreuzungsversuche markierten Zweigabschnitten des isolierten Einzelbaums AS 1 alle Blüten entfernt, deren Blütenstadium das Ballonstadium einer ungeöffneten Blüte überschritten hatten. Als Ballonstadium wird die Phase kurz vor der Öffnung der Blüte bezeichnet, bei der sich die weißen Kronblätter gleichsam wie ein Fesselballon aufstellen. Diese Blüten wurden mit Hilfe einer Spezialschere bearbeitet, die eine gleichzeitige Entfernung der Staubblätter und der Blütenkrone erlaubt, so daß bei der Emaskulierung der zentrale Griffel erhalten bleibt. Ziel war es etwa 50 bestäubungsfähige Narben für jeden Kreuzungsgang zu erhalten. Nach Beurteilung der Rezeptivität sämtlicher Narbenoberflächen wurde mit definiertem Einzelbaumpollen zweigabschnittsweise bestäubt.

Diese emaskulierten Blüten wurden nach der kontrollierten Bestäubung nicht eingehüllt, wie das bei windbestäubten Arten notwendig ist, da sie durch das Entfernen der Kronblätter und anhaftenden Nektarien keinerlei Attraktivität mehr für die natürlichen Bestäuber (z. B. Bienen und Hummeln) besteht. Windbestäubung bei der Kirsche wird durch den Pollenkitt weitgehend verhindert. Weiterhin sorgte in diesem Fall die kühle Witterung der folgenden Tage während dieser Kunstbestäubungsphase für ein deutlich verringertes Pollenangebot aus der Umgebung. Die Anzahl bestäubter Narben wurde protokolliert. Zum Vergleich mit der freien Abblüte wurde der Blütenansatz und spätere Fruchtanhang an drei weiteren, ebenfalls markierten, Zweigabschnitten erhoben. Am 30. Juni wurden die reifen Früchte jeder einzelnen Kreuzung – soweit vorhanden – geerntet, das Fruchtfleisch entfernt und die Samen eingelagert.

2.2.1.2 Bestäubungsversuche und Pollenschlauchwachstum nach etablierten Verfahren

Ausgehend von Bestäubungsversuchen zwischen Einzelbäumen, die mit entsprechenden Wartezeiten bis zur Feststellung der paarungsspezifischen Verträglichkeit verbunden sind (CRANE & LAWRENCE 1929), haben sich neuere Methoden der frühzeitigen Einschätzung von Kompatibilität und Inkompatibilität entwickelt, von denen ein weitgehend standardisiertes Verfahren bei SCHMIDT & TIMMANN (1997) detaillierter beschrieben ist. Es beruht im wesentlichen auf der empirisch abgeleiteten Erkenntnis, daß Pollen bei ausreichender Viabilität und entsprechender Kompatibilität binnen 24 Stunden gekeimt, das Griffelgewebe des Paarungspartners durchwachsen und zu einer erfolgreichen Befruchtung einer der beiden vorhandenen Eizellen geführt haben (STÖSSER 1966, 1980). Ausgehend von den *S*-Genotypen bereits bekannter Kultivare der Süßkirsche bilden Kreuzungsdiagramme die Grundlage für alle Bestäubungsversuche, die zur Identifikation der Inkompatibilitätsgenotypen neuer Sorten führen sollen. Für die Vogelkirsche können diese Verfahren, ausgehend von den bekannten Süßkirschensorten, zur Bestimmung gemeinsam genutzter *S*-Allele dienen.

Die einzelnen Arbeitsgänge sind im Folgenden chronologisch aufgelistet:

1. Beginnend mit der Gewinnung ungeöffneter Einzelbaumblüten, die im günstigsten Fall das späte Ballonstadium bereits erreicht haben, werden fünf, in unserem Fall sechs, davon, wie für Kreuzungen dargestellt, emaskuliert und in vorbereitete, geschlossene Kulturgefäße mit Agarmedium eingesetzt. Nach dem Einsetzen wird das Gefäß immer wieder verschlossen. Dabei hat sich die Verwendung jeweils eines Kulturgefäßes für jeden Pollenelter bewährt, um Pollenkontaminationen in jedem Fall ausschließen zu können. Die Blüten verschiedener Bäume in einem Gefäß werden durch beschriftete Kartonstreifen entsprechend separiert.

2. Parallel zur Emaskulierung wird der benötigte Pollen in Form von Antheren in pollendichten Petrischalen eingesammelt und gegebenenfalls bis zur Verwendung kühl zwischengelagert. In evakuierten Glasröhrchen läßt sich die Keimfähigkeit des Kirschenpollens bei kühler Lagerung über mehrere Jahre erhalten.

3. Nach dem Einsetzen der Blüten wird die Weiterentwicklung der Narbenoberflächen bei Raumtemperatur beobachtet, bis diese einen feucht-glänzenden Schimmer als Anzei-

chen für günstige Bedingung der Pollenkeimung annehmen.

4. Entsprechend den Vorgaben eines Kreuzungsdiagramms werden die klebrigen Narben mit Pollen der definierten Paarungspartner bestäubt. Wie bereits unter 1. erwähnt, sollte nur ein Pollenelter pro Gefäß verwendet werden. Statt mit einem in 70%igem Äthylalkohol sterilisierten Glasstab für die Pollenübertragung auf die Narben kann auch ein auf die gleiche Weise gereinigter Finger zum Einsatz kommen. Es ist jedoch stets darauf zu achten, daß nach jedem verwendeten Pollenelter eine erneute, intensive Reinigung der Übertragungswerkzeuge notwendig ist. Das Kulturgefäß wird nach jedem Öffnen stets wieder verschlossen.

5. Für 48 Stunden werden die bestäubten Blüten zur Pollenkeimung und Entwicklung der Pollenschläuche bei Raumtemperatur sich selbst überlassen. Da diese Untersuchungen ausschließlich während des Frühjahrs möglich sind und eine Vielzahl paralleler Aktivitäten die sofortige Aufbereitung in den seltensten Fällen zuläßt, wird mit dem folgenden Arbeitsschritt erst mit einigem zeitlichen Abstand fortgefahren. Um die Qualität der späteren Präparate zu gewährleisten, erfolgt eine kühle Zwischenlagerung. Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurde jedoch sofort mit der Aufbereitung der bestäubten Blüten begonnen.

6. Die weitere Präparation der Blüten, die im wesentlichen noch aus dem Griffel, dem Fruchtknoten und dem Blütenboden mit anhängendem Stiel bestehen, erfolgt für jede Kreuzung separat durch 10minütiges Kochen in 1 n Natronlauge (NaOH). Nach dem Abkühlen und intensiven Spülen unter fließendem Wasser werden die Blüten für eine Stunde in 0,1%iger Anilinblau-Lösung gefärbt. Mit der Herstellung von Quetschpräparaten für die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wird der letzte Arbeitsschritt vorbereitet.

7. Abschließend wird das Pollenschlauchwachstum jeder einzelnen Blüte nach einem festen Boniturschema bewertet, das in der folgenden Tabelle 2-1 wiedergegeben wird:

Tab. 2-1: Boniturschema für Pollenschlauchwachstum nach 48 Stunden

Wertung	Kriterium
1	Pollenkörner auf der Narbe gekeimt
2	Pollenschlauch ein Viertel des Griffels durchwachsen
3	Pollenschlauch die Hälfte des Griffels durchwachsen
4	Pollenschlauch drei Viertel des Griffels durchwachsen
5	Pollenschlauch in der Nähe des Fruchtknotens
6	Pollenschlauch am Fruchtknoten
7	1 Pollenschlauch im Fruchtknoten
8	2 bis 5 Pollenschläuche im Fruchtknoten
9	mehr als 5 Pollenschläuche im Fruchtknoten

Nur die Wertungsnoten 1 und 2 sowie 7 bis 9 erlauben klare Aussagen zur Inkompatibilität bzw. Kompatibilität der Paarung. In allen übrigen Fällen sollten die Paarungen

wiederholt werden, um zu eindeutigen Aussagen hinsichtlich deren Einordnung zu kommen.

Das Kreuzungsdiagramm, das in Tabelle 2-2 wiedergegeben ist, zeigt die durchgeführten Paarungen *in vitro*. Wegen der begrenzten Anzahl von Blüten und Pollen wurden bevorzugt benachbarte Bäume auf ihre Kompatibilität überprüft. Um jedoch die vollständige Information über die Kompatibilität der in dem Vorkommen vorhandenen Bäume zu erhalten, hätte ein Diallel, in dem jeder Pollenspender mit jedem Eizellendonator gepaart wird, durchgeführt werden müssen – für Studien in größeren Populationen ein kaum zu realisierender Aufwand.

Tab. 2-2: Kreuzungsdiagramm für die Kompatibilitätsprüfung *in vitro*

		Pollenspender											
		BD 1	BD 2	BD 3	BD 4	BD 5	BD 7	BD 9	BD 10	BD 11	AS 1	BB 2	EIS 1
Narbondonator	BD 1	+									+		
	BD 2	+									+		
	BD 3		+	+									
	BD 4		+	+	+						+		
	BD 5				+						+		
	BD 7				+	+	+						
	BD 9			+				+			+		
	BD 10	+						+	+		+		
	BD 11							+	+	+			
	AS 1											+	+
	BB 2										+		+
	EIS 1											+	

2.2.1.3 Analyse von *S-RNasen*

Die elektrophoretische Methode zur Identifikation von *S-RNasen* in Griffeln einer Vielzahl bekannter Kulturkirschensorten wurde an der britischen Forschungseinrichtung **Horticulture Research International** entwickelt und der Vererbungsmodus der *S-RNasen* nachgewiesen (BOŠKOVIĆ & TOBUTT 1996, 1998 sowie BOŠKOVIĆ et al. 1997a). Neben den sechs bei der Kulturkirsche weitverbreiteten und in Kreuzungsuntersuchungen bisher entdeckten *S*-Allelen konnten mit dieser Methode weitere sowohl bei der Kultur- wie auch bei der Vogelkirsche entdeckt werden (BOŠKOVIĆ pers. Mitt.). Während eines Forschungskurzaufenthaltes im September 1999 beim **Horticulture Research International** in East Malling wurden ausgewählte Vogelkirschen der eingangs beschriebenen Untersuchungspopulationen hinsichtlich ihres Inkompatibilitätsgenotyps analysiert. Im einzelnen handelt es sich bei den Kirschen um die Klonbasis der Samenplantage **Neuhemsbach** und die Vorkommen **Weende** und **Geismar**. Vor Ort wurden die Arbeiten von Herr Dr. Radovan Bošković betreut, der sich zu diesem Zeitpunkt in Großbritannien aufhielt. Die methodische Vorgehensweise wird im Folgenden detailliert vorgestellt.

Die Gene der *S*-RNasen werden nur in den reifen Sexualorganen exprimiert (BELL 1995); bei der Kirsche befinden sie sich im Griffel der Blüte. Nach der Extraktion von *S*-RNasen aus Griffeln werden diese in einem speziellen Elektrophoreseverfahren, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), aufgetrennt. Anders als bei der klassischen Elektrophorese, bei welcher die Moleküle nach ihrer Größe und pH-spezifischen Nettoladung separiert werden, trennt die IEF die Moleküle nach ihrem isoelektrischen Neutralpunkt, der nur bei einem spezifischen pH-Wert erreicht wird. Im IEF-Gel herrscht ein pH-Gradient von basisch bis alkalisch. Der am Gel angelegte elektrische Stromfluß bewirkt die Mobilität der Moleküle. Durch die spezielle Nachweisreaktion, die hier zu einer Entfärbung des blau kolorierten Gelhintergrundes führt, können die Enzymreaktionen der *S*-RNasen sichtbar gemacht werden. Das typische Muster der *S*-RNasen besteht aus zwei einzelnen Banden, da die Allele am *S*-Genlocus nur in heterozygoter Form vorliegen. Selbstfertile Kulturkirschen, deren Vorfahren im wesentlichen aus Bestrahlungsversuchen stammen, besitzen die inaktivierte Form eines bekannten *S*-Allels, das sich in der IEF fast wie seine Urform verhält. Weiterhin existieren Nullallele, die im Zymogramm nicht nachweisbar sind. Die entsprechend heterozygoten Genotypen erzeugen daher im Zymogramm nur Einzelbänder. Sowohl die genetische Interpretation als auch die genetische Kontrolle dieser Einzelbanden sind nachgewiesen (BOŠKOVIĆ pers. Mitt.).

Die Methode der Probenaufbereitung und Elektrophorese ist im Anhang ausführlicher wiedergegeben.

2.2.2 Isoenzymanalysen

Unter Isoenzymen versteht man sehr allgemein strukturell unterschiedliche Molekülvarianten eines Enzyms mit identischer oder fast identischer katalytischer Stoffwechselfunktion. Sind Isoenzyme infolge von Genmutationen als Produkte verschiedener Allele eines einzigen Genlocus entstanden, werden diese auch als Alloenzyme bezeichnet. Unterschiede in der Molekülstruktur dieser Isoenzyme führen bei einem definierten pH-Wert zu spezifischen Nettoladungen, welche die Wanderungsgeschwindigkeit der Isoenzyme in einem elektrischen Feld determinieren und somit zu deren Trennung in der Elektrophorese genutzt werden. Durch spezifische histochemische Reaktionen sichtbar gemacht, dienen die visualisierten Isoenzymphänotypen als Basis für die Analyse von Enzymsystemen, für die Etablierung von Methoden ihrer genetischen Interpretation sowie für die Verwendung von identifizierten Isoenzym-Genmarkern für genetische Inventuren in Waldbaumpopulationen. Der besondere Vorteil der Isoenzyme liegt in der kodominanten Ausprägung der Phänotypen (GILLET 2000). Erste Arbeiten zur genetischen Kontrolle von Isoenzymphänotypen bei der Fichte wurden u. a. von BARTELS (1971) und BERGMANN (1971) veröffentlicht. Seitdem ist eine Vielzahl von populationsgenetischen Untersuchungen mit Isoenzymen durchgeführt worden. Zahlreiche Anwendungsbeispiele finden sich bei MÜLLER-STARCK & ZIEHE (1991) und FINESCHI et al. (1991).

Isoenzymuntersuchungen bei Kirschen sind von KAURISCH et al. (1988, 1991) und GRANGER et al. (1993) an Kultursorten von *Prunus avium* L. sowie von SANTI (1988) und SANTI et al. (1990) für die Vogelkirsche durchgeführt worden. Während KAURISCH et al. (1988, 1991) Stärkegele zur Trennung der Isoenzyme benutzen, setzten

SANTI (1988) und SANTI et al. (1990) Polyacrylamid und GRANGER et al. (1993) Zelluloseacetat als Trennmedien bei der Elektrophorese ein. Ausgehend von Standardverfahren der Stärkegel-Elektrophorese, wie sie für die Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) bereits entwickelt sind, wurden verschiedene Modifikationen am Trennsystem vorgenommen, um die Trennschärfe der Zymogramme zu optimieren. Folgende Enzymsysteme wurden in der vorliegenden Arbeit auf mögliche Polymorphismen untersucht (s. Tabelle 2-3) und davon solche ausgewählt, an denen unterschiedliche genetische Varianten des jeweiligen Isoenzym nachgewiesen werden konnten.

Tab. 2-3: Auf mögliche Polymorphismen bei der Vogelkirsche untersuchte Enzymsysteme

Enzym	EC-Nummer	Abkürzung
Aconitase	4.2.1.3	ACO
Alaninaminopeptidase	3.4.11.1	AAP
Alkoholdehydrogenase	1.1.1.1	ADH
Diaphorase	1.6.2.2	DIA
Formiatdehydrogenase	1.2.1.1	FDH
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	1.1.1.49	G6PDH
Glutamat-Oxalat-Transaminase	2.6.1.1	GOT
Isocitratdehydrogenase	1.1.1.42	IDH
Leucinaminopeptidase	3.4.11.1	LAP
Malatdehydrogenase	1.1.1.37	MDH
Malatenzym	1.1.1.40	ME
Menathionreduktase	1.6.99.2	MNR
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-dehydrogenase	1.6.99.5	NDH
Phosphoglucoisomerase	5.3.1.9	PGI
Phosphoglucomutase	2.7.5.1	PGM
6-Phosphoglucoosedehydrogenase	1.1.1.43	6PGDH
Polyphenoloxidase	1.14.18.1	PPO
Saure Phosphatase	3.1.3.2	SAP
Shikimatdehydrogenase	1.1.1.25	SKDH
Superoxiddismutase	1.15.1.1	SOD

Eine Vielzahl von Enzymsystemen, für die in anderen Arten Polymorphismen beschrieben sind, erwiesen sich als monomorph. Das gilt bei der Vogelkirsche für ADH, FDH, MNR, NDH, SAP und SOD. AAP und LAP zeigen bei ihrer Anfärbung identische Zymogramme, so daß von einer Unspezifität der jeweils vorliegenden Aminopeptidase (AP) hinsichtlich der reagiblen Proteine ausgegangen werden kann. Bei allen folgenden Untersuchungen wurde zwar nur noch Leucin als Substrat verwendet; die Bezeichnung LAP für das vorliegende Enzymsystem wäre aber irreführend, so daß im weiteren Textverlauf nur noch vom Enzymsystem AP gesprochen wird.

In den Routineuntersuchungen wurden daher ausschließlich die polymorphen Enzymsysteme MDH, ACO, und PGI im Puffersystem TRIS-Citrat pH 7.0; AP, GOT und PPO in ASHTON pH 8.5 sowie SKDH, 6PGDH, IDH und PGM in TRIS-Maleat pH 7.5 getrennt. Ausführlicher ist die Methode der Probenaufbereitung und Elektrophorese im Anhang beschrieben.

Die Isoenzymphänotypen bilden die Grundlage sowohl für die Beschreibung klonaler Strukturen als auch für eine eingehende Vererbungsanalyse. Sie dienen somit letztendlich der Dokumentation genetischer Strukturen in Populationen.

2.2.3 Analyse des Vererbungsmodus

Die bisher veröffentlichten Interpretationen von Zymogrammen der unterschiedlichen Enzymsysteme bei Kirsche (KAURISCH et al. (1988, 1991), SANTI (1988), SANTI et al. (1990), GRANGER et al. (1993), GRANGER (1996b)) bildeten die Basis für die Einordnung der in den hier vorgestellten Untersuchungen gefundenen Isoenzymphänotypen bei der Vogelkirsche. Dazu werden die einzelnen Zymogramme zunächst erläutert (2.2.3.1) und anschließend die verwendete Methode zur Vererbungsanalyse (2.2.3.2) kurz beschrieben. Die Systematik der Kopplungsanalyse wird zusammen mit den zugehörigen Ergebnissen in 3.2.2 dargestellt.

2.2.3.1 Beschreibung der Zymogramme

Mit Hilfe von DIPLOGEN, einem computergestützten Auswertungsprogramm für Zymogramme (GILLET 1998), wurden für die vorliegenden Isoenzymmuster zunächst Hypothesen zur Anzahl der kodierenden Genloci und Allelvarianten formuliert und überprüft (s. a. Spaltungsanalyse).

Grundlage für eine genetisch einwandfreie Beschreibung von Zymogrammen ist die zweifelsfreie Erklärung ihres Vererbungsmodus.

Jedes Isoenzymmuster setzt sich aus einem oder mehreren Zonen zusammen, die von der Anode kommend mit fortlaufenden Großbuchstaben (A, B, ...) bezeichnet werden. Innerhalb der Zonen wiederum erhalten die verschiedenen Banden eine entsprechende numerische Bezeichnung in Abhängigkeit von ihrer Wanderungsgeschwindigkeit; hier wurde, beginnend mit der Nummer 1 für das langsamste Band, das jeweils nächstschnellere mit der jeweiligen Folgenummer bezeichnet. In diploidem Gewebe sind jeweils zwei Allele an jedem Genlocus vorhanden. Sind diese in ihrer Struktur und Wanderungsgeschwindigkeit identisch, spricht man von homozygoten Genotypen (z. B. A_2A_2). Im Fall struktureller und ladungsinduzierter Unterschiede handelt es sich um heterozygote Genotypen, die entsprechend der beiden nachgewiesenen Banden (z. B. A_1A_2) bezeichnet werden. SANTI (1988), SANTI et al. (1990), GRANGER et al. (1993) und GRANGER (1996b) wenden innerhalb der variablen Zonen eine hiervon abweichenden Bezeichnung an, in dem sie die schnellste Bande mit a und die nächstlangsamere mit b usw. bezeichnen. Nur SANTI (1988) und SANTI et al. (1990) weisen zudem Zonen von der Anode kommend mit einer fortlaufenden Numerierung aus.

Aus der Kenntnis der Zusammensetzung der verschiedenen Enzyme aus Polypeptiden lassen sich diese in unterschiedliche Gruppen einteilen. So werden Enzyme, die aus

exakt einem Polypeptid bestehen, als monomere Enzyme bezeichnet. Eine dimere Struktur bedeutet, daß das eigentliche Enzym aus zwei Polypeptidmolekülen zusammengesetzt ist. Das Wissen um diese Quartärstruktur ist für die genetische Interpretation von Isoenzymmustern hilfreich. In der folgenden Tabelle 2-4 werden die untersuchten Enzymsysteme der Vogelkirsche bezüglich ihrer Quartärstruktur (nach ACQUAAH 1992), die artübergreifend weitgehend identisch ist, klassifiziert und die Zahl vorhandener Genloci und die an den polymorphen Loci nachgewiesenen Genvarianten (Allele) aufgelistet.

Tab. 2-4: Übersicht der interpretierten Enzymsysteme bei der Vogelkirsche

Enzym-system	Quartärstruktur nach ACQUAAH (1992)	Anzahl Genloci	Anzahl polymorpher Genloci	Anzahl Allele
ACO	monomer	2	1	2
AP	monomer	2	1	2
PGM	monomer	2	1	2
PPO	monomer	3	1	2
GOT	dimer	3	1	2
IDH	dimer	2	1	2
MDH	dimer	2	1	2
PGI	dimer	2	1	3
SKDH	dimer	2	1	2
6PGDH	dimer	2	1	2

2.2.3.2 Spaltungsanalyse

Während anfänglich noch aufwendige Kreuzungsprogramme notwendig waren, um den Vererbungsmodus der Isoenzyme verlässlich und reproduzierbar zu analysieren, wurden später modellgestützte Methoden entwickelt, die - zunächst noch auf den Mendelgesetzen basierend (GILLET & HATTEMER 1989) - kontinuierlich konzeptionell weiterentwickelt wurden (GILLET 1991, 1996, 1997, GILLET & GREGORIUS 2000). Die Entwicklung derartiger Methoden wurde erforderlich, weil nicht bei allen Arten die Möglichkeit besteht, Nachkommen aus künstlichen Bestäubungen zu erzeugen. Diese Methoden bauen daher im Vergleich zu den klassischen Verfahren nicht ausschließlich auf den Nachkommen eines Elternpaares oder eines Samenelters aus freier Ablüte auf, sondern sind für allgemeine Kollektive mit bestimmten Eigenschaften gültig. Diese Eigenschaften lassen sich im wesentlichen durch die genetische Abgeschlossenheit und die ausreichende Stichprobengröße fassen.

Genetische Abgeschlossenheit eines Kollektivs bedeutet in diesem Zusammenhang, daß sämtliche Isoenzymmuster, die als mögliche Kombinationen des zu untersuchenden Vererbungsmodus auftreten könnten, auch tatsächlich im untersuchten Kollektiv vorhanden sind. Am besten läßt sich dies durch eine ausreichend große und somit repräsentative Stichprobe aus dem gesamten Kollektiv absichern, wenn eine vollständige Untersuchung wie bei individuenreichen Populationen kaum möglich erscheint. Die Berechnung der minimalen Stichprobengröße richtet sich nach der Wahrscheinlichkeit, mit der eine seltene Allelvariante in einem Kollektiv diploider Individuen entdeckt werden kann (GREGORIUS 1980).

Ausgehend von den Isoenzymmustern eines genetisch abgeschlossenen Kollektivs diploider Individuen und unter Berücksichtigung bestimmbarer qualitativer Gesetzmäßigkeiten für die Interpretation von Einzelbanden (GILLET 1996), generiert DIPLOGEN (GILLET 1998) systematisch alle Hypothesen zum Vererbungsmodus dieser Muster. In mehreren untersuchten Fällen hat sich die vollständige Konsistenz mit den Ergebnissen aus Kreuzungsexperimenten ergeben.

Das computergestützte Auswertungsprogramm für diploide Individuen DIPLOGEN (GILLET 1998) ermöglicht die Identifikation aller durch den jeweiligen Datensatz nicht falsifizierten Vererbungsmodi.

Diesem Verfahren liegt folgende Konzeption zugrunde: Die Ausprägungen genetischer Merkmale sind durch sexuelle Reproduktion entstanden. Sind Merkmale genetisch kontrolliert, läßt sich durch die Kombination von Einzelinformationen deren Vererbungsmodus feststellen. Eine wichtige Voraussetzung hierbei ist die genetische Abgeschlossenheit von Kollektiven, was gleichbedeutend mit dem Vorhandensein aller möglichen genetischen Varianten der betrachteten Merkmale ist.

Erst aus Kenntnis sämtlicher in einem Kollektiv, besser noch in der gesamten Art, vorhandenen Isoenzymmuster läßt sich bei diesem Verfahren deren Vererbungsmodus zweifelsfrei ergründen. Das Verfahren ist vom Grundsatz her gleichermaßen für die Analyse von kodominanten und dominanten Genwirkungssystemen geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren auf kodominant exprimierte Isoenzyme angewandt.

Die Grundlage der kombinatorischen Analyse bilden die Lage sämtlicher Einzelbanden in den Zymogrammen und ihre Verteilung auf die einzelnen Zymogramme. Alle nachgewiesenen Isoenzymmuster, die sich in Lage und Anzahl der Einzelbanden unterscheiden, werden erfaßt und ergeben den Datensatz eines Kollektiv. Die Lage jedes Einzelbandes wird als Elementarzone bezeichnet, die mit verschiedenen Bedeutungen hinsichtlich ihrer genetischen Interpretation behaftet sein könnte (Hauptbande, Intralocus- und Interlocus-Hybridbande usw.). Das Programm prüft unterschiedliche Vererbungshypothesen, indem es über alle Zymogramme die einzelnen Elementarzonen auf unterschiedliche Weise zu Genloci gruppiert und innerhalb der Gruppierungen die Konsistenz ihrer Vererbung analysiert.

DIPLOGEN (GILLET 1996) unterscheidet hierbei zwischen fixierten und nicht fixierten Elementarzonen. Fixierte Elementarzonen sind in allen Isoenzymmustern identisch vorhanden. Diese sind entsprechend als fixierte Genloci interpretierbar. Die nicht

fixierten Elementarzonen lassen sich nochmals hinsichtlich der Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit ihres Auftretens mit anderen unterteilen. Eine nicht fixierte Elementarzone ist dann abhängig, wenn zu dieser stets eine zweite Elementarzone vorhanden ist, die mit der abhängigen ersten zugleich an- oder abwesend ist. Die Abhängigkeit besteht daher zunächst in beide Richtungen, wobei die Art der Hypothesengenerierung und letztlich ihrer Interpretation als Haupt- und Nebenbande entscheidet, welches Abhängigkeitsverhältnis das wahrscheinlichere ist. Die Hauptbande repräsentiert immer einen korrespondierenden Genlocus, während die Nebenbande in polymeren Systemen als entweder Intralocus- oder Interlocus-Hybridenzym angesprochen werden kann. Abhängigkeit kann auch über mehr als zwei Elementarzonen hinweg bestehen. Zwei nicht fixierte Elementarzonen sind voneinander unabhängig, wenn die eine oder die andere oder auch beide gleichzeitig anwesend sind. Die Vererbungsanalyse dieser beiden Elementarzonen entscheidet wiederum, ob sie entweder zu einem Genlocus oder zu zwei unabhängigen Genloci gehören.

Die Isoenzymmuster von über 400 verschiedenen Vogelkirschen aus Altbeständen in verschiedenen Teilen Deutschlands sind in die Untersuchungen eingeflossen. Um seltene Varianten mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit im Kollektiv zu entdecken, sind entsprechende Stichprobengrößen anzustreben (GREGORIUS 1980). Um mit 99%iger Wahrscheinlichkeit einen seltenen Genotyp mit der relativen Häufigkeit 0,05 sicher zu identifizieren, sind 149 Individuen zu untersuchen. Für die Spaltungsanalysen, die an Samen, dem ersten für Isoenzymanalysen verfügbaren Stadium einer Zygotenpopulation, durchgeführt wurden, wurden ein Stichprobenumfang von 160 Samen pro Samenelter untersucht.

2.2.4 Erhebung der Bestandesstruktur

Neben Verfahren zur Beschreibung einfacher Waldstrukturen (Dimensionsverteilung, Artendiversität) etablieren sich zunehmend auch solche, mit denen sich mehr komplexere Merkmale der räumlichen Struktur (Aggregation, Durchmischung, Differenzierung) beschreiben und vergleichen lassen (VON GADOW 1999). Verfahren, die sowohl die tatsächliche räumliche als auch die soziologische Struktur einer einzigen Mischbaumart innerhalb eines artenreichen Bestandes abbilden könnten, sind nicht bekannt. Daher wurden, ausgehend von einem fest vermarkten Geländepunkt, die Standplätze aller Vogelkirschen der Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke mit Hilfe einer Bussole und einem Meßband erfaßt. Die soziologische Stellung jeder Kirsche wurde mittels Bestimmung ihres Brusthöhendurchmessers und der Einschätzung der KRAFT'schen Klasse beschrieben. Alle erfaßten Vogelkirschen wurden am Stammfuß für die Dauer der Untersuchungen nummeriert. Die räumliche Verteilung der erfaßten Vogelkirschen wird als Inselstruktur ohne die bestandesbildenden Baumarten kartenmäßig wiedergegeben (s. Abb. 2-3; S. 8).

2.2.5 Erhebung der Phänologie und Samenmorphologie

Neben genetischen Markern werden häufig auch variierende morphologische und phänologische Eigenschaften zur Charakterisierung und Unterscheidung von Individuen und Kollektiven verwendet. Die genetische Kontrolle dieser Merkmale ist im allgemeinen sehr komplex und in den seltensten Fällen eindeutig nachgewiesen worden, da die Expression des Phänotyps ein Zusammenspiel von Genotyp und Umwelt ist. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß alle physiologischen Vorgänge, ähnlich wie Prozesse des Blüten- oder Blattaustriebs, vom Genom sehr individuell reguliert werden. Insbesondere die Variationen in Bezug auf Blühdauer und -intensität haben unmittelbare Auswirkungen auf den reproduktiven Zusammenhalt einer Art. Daher erscheint es sinnvoll, auch ohne detaillierte Kenntnis ihres Vererbungsmodus, derartige Beobachtungen unter Beachtung ihrer beschränkten Aussagefähigkeit in die Betrachtungen zum Reproduktionssystem der Vogelkirsche einzubeziehen. Geht man weiter davon aus, daß Klone genetisch identische Individuen umfassen, so lassen sich in Klonkollektiven nur geringe Unterschiede hinsichtlich ihrer Phänologie erwarten. Das gilt auch für die Fruchtfarbe und die Morphologie des Samens, die beide auf maternale Genwirkung zurückzuführen sind und somit einer Klonunterscheidung dienen können.

2.2.5.1 Phänologie

Die Beobachtung einzelner Merkmale eines Individuums bildet die Grundlage phänologischer Erhebungen. Die das Merkmal kontrollierenden Genloci sowie deren Wechselwirkung mit der Umwelt erzeugen den Phänotyp. Unter weitgehend konstanten Umweltbedingungen sollten genetisch identische Individuen, z. B. Wurzelschößlinge, sehr ähnliche phänologische Eigenschaften besitzen, während genetisch verschiedene Individuen eine stärker voneinander abweichende Phänologie aufweisen. Die Komplexität der genetischen Kontrolle der beteiligten Genloci einerseits und die Verwendung relativ grob skalierten Boniturmethode andererseits ermöglichen keinesfalls den detaillierten Zugang zu den tatsächlichen Wechselbeziehungen, sondern können nur eine Ähnlichkeitsvermutung liefern. Unter dieser Prämisse sollen im Folgenden phänologische Erhebungen zu Blühverlauf und -stärke sowie Blattfarbe und -fall methodisch vorgestellt werden.

Der Blühverlauf der Vogelkirsche wurde in der Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke in den Jahren 1998 und 1999 erhoben. Zur Auswertung kann jedoch nur das Jahr 1998 kommen, da am 30. April 1999, kurz nach Blühbeginn, alle Blüten des Bestandes durch einen Hagelsturm zerstört wurden. In 1998 wurde an fünf Tagen (10., 18. und 22. April; 2. und 7. Mai) eine einzelbaumweise Einschätzung der Blühstärke nach folgender Werteskaliierung (Tab. 2-5) vorgenommen.

Die Einschätzung des Anteils geöffneter Blüten wurde mittels eines Feldstechers mit achtfacher Vergrößerung jeweils an mehreren Ästen der von unten einsehbaren Krone vorgenommen. Da sich die Blüten erst im Laufe des Vormittags öffnen, fanden die Blühbonituren in den frühen Nachmittagsstunden statt. Es wurde zwischen beginnender und ausklingender Blüte (in beiden Fällen sind bis zu 25% der Blüten geöffnet) unterschieden, um früh- und spätblühende Vogelkirschen in einem Diagramm voneinander

trennen zu können.

Tab. 2-5: Bewertungskriterien für Blühstärken bei der Vogelkirsche

Blühstärke	Kriterium
0	keine geöffneten Blüten
1	beginnende Blüte (bis zu 25% geöffnete Blüten)
2	mittlere Blüte(30 bis 50% geöffnete Blüten)
3	Vollblüte (50 bis 70% geöffnete Blüten)
4	ausklingende Blüte (bis zu 25% geöffnete Blüten)

Um die Verteilung der Blühstärke über den gesamten Boniturzeitraum besser darzustellen, wurden die individuellen Boniturnoten aufsummiert. Dabei wurde die Boniturnote 4 mit 1 bewertet, da sich die Noten 1 und 4 in ihrer Intensität entsprechen und lediglich zur Differenzierung zwischen früher und ausklingender Blüte verwendet wurden.

Da in keinem der Beobachtungsjahre nennenswerter Fruchtanhang zu verzeichnen war, können keine Angaben zur Variation der Fruchtfarbe in dem Vorkommen gemacht werden.

Die Variation in der herbstlichen Blattfarbe bei der Vogelkirsche ergibt sich aus der unterschiedlichen Intensität bei der Einlagerung von Schlackenstoffen, wie Anthocyanen (rot) und Carotinoiden (gelb) (STRASBURGER et al. 1983), und beim verzögerten Abbau von Chlorophyll (grün). Mit einer Bonitur am 16. Oktober 1998 wurde die Blattfarbe einzelbaumweise festgestellt.

Die Blattfarbe wurde anhand der drei vorkommenden farbgebenden Komponenten visuell eingeschätzt und nach dem folgenden Schema (Tab. 2-6) in sechs Farbvarianten unterschieden.

Tab. 2-6: Boniturnoten für die Einschätzung der herbstlichen Blattfarbe

Boniturnote	Blattfarbe
10	grün (keine erkennbar Herbstfärbung)
20	gelb
30	rot
12	grün- gelb
13	grün- rot
23	gelb-rot

Neben den drei einzelnen Farben (grün, gelb und rot) ergeben sich weiterhin Mischungen aus jeweils zweien, die in den drei angegebenen Mischklassen zusammengefaßt wurden. Bäume, die das grüne Blatt abwerfen, wurden mit 10 bonitiert. Entsprechendes gilt für die Boniturnoten 20 und 30, wobei die Blätter eines Baumes jeweils ausschließlich entweder die eine oder die andere Farbe tragen (hoher Carotinoid- bzw. Anthocyananteil). Die

Blattfarben grün-**gelb** und grün-**rot** beschreiben den sich noch verzögernden Abbau von Chlorophyll, weshalb die beim Blattfall zu erwartende Farbe im Text durch Fettdruck hervorgehoben ist. Die Mischfarbe **gelb-rot** beschreibt Blätter mit einem ausgewogenen Anteil beider Farbkomponenten. Der genaue Anthocyan- bzw. Carotinoidgehalt der Blätter wurde nicht näher bestimmt.

2.2.5.2 Erhebung der Samenmorphologie

Einblatt-Steinfrüchte zeichnen die *Prunoideae* (Steinobstgewächse) aus. Ihr einziges, mit dem ausgehöhlten Blütenboden nicht verwachsenes Fruchtblatt entwickelt außen Fruchtfleisch, innen aber einen sehr festen, meist einsamigen Steinkern (STRASBURGER et al. 1983), so auch bei der Vogelkirsche (*Prunus avium*). Bei der äußeren Hülle des Steinkerns, der im Folgenden synonym als Samen bezeichnet wird, handelt es sich demnach um maternales Gewebe, während das Kerninnere den aus der Reproduktion hervorgegangenen Embryo mit seinen Keimblättern darstellt. Die Samengröße scheint durch den Sameneltern genetisch festgelegt zu sein, da Samen verschiedener Bäume bezüglich ihrer Größe und somit ihres Gewichts sehr stark variieren können. Damit deutet sich an, daß diese Eigenschaft potentiell zur Charakterisierung eines Samenelterns und somit zur Identifikation seiner Samenverbreitung herangezogen werden kann.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden von verschiedenen Einzelbaumabsaaten jeweils 50 Samen abgezählt, insgesamt gewogen und anschließend jeder Same einzeln mit Hilfe einer Meßlehre hinsichtlich seiner Größe, differenziert durch die Meßgrößen Länge, Breite und Höhe, auf einen Zehntelmillimeter genau bestimmt. Die Streuung jeder Meßreihe um den jeweiligen Mittelwert wurde auf Normalverteilung getestet. Die Werte der Einzelbäume eines Vorkommens wurden zusammengefaßt und denen von Saatgutmischproben verschiedener Vorkommen, die nach der gleichen Methode gewonnen wurden, gegenübergestellt.

2.2.6 Datenanalyse

Die Auswertung der Daten im Hinblick auf die dargelegte Problemstellung bedient sich vorhandener statistischer Methoden und genetischer Maße zur Beschreibung genetischer Strukturen. Im Folgenden werden die verwendeten genetischen Maße und ihre Bedeutung für die vorliegende Untersuchung erläutert. Alle genetischen Variationsparameter wurden mit Hilfe des Programms GSED (**G**enetic **S**tructures from **E**lectrophoresis **D**ata; GILLET 1994) bestimmt.

2.2.6.1 Verwendete statistische Methoden

In GSED (GILLET 1994) ist bereits eine Reihe statistischer Tests zur Hypothesenprüfung, u. a. einen χ^2 - und G-Test integriert. Darüber hinaus wurde die Streuung der Einzelwerte der Samengröße im Vergleich zur Normalverteilung unter Microsoft Excel Version 5.0 getestet. Dafür mußte die Standardabweichung aus jedem Datensatz ermittelt werden.

2.2.6.2 Verwendete Parameter zur Beschreibung genetischer Strukturen

Ergebnisse der genetischen Inventur einer Population sind Häufigkeitsverteilungen genetischer Typen (Genotypen, Allele), die sich als Vektoren $P = (p_1, p_2, \dots, p_n)$ darstellen lassen, wobei die Summe $\sum_i p_i = 1$ ist.

Die **Diversität** v_2 (GREGORIUS 1978) gibt die effektive Anzahl von genetischen Typen in einer Population oder einem sonstigen Kollektiv an. Die Diversität beschreibt die Häufigkeitsverteilung definierter Typen (Genotypen, Allele), die als relative Häufigkeiten der vertretenen Typen abgebildet werden. Sind alle Typen gleich häufig, wird die maximale Diversität erreicht. Dabei kann die Diversität niemals die Größe des betrachteten Kollektivs überschreiten, da diese die obere Grenze darstellt.

$$v_2 = \frac{1}{\sum_i p_i^2}$$

In Populationen mit klonalen Strukturen sind Individuen aus generativer Reproduktion relativ unterrepräsentiert, da jeder Genotyp aus asexueller Reproduktion mindestens zweimal vorhanden sein muß. Je geringer die Diversität einer Population ist, um so stärker sind wenige Genotypen, möglicherweise auch aus asexueller Reproduktion, überrepräsentiert.

GREGORIUS (1974) definiert den **genetischen Abstand** d_0 zweier Populationen P(1) und P(2) als

$$d_0(P(1), P(2)) = \frac{1}{2} \cdot \sum_i |p_i(1) - p_i(2)|,$$

der als Differenzierung zwischen den beiden Populationen angesprochen wird. $p_i(1)$ und $p_i(2)$ bezeichnen darin die relativen Häufigkeiten des i -ten genetischen Typs in jeder der beiden Populationen. Der genetische Abstand d_0 nimmt seinen maximalen Wert von 1 an, wenn beide Populationen keinen gemeinsamen genetischen Typ besitzen. Allgemein mißt er den Anteil von Individuen, die sich in ihrem genetischen Typ unterscheiden.

Die **Populationsdifferenzierung** D_j betrachtet den genetischen Abstand zwischen der j -ten Population $p(j)$ und ihrem Komplement $\bar{p}(j)$ (GREGORIUS & ROBERDS 1986):

$$D_j = d_0(p(j), \bar{p}(j)) = \frac{1}{2} \cdot \sum_i |p_i(j) - \bar{p}_i(j)|$$

Die Berechnung kann sowohl für allelische als auch für genotypische Verteilungen erfolgen. D_j nimmt den minimalen Wert 0 an, wenn die beiden Kollektive die gleiche genetische Struktur besitzen. Der Maximalwert 1 wird erreicht, wenn beide Verteilungen vollständig verschieden sind, d. h. keine Genotypen gemeinsam haben. Im Fall nur zweier Verteilungen sind die Werte und der Populationsdifferenzierung D_j mit denen des genetischen Abstands d_0 identisch. Der Unterschied zwischen den genotypischen Strukturen liefert auch den relativen Anteil an Genotypen, welche man austauschen müßte, um die eine in die andere Struktur zu überführen. Je ähnlicher sich die beiden Strukturen sind, um so geringer ist der zugehörige Wert.

Die **mittlere genetische Differenzierung** δ (GREGORIUS & ROBERDS 1986) berechnet sich über die mit den einzelnen Populationsgrößen c_j gewichteten D_j und stellt die stärkste Verdichtung der Differenzierungswerte dar (HATTEMER et al. 1993):

$$\delta = \sum_j c_j \cdot D_j$$

Ein häufig verwendetes Maß der genetischen Differenzierung zwischen Populationen ist F_{ST} (WRIGHT 1978, Kapitel 3), das dem G_{ST} von NEI (1973) entspricht. F_{ST} nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Es wird 0, wenn alle Populationen aufgrund gleicher genetischer Häufigkeiten genetisch identisch sind, und 1, wenn alle Populationen aufgrund ihrer Fixierung auf unterschiedliche Genotypen genetisch differenziert sind. GREGORIUS (1987) weist darauf hin, daß WRIGHT die Schwächen dieses Maßes bereits erkannt hat. Dies betrifft insbesondere die Eigenschaft, Differenzierung zwischen Populationen zu unterstellen, von denen einige auf das gleiche Allel fixiert sind. Dieser Argumentation folgend, kann daher die Verwendung von F_{ST} zur Berechnung der Differenzierung nicht empfohlen werden.

Die **Gesamtdifferenzierung** δ_T (GREGORIUS 1987) mißt die Variation innerhalb von Kollektiven, indem sie den mittleren genetischen Abstand eines jeden Typs (Allel, Genotyp) zu allen anderen des gleichen Kollektivs angibt.

$$\delta_T = \frac{N}{N-1} \cdot \left(1 - \sum_i p_i^2 \right)$$

Hierin bezeichnen N die Populationsgröße und p_i die relative Häufigkeit des i -ten Typs in der Gesamtpopulation. So ist der Wert der allelischen Gesamtdifferenzierung von der Anzahl und Häufigkeitsverteilung der an einem Genlocus vorhandenen Allele abhängig. δ_T nimmt den Minimalwert 0 an, wenn in einem Kollektiv nur ein Allel vorhanden ist. Der Maximalwert 1 wird erreicht, wenn alle Genotypen eines Kollektivs vollständig verschieden voneinander sind.

Der **Heterozygotiegrad** H ist eine Eigenschaft des Multilocus-Genotyps von Individuen und mißt den Anteil untersuchter Genloci, der sich in heterozygotem Zustand befindet (BERGMANN & RUETZ 1991, HATTEMER et al. 1993). Der mittlere Heterozygotenanteil eines Kollektivs H_a ergibt sich nach Inventur von Multilocus-Genotypen an $m \geq 2$ Genloci aus:

$$H_a = \frac{1}{m} \sum_k \sum_i \sum_j P_{ij}^{(k)}$$

Die Aussagekraft dieser Größe für das gesamte Genom ist sehr davon abhängig, welche der untersuchten Genloci in die Betrachtungen einbezogen wurden und welche Profiltypen diese Genloci repräsentieren. In der vorliegenden Arbeit wird neben dem mittleren Heterozygotiegrad, einer relativen Größe, die absolute Zahl heterozygoter Genloci zur Differenzierung zwischen Individuen benutzt und deren Häufigkeitsverteilung in

der Population als Verteilung der individuellen Heterozygotie dargestellt werden, wie sie BERGMANN & RUETZ (1991) für Fichtenklone angeben.

2.2.7 Analyse des Genflußsystems

Das Genflußsystem umfaßt die Mechanismen des genetischen Systems, die am Transport genetischer Information beteiligt sind (STERN & TIGERSTEDT 1974). Als Antagonist der Isolation wirkt Genfluß zwischen Populationen deren Differenzierung durch Mutation, Selektion oder Drift entgegen, indem er eine eintretende Strukturierung wieder verwischt (HATTEMER et al. 1993). Der Anteil und die Reichweite des Genflusses bestimmt die reproduktionseffektive Populationsgröße sowie die Differenzierung zwischen Demen oder Populationen. Beide Größen haben einen direkten Bezug zur Dauerhaftigkeit der genetischen Variation und müssen wegen bestehender erheblicher Unterschiede ihrer genetischen Wirkung noch weiter nach Genfluß über Pollen oder Samen untergliedert werden.

Da der Genfluß maßgeblich die Populationsgröße von Arten bestimmt, muß in diesem Zusammenhang auf die mögliche Schwierigkeit, einzelne Populationen der Vogelkirsche gegeneinander abzugrenzen, hingewiesen werden. Genfluß kann immer nur näherungsweise für ein bestimmtes Kollektiv von Individuen, also eine konkrete Bezugsgröße, bestimmt werden. Dies stellt besondere Anforderungen an die Schärfe der Abgrenzung der Zygotenpopulationen, an deren Produktion das Kollektiv mit wenigstens einem gametischen Beitrag pro Zygote beteiligt gewesen ist (GREGORIUS pers. Mitt.).

Genflußuntersuchungen werden im Allgemeinen an Samen abgrenzbarer Kollektive und im Besonderen an Samen einzelner Bäume durchgeführt. Während vom Boden aufgeammeltes Saatgut nur in grenztem Maße (s. a. WANG 2001) die Zuordnung der genischen Beiträge zu deren weiblichen und männlichen Eltern ermöglicht, ist bei geerntetem Einzelbaumsaatgut der maternale Beitrag einfacher rekonstruierbar. Bei der Rotbuche, einer schwersamigen Baumart, konnte WANG (2001) für immerhin im Mittel 58% der unter einem Samenbaum aufgelesenen Bucheckern die direkte Abstammung durch Kompatibilität zum genischen Beitrag des Samenelterns nicht ablehnen. Auf allen diesen Untersuchungen lastet jedoch ein schwerwiegendes Problem, da außerhalb der Population existierende Zygoten unberücksichtigt bleiben, die aus effektivem Pollen der Population hervorgegangen sind (GREGORIUS pers. Mitt.). Die Größe dieses Anteils ist unbekannt und kaum faßbar. Die damit verbundene und zu gering eingeschätzte Bezugsgröße führt somit zu einer fehlerhaften Einschätzung des tatsächlichen Genflusses, wenn dieser erheblich von Null abweicht.

Beurteilt wird Genfluß am Transport genetischer Varianten, die von denen des betrachteten Individuums oder denen des betrachteten Rezeptorkollektivs verschieden sind. Jede Methode zur Beobachtung des genetischen Transportergebnisses ist also abhängig von ihrer Diskriminanzwahrscheinlichkeit, die die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der eine andersartige Variante unter den vorhandenen entdeckt wird. Besitzt eine Population bereits alle genetischen Varianten der Art, kann an diesen externer Genzufluß nicht beobachtet werden. Stellt ein Kollektiv die Ansammlung häufiger genetischer Varianten dar, ist die Wahrscheinlichkeit gering, durch seltene neue Varianten Genfluß zu

entdecken. Ist ein Kollektiv auf eine in der Art seltene genetische Variante fixiert, steigt die Wahrscheinlichkeit Genfluß aus umliegenden Kollektiven anderer genetischer Zusammensetzung zu erkennen. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Erzeuger der maternalen und paternalen Beiträge einer Zygote möglichst exakt zu bestimmen. Am einfachsten liegt der Fall bei direkt von der Pflanze geerntetem Saatgut. Bei bekanntem Eizellenbeitrag des Sameneiters zum Genotyp der Zygote wird nur noch nach dem zugehörigen Pollenelter gefahndet (Vaterschaftsanalyse). Unter Verwendung von Genmarkern, meist Enzymgenloci, werden vom Prinzip her zwei sehr ähnliche Verfahren angewendet.

2.2.7.1 Vaterschaftsanalyse nach dem Ausschlußprinzip

Nach der genotypischen Charakterisierung aller Sameneitern und deren Nachkommenschaften an einer begrenzten Anzahl polymorpher Genloci, meist Enzymgenloci, kann der Beitrag der Sameneitern einzellocusweise festgestellt werden (ELLSTRAND 1984). Der verbleibende Pollenbeitrag wird ebenfalls einzellocusweise mit den Genotypen aller potentiellen Polleneitern verglichen. Polleneitern, deren Allelbestand nicht mit dem festgestellten übereinstimmt, werden ausgeschlossen. Nach Betrachtung aller Genloci bleiben entweder im Idealfall ein einzelnes Individuum als tatsächlicher Pollenelter oder eine Gruppe von Individuen als potentielle Polleneitern übrig (ELLSTRAND 1984). Je geringer der Polymorphiegrad eines Genortes ist, umso schwieriger ist es, den Ausschluß einer großen Anzahl potentieller Polleneitern zu erreichen. Bei geringem Polymorphiegrad, z. B. nur zwei Allele am kontrollierenden Genlocus, muß sich die Methode des Vaterschaftsausschlusses im wesentlichen auf homozygote Genloci des Sameneiters stützen. Beurteilt wird dann jeder von diesem Allelbestand abweichende Beitrag als durch Pollen vermittelter Genfluß (ELLSTRAND 1984). Das Verfahren führt meist nicht direkt zur Identifikation des tatsächlichen Polleneiters, da meist mehrere potentielle Pollenspenden für ein in einer Population vorhandenes Allel existieren. Die simultane Betrachtung mehrerer Genloci auf der Basis des Multilocus-Genotyps ermöglicht eine weitere Eingrenzung des Kollektivs potentieller Polleneitern (ELLSTRAND 1984).

Genfluß wird auch anhand von in der Population seltenen Allelen (HAMRICK & SCHNABEL 1985, SLATKIN 1985) beurteilt. Da seltene Allele jedoch meist in einzelnen heterozygoten Genotypen vorliegen, bleibt der Genfluß des zweiten, meist häufigeren, Allels unentdeckt. Ist nur ein potentieller Pollenelter Träger des seltenen Allels, beträgt unter der Annahme des gleichen Befruchtungserfolgs beider Allele der bestimmbare Genfluß die Hälfte des tatsächlichen. Besitzt der Samenelter Allele, die auch bei anderen Individuen der Population vorhanden sind, läßt sich der tatsächliche Genfluß wegen der nicht zu unterscheidenden Selbst- und Fremdbefruchtung nicht quantifizieren. Dieser nicht entdeckbare, *kryptische* Genfluß führt zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Genflusses bei den Angiospermen (DEVLIN & ELLSTRAND 1990).

2.2.7.2 Vaterschaftsanalyse nach der Maximum-Likelihood-Methode

Neben den direkten Methoden zur Messung von Genfluß werden zunehmend Schätzverfahren etabliert, meist Maximum-Likelihood-Methoden (MEAGHER 1986, ADAMS & BIRKES 1991, ADAMS et al. 1992), wenn ein direkter genetischer Ausschluß einer Vielzahl von potentiellen Polleneitern nicht möglich ist. Mit der Maximum-

Likelihood-Methode versucht man sich der höchstmöglichen Wahrscheinlichkeit anzunähern, mit der ein durch Modellierung bestimmtes Ereignis unter allen durch das Modell erklärten Ereignissen eintritt. Grundlage für die Schätzung in der Vaterschaftsanalyse ist die Dreierbeziehung zwischen den Genotypen des Nachkommen A_iA_j , des Samenelterns A_iA_k und des Pollenelterns A_jA_l . Dabei müssen nach MEAGHER (1986) grundsätzlich zwei Fälle unterschieden werden: (a) der in Betracht kommende Polleneltern ist der tatsächliche und (b) der Polleneltern wurde zufällig ausgewählt. MEAGHER (1986) berechnet die Likelihood des Falls (a) nach der Formel

$$\begin{aligned} L(a) &= P(g_{ij}|g_{ik}, g_{jl})P(g_{ik})P(g_{jl}) \\ &= T(g_{ij}|g_{ik}, g_{jl})P(g_{ik})P(g_{jl}), \end{aligned}$$

wobei $P(g)$ allgemein die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Genotyp g in der Population vorhanden ist, und $T(g_{ij}|g_{ik}, g_{jl})$ die Wahrscheinlichkeit unter regelmäßiger Segregation und Zufallsfusion der Gameten repräsentiert. $P(g_{ij}|g_{ik}, g_{jl})$ ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein aus der Paarung des Samenelterns A_iA_k und des Pollenelterns A_jA_l entstandener Nachkomme A_iA_j in der Population vorhanden ist. $P(g)$ ist eine Funktion der genischen Struktur der Population, während $T(g_{ij}|g_{ik}, g_{jl})$ die Beziehung zwischen den Genotypen des Nachkommen, des Samen- und des Pollenelterns auf der Basis der zugehörigen Produktstruktur darstellt. Will man für einen bekannten Genotyp A_iA_j unter den Nachkommen mit bekanntem Sameneltern A_iA_k den unbekannten Polleneltern in der Population näherungsweise ermitteln, kann dies als Likelihood des Falls (b) nach folgender Formel von MEAGHER (1986) geschehen:

$$\begin{aligned} L(b) &= P(g_{ij}|g_{ik})P(g_{ik}) \\ &= T(g_{ij}|g_{ik})P(g_{ik}), \end{aligned}$$

wobei $T(g_{ij}|g_{ik})$ die Beziehung zwischen den Genotypen des Nachkommen und des Samenelterns sowie der genischen Struktur der potentiellen Polleneltern auf der Basis einer Produktstruktur repräsentiert. Um die Likelihood verschiedener möglicher Polleneltern mit dem tatsächlichen vergleichen zu können, bildet MEAGHER (1986) den Logarithmus des Likelihood-Quotienten (LOD):

$$LOD(a : b) = \log[T(g_{ij}|g_{ik}, g_{jl})/T(g_{ij}|g_{ik})].$$

MEAGHER (1986) sieht im Logarithmus den Vorteil, daß bei Unabhängigkeit der betrachteten Genloci eine Addition der einzelnen LOD zum Multilocus-Ansatz führt. Eher problematisch beurteilen ADAMS et al. (1992) die Vorgehensweise von MEAGHER (1986), da Polleneltern mit Genloci in homozygotem Zustand unter den infragekommenden Polleneltern überrepräsentiert sind und keine Vaterschaft konkret nachgewiesen werden kann. Daher suchen ADAMS et al. (1992) einen erweiterten methodischen Ansatz der Maximum-Likelihood-Schätzung, indem sie zusätzlich Faktoren, die den relativen Erfolg eines Pollenelterns beeinflussen, wie Fekundität und räumlicher Abstand zum Sameneltern, berücksichtigen. Verbesserungen im Ergebnis dieser Schätzungen gegenüber ausschließlich aus genetischen Daten erhobenen sind jedoch nur bei sehr guter Abstimmung

des verwendeten Modells an die tatsächlich vorliegenden Verhältnisse zu erwarten. Eine vollständige Aufklärung der potentiellen Vaterschaften wird auch mit diesem Ansatz nicht erreicht.

2.2.7.3 Vaterschaftsanalyse unter Bildung von Pollenelterfraktionen

Da sich die genaue Herkunft des Pollens, der von Polleneltern – soweit analysierbar – gleicher genetischer Identität stammt, nicht feststellen läßt, haben DEVLIN et al. (1988) die Maximum-Likelihood-Methode auf Fraktionen von an mehreren Enzymgenloci identischen Polleneltern angewendet. Sie berechnen die Wahrscheinlichkeit, mit der ein potentieller Pollenelter der tatsächliche Pollenspende eines Nachkommens ist, wenn außer seinem der sameneltherliche Genotyp bekannt ist. An die Stelle des Pollenelters treten bei den Schätzungen nunmehr Fraktionen von genetisch identischen Polleneltern mit ihren in der Population realisierten Häufigkeiten. DEVLIN et al. (1988) betrachten im Modellansatz sowohl unabhängige als auch gekoppelte Genloci. Im Vergleich zu den in 2.2.7.1 und 2.2.7.2 vorgestellten Methoden stellen sie einerseits eine deutliche Verbesserung der Ausschlußwahrscheinlichkeit fest und müssen andererseits zugeben, daß die konkreten Paarungsbeziehungen mit dieser Methode ebenfalls nicht rekonstruiert werden können.

In der vorgelegten Arbeit kam nur die Methode des direkten Vaterschaftsausschlusses zu Anwendung, da die Anzahl und die Genotypen potentieller Pollenelter unbekannt sind. Ein Hauptanliegen ist die Messung des effektiven Polleneintrags in das Kollektiv. Aufgrund der isolierten Lage des zu untersuchenden Vorkommens *Weende* konnte geringer Genfluß durch Pollenimporte und ein überwiegender Pollenflug innerhalb des Kollektivs erwartet werden.

Bei der Betrachtung von Genfluß wird gern zwischen Samen vor bzw. nach ihrer Verbreitung unterschieden, um auf die Verteilung der Transportweiten von Pollen bzw. Samen schließen zu können. Dabei wird jeder differenzierbare Pollen- bzw. Eizellenbeitrag, der sich aus dem ursprünglichen Kollektiv entfernt hat, als Genfluß gezählt. Auch bei dieser Betrachtungsweise bleibt die eingangs bereits erwähnte Abgrenzungsschwierigkeit einer Zygotenpopulation bestehen (GREGORIUS pers. Mitt.). Die vorgelegten Ergebnisse berücksichtigen den Anteil des durch Pollenexporte des Kollektivs effektiv gewordenen Genfluß nicht.

2.2.8 Analyse des Reproduktionsmodus bei der Vogelkirsche

Die Vogelkirsche besitzt generell die Fähigkeit, generativ und asexuell zu reproduzieren. Bei einigen vorangegangenen Betrachtungen war bereits die Frage der Abstammung wichtig. Die Vererbungsanalyse konnte für das Vorkommen *Weende* vorgenommen werden, weil 10 Vogelkirschen, die den gleichen Multilocus- und Inkompatibilitätsgenotyp besitzen, wegen ihres kleinräumigen Vorkommens mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit aus asexueller Reproduktion stammen.

Als aus Stockausschlag hervorgegangen beschreibt die Forsteinrichtung von 1991 die einzelstamm- und gruppenweise vorkommenden Vogelkirschen in der Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke. Dies ist ein Hinweis auf die Mittelwaldwirtschaft in dem untersuchten Mischbestand, die das Vermögen der Vogelkirsche zur Bildung von

Nachkommen aus sowohl asexueller als auch generativer Reproduktion begünstigt hat. Im Allgemeinen bleibt die Art der individuellen Entstehung jedoch unbekannt. Kann dennoch der Anteil von Individuen einer Population bestimmt werden, der aus Wurzelbrut stammt?

Im Folgenden soll die Vorgehensweise zur näherungsweisen Bestimmung des Anteils aus asexueller Reproduktion stammender Individuen beschrieben werden. Da es sich bei asexueller und generativer Reproduktion um zwei unterschiedliche Reproduktionsmodi handelt, können nur vererbte Eigenschaften zur Unterscheidung herangezogen werden. Nachkommen aus asexueller Reproduktion eines Ausgangsindividuum zeichnen sich durch vollständige genetische Identität aus. Die Frage nach der gemeinsamen vegetativen Abstammung kann daher nur im Vergleich wenigstens zweier Individuen einer Population geklärt werden. Nur bei vollständiger Übereinstimmung aller genetischen Merkmale kann für ein Kollektiv von Individuen die gemeinsame vegetative Abstammung überhaupt in Betracht gezogen werden.

Daraus ergeben sich zwei weitere Fragestellungen, die die Absicherung der Ergebnisse betreffen, in ihrer vollständigen Beantwortung aber teilweise offen bleiben werden.

(1) Mit welcher Wahrscheinlichkeit könnte bei Übereinstimmung einer begrenzten Anzahl genetischer Merkmalsausprägungen von Individuen durch die Beobachtung weiterer Merkmale deren Verschiedenheit entdeckt werden?

(2) Mit welcher Wahrscheinlichkeit könnten Individuen gleichen Multilocus-Genotyps auch durch sexuelle Reproduktion entstanden sein?

Aus Gründen der Vereinfachung soll im Folgenden zunächst angenommen werden, daß die Anzahl der betrachteten Enzymgenloci ausreicht hat, die tatsächlich realisierten Verhältnisse abzubilden. Ob sie diese wiedergeben können, wird an anderer Stelle diskutiert.

Zunächst wird versucht, die Problematik allgemein darzulegen, um darauf aufbauend mögliche Lösungswege aufzuzeigen. Bei der Beschreibung genetischer Strukturen in Waldbaumpopulationen, deren Entstehungsart weitestgehend unbekannt ist, stellt man häufig fest, daß innerhalb von Populationen meist keine vollständige genetische Differenzierung aller Individuen vorliegt. Das begründet sich einerseits durch die beschränkte Anzahl von untersuchten Genloci und andererseits durch eine an diesen in deutlich geringeren Umfang realisierte Vielfalt, als dies die potentielle genotypische Vielfalt erwarten ließe. GEHLE (1999) stellt hierzu fest, daß Eichenkollektive in ihrer Verteilung der realisierten Heterozygotiegrade zu der aus stochastisch unabhängiger Kombination von Homo- und Heterozygoten an mehreren Genloci im Mittel um 3% und maximal um 8% abweichen. In umfangreicheren Populationsstichproben befindet sich meist eine höhere Anzahl N von Individuen als von unterscheidbaren Multilocus-Genotypen G . Nach ELLSTRAND & ROOSE (1987) gibt der Quotient aus G/N den Anteil unterscheidbarer Genotypen an, der bei CHUNG et al. (2000) synonym zur Beschreibung der klonalen Anteile innerhalb und zwischen Populationen genutzt wird. Bei Arten, die sowohl generativ als auch asexuell reproduzieren, kann die Häufung bestimmter Multilocus-Genotypen durch Wurzelbrut interpretiert werden, insbesondere wenn diese kleinräumig auftreten (MENN

1999).

Um sexuelle von asexueller Reproduktion in genetisch charakterisierten Kollektiven zu unterscheiden, sollen die folgenden Annahmen gelten:

Annahme 1: Bäume mit einmaligem Multilocus-Genotyp sind das Ergebnis sexueller Reproduktion. (N_S) repräsentiert die Anzahl der Bäume, die generativ reproduziert sind.

Annahme 2: Bäume mit einem Multilocus-Genotyp, der mit einer absoluten Häufigkeit > 1 vorkommt, sind aus Wurzelbrut hervorgegangen. $N_C = N - N_S$ bezeichnet die Anzahl asexuell entstandener Bäume in einem Kollektiv mit N Individuen.

Von weiterem Interesse ist der Anteil der aus Wurzelbrut entstandenen unter allen Individuen der Population. Dieser beträgt N_C/N . Dieser Wert wird 1, wenn alle Individuen aus asexueller Reproduktion stammen, und 0 bei ausschließlich sexueller Reproduktion.

N_S repräsentiert gleichermaßen die Anzahl Individuen und die verschiedener Multilocus-Genotypen; es wird angenommen, daß sie aus generativer Reproduktion stammen ($G_S = N_S$). Daher ist $G_C = G - N_S$ die Anzahl asexuell reproduzierter Multilocus-Genotypen und G_C/G ist deren Anteil unter allen Multilocus-Genotypen G eines Kollektivs. Dieser Ausdruck wird 1 wie zuvor der Quotient N_C/N , wenn alle Multilocus-Genotypen aus Wurzelbrut stammen, und 0, wenn diese auf generativem Weg entstanden sind. Die Gesamtzahl im Kollektiv vorhandener Multilocus-Genotypen wird maßgeblich von der Anzahl G_C derer bestimmt, die sich in dem aus Wurzelbrut hervorgegangenen Anteil N_C/N befinden.

Die maximale Anzahl G_{max} von Multilocus-Genotypen in einem Kollektiv ist realisiert, wenn jeder Multilocus-Genotyp aus asexueller Reproduktion genau zweimal vorhanden ist ($G_C = N_C/2$). Die Gleichung

$$G_{max} = N_C/2 + N_S = (N + N_S)/2$$

führt nur für geradzahlige N_C bzw. Summen von $(N + N_S)$ zu einem ganzzahligen Ergebnis. Für ungerade Werte von N_C bzw. $(N + N_S)$ ist eine Verminderung des Werts um 1 notwendig, um die tatsächlich realisierbare Anzahl von Multilocus-Genotypen als ganzzahligen Ausdruck seiner oberen Grenze zu erhalten.

Die tatsächliche Gesamtanzahl von unterscheidbaren Multilocus-Genotypen G wiederum ist durch die Zusammensetzung der Individuen aus sexueller und asexueller Reproduktion in dem jeweiligen Kollektiv bestimmt. Der Unterschied von G_{max} und G läßt sich als Abweichung der Häufigkeiten einzelner Multilocus-Genotypen aus asexueller Reproduktion im Vergleich zur idealisierten Verteilung erklären. In der Gleichung

$$G = N_C/k + N_S$$

gibt k die mittlere Anzahl aus asexueller Reproduktion stammender kongleicher Individuen an, was sich nach Umformung der Gleichung in $k = N_C/G_C$ leichter erkennen läßt.

Da N_C nicht die Anzahl aus asexueller Reproduktion stammender Genotypen G_C und umgekehrt G_C nicht deren Häufigkeitsverteilung in dem Kollektiv berücksichtigt, bildet jeder der Quotienten N_C/N und G_C/G nur einen Teilaspekt der in einer Population vorhandenen asexuellen Reproduktion ab. Beide erscheinen aber deutlich besser als der Quotient G/N (ELLSTRAND & ROOSE 1987) geeignet, klonale Strukturen in Populationen zu beschreiben, was in 4.1.3 ausführlicher diskutiert wird.

Ausgangspunkt für die Frage nach dem Reproduktionsmodus war die Beobachtung, daß ein Kollektiv sowohl generativ als auch asexuell reproduziert und nicht vollständig differenziert ist. Als Maß der Differenzierung eines Kollektivs fungiert δ_T . Wie in 2.2.6 dargestellt, erreicht δ_T den Wert 0, wenn nur ein Typ im Kollektiv vorhanden ist, was seiner vollständig asexuellen Reproduktion entspricht. Den Maximalwert 1 nimmt δ_T an, wenn alle Typen eines Kollektivs vollständig verschieden voneinander sind, also generativ reproduziert worden sind. Da gemäß *Annahme 1* alle generativ reproduzierten Genotypen exakt einmal im Kollektiv vorhanden und somit untereinander vollständig differenziert sind, entscheiden ausschließlich der Anteil und die Häufigkeit, mit denen Multilocus-Genotypen aus Wurzelbrut in dem Kollektiv vorhanden sind, über die von 1 abweichende Gesamtdifferenzierung δ_T der Population. Ein Maß, das den Anteil der asexuellen Reproduktion eines Kollektivs beschreiben könnte, müßte bei vollständig vegetativer Reproduktion den Maximalwert von 1 und umgekehrt den Minimalwert von 0 annehmen, wenn nur sexuell reproduziert wurde. Dies würde $1 - \delta_T$ entsprechen, da asexuelle Reproduktion eines Kollektivs genau genommen die Fixierung auf wenige Typen und im Extremfall auf einen Typ darstellt. Zur Zeit existiert noch keine gesicherte Konzeption für das Erkennen asexueller Reproduktion aus genetischen Strukturen. Daher ist es fraglich, ob es ein Maß geben kann, das bei geringer Variation der benutzten genetischen Marker den Anteil der asexuellen Reproduktion eines Kollektivs mißt.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des Inkompatibilitätssystems

Die Analyse des gametophytischen Inkompatibilitätssystems bei der Vogelkirsche beginnt mit einigen grundsätzlichen Überlegungen, die eine Verbindung zwischen dem populationsgenetischen Modellansatz und den eigentlichen genetischen Untersuchungen verschiedener Vogelkirschenvorkommen herstellen sollen.

Ist die tatsächliche Anzahl von S -Allelen n_S einer Population unbekannt, kann man diese durch den folgenden mathematischen Ansatz eingrenzen. Dabei soll der Fall, daß eine Population aus genetisch identischen Individuen besteht und somit die geringstmögliche Anzahl von S -Allelen 2 beträgt, außer Betracht bleiben. Auch daß der Erhalt eines Kollektivs durch sexuelle Reproduktion mit im Minimum drei unterschiedlichen S -Allelen gewährleistet ist (WRIGHT 1939, WHITEHOUSE 1950), ist zunächst nicht Gegenstand dieser Betrachtung.

Die maximal mögliche Anzahl von S -Allelen $n_{S_{max}}$ ist gegeben, wenn in einer Population jedes S -Allel nur einmal vorhanden ist. Da der S -Genlocus immer mit zwei funktionsverschiedenen S -Allelen $S_i S_j$ und $i \neq j$ besetzt ist, bestimmt die absolute Populationsgröße N die maximale Anzahl von S -Allelen. Sie entspricht somit dem Zweifachen der Gesamtindividuenzahl ($n_{S_{max}} = 2N$), was BERGER (1963) bereits beschrieben hat. Das bedeutet, daß in kleinen Populationen bereits große Anzahlen von S -Allelen realisiert sein könnten. Weiterhin sind in dieser Modellpopulation alle Genotypen untereinander vollständig kompatibel, während sie nur mit sich selbst inkompatibel sind. Semikompatibilität zwischen den Individuen ist überhaupt nicht vorhanden. Die Modellpopulation, in der die maximale Anzahl von S -Allelen realisiert wäre, ist vollständig differenziert. Die gleiche Populationsdifferenzierung wäre jedoch mit deutlich weniger S -Allelen ebenfalls zu erreichen.

Im Folgenden wird die minimale Anzahl von S -Allelen $n_{S_{min}}$ in einer am S -Genlocus vollständig differenzierten Population aus ihrer absoluten Größe N geschätzt. Bei vollständiger Differenzierung der Population ist jeder S -Genotyp genau einmal vorhanden. $n_{S_{min}}$ wird durch die Anzahl der unterschiedlichen Kombinationen aller S_i und S_j mit $i \neq j$ bestimmt. Da am S -Genlocus nur Heterozygote produziert werden, entspricht die Anzahl unterschiedlicher S -Genotypen bei $n_{S_{min}}$ S -Allelen $\frac{(n_{S_{min}} - 1) \cdot n_{S_{min}}}{2}$. Für eine vollständig differenzierte Population der Größe N ergibt sich die minimale Anzahl $n_{S_{min}}$ aus der Gleichung:

$$\frac{(n_{S_{min}} - 2) \cdot (n_{S_{min}} - 1)}{2} < N \leq \frac{(n_{S_{min}} - 1) \cdot n_{S_{min}}}{2}$$

Der Ausdruck $\frac{(n_{S_{min}} - 2) \cdot (n_{S_{min}} - 1)}{2}$ entspricht hierbei der Anzahl unterschiedlicher S -Genotypen, wenn nur $(n_{S_{min}} - 1)$ S -Allele in einer Population vorhanden sind. Dieser Wert bildet die untere, aber nicht erreichbare, Grenze für die mögliche Anzahl unterschiedlicher S -Genotypen in einer Population der Größe N . Die Gleichung berücksichtigt den Umstand, daß die absolute Größe einer Population im Regelfall kleiner ist als die An-

zahl aller realisierbaren Allelkombinationen und nur in wenigen definierten Fällen Gleichheit mit dieser Anzahl erreicht.

Daß die Allele am gametophytisch exprimierten S -Genlocus eine Gleichverteilung anstreben, haben BOUCHER (1993) sowie STEINER & GREGORIUS (1994) für effektiv unendlich große Populationen nachgewiesen. Gleichverteilung der S -Allele bedeutet nicht unbedingt, daß auch die Genotypen gleich häufig sind (STEINER 1992). STEINER (1992) konnte jedoch zeigen, daß unter der Gleichverteilung der S -Allele die aus ihnen rekombinierten Genotypen ebenfalls einem Gleichgewichtszustand zustreben.

Ausgehend von dieser Gleichverteilung der Genotypen in einer idealisierten Population, bei der alle Allelkombinationen genau einmal realisiert sind und somit jeder Genotyp genau einmal vorhanden ist, sollen die Kompatibilitätsverhältnisse eines S -Genotyps zu allen in der Population vorhandenen analysiert werden. Diese sind in dem betrachteten Fall für alle Genotypen gleich. Danach setzt sich die Größe einer Population $N = \frac{(n_S - 1) \cdot n_S}{2}$, bezogen auf den betrachteten S -Genotyp, aus drei Kompatibilitätsklassen von Genotypen zusammen ($N = N_{IK} + N_{SK} + N_{VK}$). Da jeder S -Genotyp nur einmal vorhanden und mit sich selbst **inkompatibel** ist, beträgt dessen absolute Häufigkeit unabhängig von der Anzahl Genotypen N_{IK} immer 1.

Semikompatibilität eines S -Genotyps besteht zu allen anderen Genotypen, mit denen er ein S -Allel gemeinsam hat. Sind nur drei unterschiedliche S -Allele in der Population vorhanden, können folglich nur drei Inkompatibilitätsgenotypen gebildet werden, von denen jeder zwei der drei S -Allele besitzt und folglich zu den beiden anderen semikompatibel ist. Mit jedem weiteren S -Allel erhöht sich die Anzahl S -Genotypen N_{SK} , zu denen Semikompatibilität besteht, um 2. Bezogen auf die Anzahl vorhandener S -Allele n_S , ergibt sich die Anzahl S -Genotypen $N_{SK} = 2(n_S - 2)$ mit $n_S \geq 3$, die untereinander semikompatibel sind.

Paarungen eines S -Genotyps mit dem verbleibenden Rest $N_{VK} = N - N_{SK} - N_{IK}$ sind **vollständig kompatibel**, da in diesem keine gemeinsamen S -Allele vorhanden sind. Vollständige Kompatibilität tritt erst auf, wenn die Population vier verschiedene S -Allele besitzt. N_{VK} berechnet sich nach Einsetzen und Umformen wie folgt:

$$\begin{aligned} N_{VK} &= \frac{(n_S - 1) \cdot n_S}{2} - 2(n_S - 2) - 1 = \\ &= \frac{n_S^2 - 5n_S + 6}{2} = \\ &= \frac{(n_S - 2) \cdot (n_S - 3)}{2} \end{aligned}$$

und ist für alle $n_S \geq 3$ definiert.

Wie die Inkompatibilitätsgenotypen bei minimalen S -Allelbestand in vollständig differenzierten Populationen auf die drei Kompatibilitätsklassen (inkompatibel, semikompatibel und vollständig kompatibel) verteilen, zeigen die beiden folgenden Abbildungen. In der Abbildung 3-1a sind die absoluten Häufigkeiten der für $2 \leq n_S \leq 30$ aufgetragen, während in Abbildung 3-1b für den gleichen Wertebereich die relativen Häufigkeiten der S -Genotypen wiedergegeben ist.

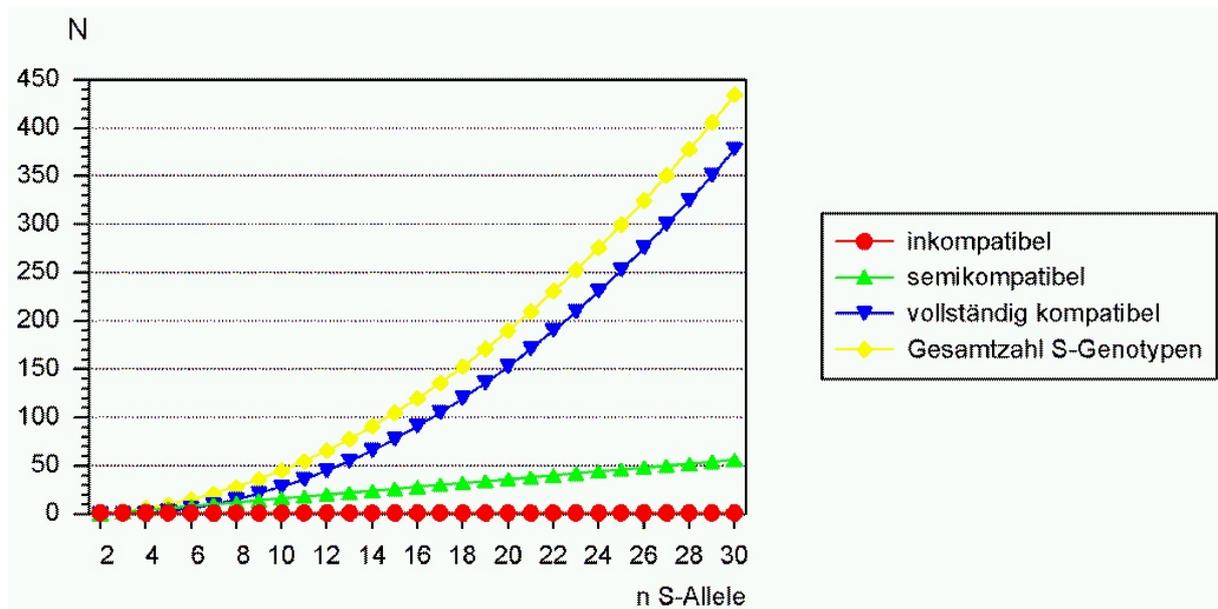


Abb. 3-1a: Absolute Häufigkeit der *S*-Genotypen in einer am *S*-Genlocus vollständig differenzierten Modellpopulation der Größe $N = \frac{(n_S - 1) \cdot n_S}{2}$ und deren Verteilung auf drei Kompatibilitätsklassen

Bei nur zwei *S*-Allelen existiert nur ein selbstinkompatibler *S*-Genotyp. Eine Population, die aus nur einem Inkompatibilitätsgenotyp besteht, kann nicht sexuell reproduzieren. Bei einem Minimum von drei *S*-Allelen müssen alle drei Genotypen realisiert werden, um ihr Überleben bei ausschließlich sexueller Reproduktion dauerhaft zu ermöglichen. Erst bei vier unterschiedlichen Inkompatibilitätsallelen existiert zu jedem *S*-Genotyp ein vollständig kompatibler.

Die Anzahl der nur zu sich selbst inkompatiblen Genotypen ist immer 1 und wird daher durch eine Gerade parallel zur X-Achse durch den Wert 1 abgebildet. Trägt man die Werte der semikompatiblen Genotypen auf, erhält man ebenfalls eine Gerade, die eine Steigung von 2 besitzt. Der Faktor 2 ist die Zahl der semikompatiblen Genotypen, die bei der Erhöhung des Allelbestands um 1 entstehen. Dagegen weist die Kurve der vollständig kompatiblen Genotypen eine stetig zunehmende Steigung auf. Die Zunahme ist gegenüber den beiden anderen Inkompatibilitätsklassen sogar überproportional, wie sich aus dem fast parallelen Kurvenverlauf zur Gesamtzahl der *S*-Genotypen in der Population ablesen läßt.

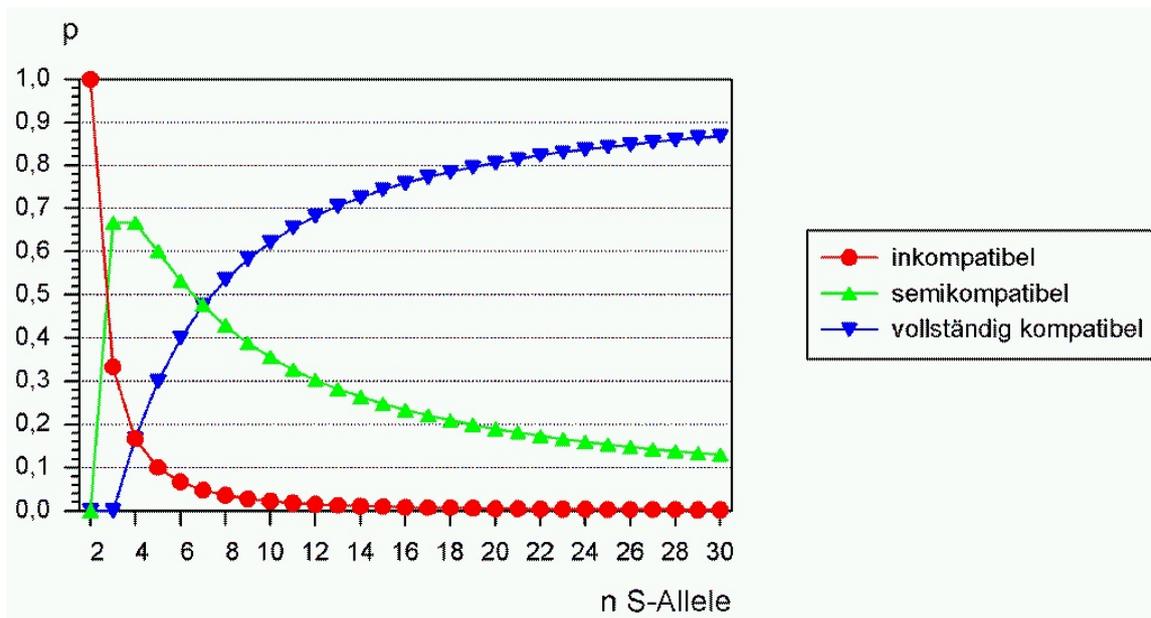


Abb. 3-1b: Relative Häufigkeit der *S*-Genotypen, bezogen auf drei Kompatibilitätsklassen, der am *S*-Genlocus vollständig differenzierten Modellpopulation

Der relative Anteil des ausschließlich selbstinkompatiblen *S*-Genotyps nimmt sehr rapide ab und strebt asymptotisch dem Wert 0 entgegen. Da bei nur zwei *S*-Allelen genau ein selbstinkompatibler *S*-Genotyp existiert, ist der Kurvenbeginn der relativen Anteile semi- und vollständig kompatibler *S*-Genotypen genau genommen erst für $n \geq 3$ definiert. Bei drei *S*-Allelen existieren neben dem selbstinkompatiblen zwei zu diesem semikompatible *S*-Genotypen, deren relativer Anteil zwei Drittel entspricht. Erst bei vier *S*-Allelen sind für jeden *S*-Genotyp in Beziehung zu allen die drei Kompatibilitätsklassen vorhanden. Davon besteht zu sich selbst Inkompatibilität und zu dem *S*-Genotyp, der keine *S*-Allele mit dem ersten gemeinsam hat, vollständige Kompatibilität. Zu den übrigen vier, deren relativer Anteil ebenfalls zwei Drittel ist, besteht Semikompatibilität.

Mit jedem weiteren *S*-Allel verringert sich der Anteil zu jedem *S*-Genotyp semikompatibler, während sich zugleich der Anteil zu jedem *S*-Genotyp vollständig kompatibler vergrößert. Bei weniger als sieben *S*-Allelen überwiegt noch der Anteil zu jedem *S*-Genotyp semikompatibler in der Population. Bei 30 *S*-Allelen zählen bereits weniger als 13% aller *S*-Genotypen zu dieser Klasse.

Mit wachsender Anzahl *S*-Allele steigt der Anteil zu jedem *S*-Genotyp kompatibler im Verhältnis zu den anderen überproportional an und bildet für $n_S \geq 8$ die dominierende Kompatibilitätsklasse. Für die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen zur Identifikation von Inkompatibilitätsgenotypen bedeutet dies, daß mit zunehmender Anzahl von *S*-Allelen die in einer Population inkompatiblen oder semikompatiblen Paarungspartner immer seltener werden, was für die Identifikation unbekannter *S*-Genotypen durch Bestäubungsversuche eine deutliche Erschwernis darstellt.

3.1.1 Künstliche Bestäubungen und freie Abblüte am blühphänologisch isolierten Einzelbaum

Sämtliche an der Vogelkirsche AS 1 durchgeführten Fremdbestäubungen erwiesen sich als kompatibel, auch wenn sich nur ein bestimmter Anteil der künstlich bestäubten Blüten zu einer Frucht weiterentwickelt hat (s. a. Tabelle 3-1). Die Selbstbestäubung blieb erwartungsgemäß ohne Befruchtungserfolg. Der für Bestäubungsversuche verwendete Einzelbaum AS 1 ist somit selbstinkompatibel. Obwohl sich die Vogelkirsche AS 1 durch eine sehr frühe Blüte auszeichnet, ist eine vollständig reproduktive Isolation des Baumes nicht gegeben, da sich ein Fruchtanhang aus freier Abblüte entwickeln konnte. In Tabelle 3-1 sind die Zahlen der künstlich bestäubten Blüten denen der tatsächlich gebildeten Früchte gegenübergestellt. Im unteren Teil der Tabelle sind zum Vergleich die Anzahlen beobachteter Blüten an drei markierten Zweigabschnitten und ihr späterer Fruchtanhang nach freier Abblüte aufgelistet. Der Quotient aus gebildeten Früchten und bestäubbaren Blüten (N_{fr}/N_{bl}) mißt den relativen Reproduktionserfolg.

Tab. 3-1: Relativer Reproduktionserfolg aus künstlicher Bestäubung und freier Abblüte an der Vogelkirsche AS 1

Pollenelter	Anzahl		
	Blüten N_{bl}	Früchte N_{fr}	N_{fr}/N_{bl}
BD 1	45	12	0,267
BD 2	61	16	0,262
BD 4	51	17	0,333
BD 5	47	10	0,213
BD 9	69	11	0,159
BD 10	36	7	0,194
BB 2	48	9	0,188
\sum Pollenelter	357	82	0,230
freie Abblüte			
AS1-1	102	21	0,206
AS1-2	157	13	0,083
AS1-3	163	14	0,084
\sum freie Abblüte	422	48	0,114

In Tabelle 3-1 werden zwei Kollektive, von denen eines aus künstlicher Bestäubung und ein anderes aus freier Abblüte stammen, hinsichtlich ihres Reproduktionserfolgs betrachtet. Innerhalb jeder Gruppe kann der minimale und maximale relative Reproduktionserfolg quantifiziert werden. Während im Minimum nur etwa 16% der Blüten durch Pollen von BD 9 erfolgreich befruchtet wurden, bilden maximal ein Drittel aller Blüten, die durch Pollen von BD 4 bestäubt wurden, eine Frucht aus. Im Mittel aller werden

23% realisiert. Mit nahezu 21% ist der Reproduktionserfolg am Zweigabschnitt AS1-1 im Vergleich dazu einerseits unbedeutend geringer. Andererseits stellt dieser das Maximum innerhalb des Kollektivs aus freien Abblüte dar. An den beiden anderen Zweigabschnitten wurde gleichermaßen nur etwa ein Zwölftel aller vorhandenen Blüten erfolgreich befruchtet. Die beiden Kollektive unterscheiden sich somit im relativen Reproduktionserfolg deutlich. Während bei der künstlichen Bestäubung die erfolgreich befruchteten Blüten im Mittel 23% betragen, wird im Kollektiv der freien Abblüte nur etwa die Hälfte, etwas über 11%, davon realisiert. Das ist umso bemerkenswerter, da die Blüten bei freier Abblüte über einen längeren Zeitraum bestäubt und durch die Bestäuber zum optimalen Zeitpunkt besucht werden können. Der reproduktive Erfolg spiegelt somit auch die Effizienz der Bestäuber wider.

3.1.2 Pollenschlauchwachstum

In Tabelle 3-2 sind die Ergebnisse der durchgeführten Bestäubungsversuche *in vitro* wiedergegeben.

1. **Inkompatibel** (i) gelten solche Paarungen, bei denen keiner der Pollenschläuche die Samenanlagen (= Eizellen) erreicht. Wenn dies der Fall war, wurde es in allen Wiederholungen gleichermaßen bestätigt.

2. Erreicht einer der Pollenschläuche die Samenanlage, ist die Paarung **kompatibel** (k). In Klammern ist vor dem Schrägstrich die Zahl der Griffel angegeben, bei denen die Samenanlagen erreicht wurden. Hinter dem Schrägstrich ist die Gesamtzahl untersuchter Griffel notiert.

3. Mit einem Fragezeichen sind diejenigen Paarungen versehen, bei denen die Vitalität des eingesetzten Pollens fragwürdig war. Die Null in der Klammer gibt an, daß kaum Pollen gekeimt sind.

Tab. 3-2: Ergebnisdiagramm der Kompatibilitätsprüfung *in vitro*

		P o l l e n s p e n d e r												
		BD 1	BD 2	BD 3	BD 4	BD 5	BD 7	BD 9	BD 10	BD 11	AS 1	BB 2		
Z a r b e i t e r d o n a t o r	BD 1	i									i			
	BD 2	i									k(1/6)			
	BD 3		k(1/6)	i										
	BD 4		i	i	i						i			
	BD 5				i						i			
	BD 7				i	i	i							
	BD 9			i				i			k(1/6)			
	BD 10	i						i	i		?(0/6)			
	BD 11							i	k(1/6)	i				
	AS 1											i	?(0/6)	
	BB 2											k(1/6)	i	
	EIS 1												k(6/6)	

Alle Selbstbestäubungen erwiesen sich erwartungsgemäß als inkompatibel. Von den 23 Fremdbestäubungen zeigte der überwiegende Anteil ebenfalls als inkompatibel. Für

diese wird definitionsgemäß die Identität ihrer Inkompatibilitätsgenotypen angenommen. Für sechs Kreuzungen konnte Kompatibilität nachgewiesen werden. In fünf Fällen erreichte in einem von sechs eingesetzten Griffeln wenigstens einer der Pollenschläuche die Samenanlage und nur in einem Fall, der Kreuzung EIS 1 \times BB 2, in allen sechs.

Die reziproke Kreuzung BB 2 \times EIS 1 erwies sich hingegen als inkompatibel. Bei zwei Kreuzungen AS 1 \times BB 2 und BD 10 \times AS 1 setzte die Keimung des Pollens auf der Narbe aus, obwohl dieser bereits in anderen seine ausreichende Vitalität unter Beweis gestellt hat. In beiden Fällen wäre eine Überprüfung erforderlich. Um die untersuchten Vogelkirschen in Gruppen gleicher Inkompatibilitätstypen einteilen zu können, müssen die Ergebnisse auf ihre vollständige Widerspruchsfreiheit hin überprüft werden. In der folgenden Tabelle 3-3 sind die sich widersprechenden Ergebnisse gegenübergestellt.

Tab. 3-3: Offensichtliche Widersprüche in den Ergebnissen der Bestäubungsversuche *in vitro*

1.	BD 1 = BD 2 = AS 1	\wedge	AS 1 \neq BD 2
2.	BD 2 = BD 4 = BD 3	\wedge	BD 2 \neq BD 3
3.	BD 9 = BD 10 = BD 11	\wedge	BD 10 \neq BD 11
4.	EIS 1 = AS 1 = BB 2	\wedge	AS 1 \neq BB 2
5.	EIS 1 = BB 2	\wedge	BB 2 \neq EIS 1

Der Widerspruch besteht im wesentlichen in der Tatsache, daß zwei Individuen zum einen den gleichen Inkompatibilitätstyp, d. h., inkompatibel sind, besitzen und zum anderen sich in ihrem *S*-Genotyp unterscheiden und somit kompatibel sein sollen. Das gilt für alle fünf in Tabelle 3-3 aufgelisteten Fälle. Wegen dieser Widersprüche ist es nicht möglich, zu klaren Aussagen hinsichtlich der vorliegenden Inkompatibilitätsverhältnisse zu gelangen.

Ein weiterer Mangel des Verfahrens ist die weitgehend deduktive Feststellbarkeit eines Inkompatibilitätstypen, da sich Semi- und vollständige Kompatibilität im Paarungsergebnis nicht unterscheiden lassen, sofern Pollen im Überfluß angeboten wird. Für ein Individuum mit unbekanntem *S*-Genotyp kann auf den Besitz eines bestimmten *S_i*-Allels nur geschlossen werden, wenn dieses in wenigstens zwei im Ergebnis kompatiblen Paarungen mit unterschiedlichem *S_iS_j* und *S_iS_k* mit $i \neq j \neq k$ nachgewiesen ist. Gleiches gilt für die Bestimmung des zweiten *S*-Allels. Nur vollständige Inkompatibilität mit einem Paarungspartner, dessen Inkompatibilitätstyp bekannt ist, führt folglich zu direkten Ergebnissen. Für die praktische Anwendung bedeutet dies, daß eine Vielzahl von blühfähigen Kirschen mit allen bekannten Inkompatibilitätstypen verfügbar sein müssen, um Vogelkirschen mit bislang nicht bekanntem *S*-Genotyp zu klassifizieren. Für die sechs bei der Kulturkirschen bekannten *S*-Allele wären potentiell

15 verschiedene Inkompatibilitätsgenotypen vorhanden. BOŠKOVIĆ (pers. Mitt.) beziffert die Zahl der bei Kultur- sowie Vogelkirsche bekannten *S*-Allele auf über 20. Bei 18 *S*-Allelen wären nach der Formel $\frac{(n_S - 1) \cdot n_S}{2}$ 153 verschiedene Kombinationen von Inkompatibilitätsgenotypen realisierbar. Ausgehend von den sechs ursprünglichen *S*-Allelen der Kulturkirsche stünde einer Verdreifachung des Allelbestands eine Verzehnfachung der realisierbaren Genotypen gegenüber. Neben dem wachsenden Flächenbedarf für Klonkopien neuer Inkompatibilitätsgenotypen steigt auch der Kreuzungsaufwand für Individuen mit unbekanntem *S*-Genotypen stetig an.

3.1.3 Nachweis von *S*-RNasen in ausgewählten Vogelkirschen

BOŠKOVIĆ & TOBUTT (1996,1998) sowie BOŠKOVIĆ et al. (1997a) konnten durch elektrophoretische Methoden den in Griffeln einer Vielzahl bekannter Kultivare von *Prunus avium* L. aktiven *S*-Locus identifizieren. Neben den sechs bisher aus den Kreuzungen an Kulturkirsche bekannten *S*-Allelen, deren bereits feststehende Numerierung übernommen wurde, konnten sie weitere nachweisen. Die Numerierung der sechs bekannten *S*-Allele folgt daher keiner für Zymogramme gebräuchlichen Systematik. Wurde ein weiteres *S*-Allel identifiziert, erhielt es unabhängig von seiner Lage im Zymogramm die nächste freie Nummer. Diese Vorgehensweise erschwert die Vergleichbarkeit von Ergebnissen in verschiedenen Arbeitsgruppen, wenn das zugehörige Referenzmaterial für die vorliegende Nomenklatur nicht allgemein verfügbar ist.

Für die Identifikation von *S*-Genotypen bei Kirsche wird zunächst ein Referenzextrakt, das die sechs bei der Kulturkirsche häufigen *S*-Allele (*S*₁₋₆) enthält, zusammengestellt, in jedem Trennungsgang appliziert und nach der Anfärbung zum direkten Vergleich zu dem untersuchten Probenmaterial verwendet. Treten *S*-Allele auf, die nach einer ersten Untersuchung nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wird deren ungefähre Lage im Zymogramm bestimmt und anschließend direkt mit weiteren bereits identifizierten *S*-Allelen, die diese Lage im Zymogramm haben könnten, verglichen.

Im Folgenden sind zwei Beispiele von IEF-Gelen mit korrespondierenden Schemazeichnungen wiedergegeben, in denen Griffelextrakte von Vogelkirschenklonen der Samenplantage *Neuhemsbach* elektrophoretisch aufgetrennt worden sind. In jedem Gel (Abbildungen 3-2a und 3-3a) sind 15 Proben getrennt worden. Jeweils sieben zu analysierende Proben wurden vor und hinter dem mittleren Zymogramm, das als Referenz die Allele *S*₁ bis *S*₆ enthält, aufgetragen. Die Proben sind in der korrespondierenden Schemazeichnung bezeichnet.



Abb. 3-2a: Zymogramme der *S*-RNasen der Klone 661 bis 1244 (Samenplantage *Neu-hemsbach*)

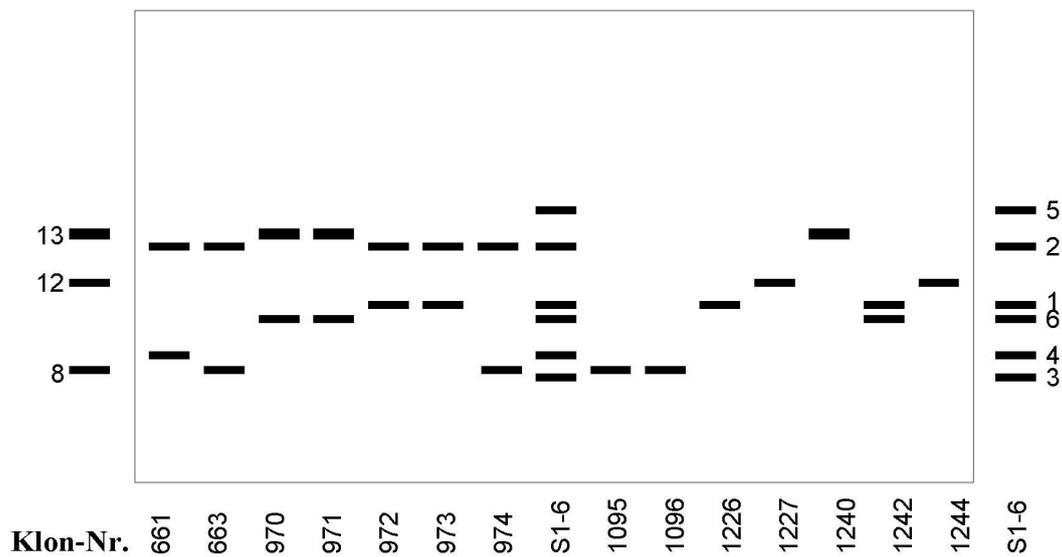


Abb. 3-2b: Schematische Wiedergabe der Zymogramme in Abb. 3-2a

Die Schemazeichnung gibt die festgestellte Lage der *S*-RNasen sowie die Klonbezeichnungen wieder. Außerhalb der Zeichnung rechts ist das Referenzmuster (S1-6) mit Bezeichnung der *S*-Allele wiederholt und links sind die in diesem Gel vorhandenen zusätzlichen *S*-Allele bezeichnet.

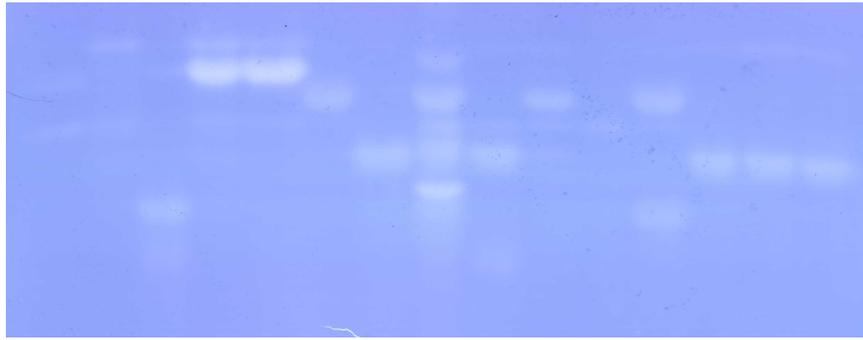


Abb. 3-3a: Zymogramme der *S*-RNasen der Klone 1437 bis 1288 (Samenplantage *Neuhemsbach*)

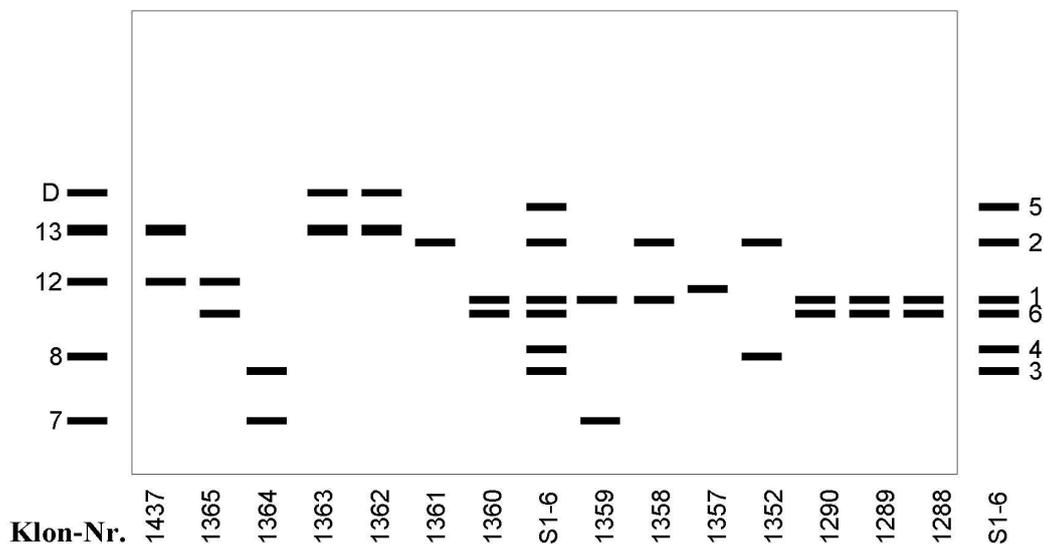


Abb. 3-3b: Schematische Wiedergabe der Zymogramme in Abb. 3-3a

Die Darstellungsweise in der Schemazeichnung entspricht der vorherigen.

Als Ergebnis der genetischen Identifikation von *S*-RNasen sind in der folgenden Tabelle 3-4 die absoluten Häufigkeiten der in der Samenplantage *Neuhemsbach* nachgewiesenen Inkompatibilitätstypen sowie deren *S*-Allele aufgelistet.

In der Samenplantage *Neuhemsbach* sind demnach 17 unterschiedliche Inkompatibilitätstypen, die insgesamt 12 *S*-Allele umfassen, vorhanden. 9 Genotypen konnten jeweils nur einmal nachgewiesen werden. Die übrigen 8 treten mit absoluten Häufigkeiten zwischen 2 und 10 auf. Mit 10 Klonen, etwa einem Viertel aller ($N=39$), ist S_2S_6 absolut gesehen der häufigste Inkompatibilitätstyp. S_1S_6 , ein Genotyp der ebenfalls das *S*-Allel S_6 enthält, ist immerhin noch mit 5 Klonen vertreten. Die restlichen 6 Genotypen verteilen sich gleichmäßig mit jeweils drei Typen auf die Häufigkeitsklassen 2 und 3.

S_6 und S_2 sind mit 18 bzw. 17 Klonen in der Samenplantage die häufigsten *S*-Allele. Die Kombination der beiden häufigsten *S*-Allele ist in der Klonsammlung durch 10 Klone repräsentiert. Die nächsthäufigeren *S*-Allele sind S_1 und S_0 (10 bzw. 9 Vertreter). Demgegenüber sind S_3 , S_4 und S_{15} jeweils nur einmal vorhanden; zwei weitere (S_7 und

S_D) jeweils zweimal. Die übrigen drei S -Allele teilen sich in zwei weitere Klassen auf, wobei S_8 fünfmal sowie S_{12} und S_{13} je sechsmal auftreten.

Tab. 3-4: Absolute genotypische und allelische Häufigkeiten des Inkompatibilitätsgenlocus in der Samenplantage *Neuhemsbach*

S -Genotyp	Samenplantage <i>Neuhemsbach</i>	S -Allel	Samenplantage <i>Neuhemsbach</i>
S_1S_0	1	S_1	10
S_1S_2	3	S_2	17
S_1S_6	5	S_3	1
S_1S_7	1	S_4	1
S_2S_0	1	S_6	18
S_2S_4	1	S_7	2
S_2S_6	10	S_8	5
S_2S_8	3	S_{12}	6
S_3S_7	1	S_{13}	6
S_6S_{12}	1	S_{15}	1
S_6S_{13}	2	S_0	9
S_8S_0	2	S_D	2
$S_{12}S_0$	3		
$S_{12}S_{13}$	1		
$S_{13}S_0$	1		
$S_{13}S_D$	2		
$S_{15}S_0$	1		

Da es sich bei der Samenplantage um ein auf vegetativem Weg künstlich erzeugtes Kollektiv handelt, war nicht zu erwarten, daß die Häufigkeiten sowohl der S -Genotypen als auch der S -Allele einer Gleichverteilung entsprechen, wie sie STEINER (1992) für eine Population im Gleichgewicht nachweist. Die Plantage stellt auch keine zufällige oder anteilsgleiche Auswahl von Vogelkirschen verschiedener Ausgangsbestände dar. Auffällig ist die überproportionale Häufigkeit der beiden Inkompatibilitätstypen S_2S_6 und S_1S_6 in der Samenplantage *Neuhemsbach*, während andere, die die in der Kulturkirsche häufigen Allele S_3 und S_4 tragen, wie z. B. S_3S_7 oder S_2S_4 jeweils nur einmal vorhanden sind.

Aufgrund gleichmäßiger Abstände zwischen den Pflanzreihen hat jede Vogelkirsche im Idealfall acht Parzellennachbarn, von denen sich jeweils vier an den Seiten und an den Ecken der Parzelle befinden, wie in Abbildung 3-4 dargestellt. Am Rand der Pflanzung liegen jedoch davon abweichende Verhältnisse vor. Betrachtet man die paarweisen Beziehungen eines Baums zu seinen Parzellennachbarn, ergeben sich drei mögliche Klassen der Kompatibilität.

1. **Inkompatibel** sind Paarungen, bei denen eine vollständige Übereinstimmung des Inkompatibilitätsgenotyps vorliegt ($S_iS_j \times S_iS_j$ und $i \neq j$). Die Schwärzung der

gemeinsamen Seiten kennzeichnet die inkompatiblen Nachbarn in der Abbildung 3-4.

2. Haben die benachbarten Paarungspartner das S_i -Allel gemeinsam ($S_i S_j \times S_i S_k$ und $i \neq j \neq k$), können bei der Paarung nur die Hälfte ihrer Gameten erfolgreich werden, d. h. sie sind **semikompatibel**. Die partielle Durchlässigkeit für kompatiblen Pollen wird in Abbildung 3-4 durch eine graue Einfärbung der Flächen zwischen den benachbarten Kirschen hervorgehoben.

3. Vollständig **kompatibel** werden Paarungen bezeichnet, in denen sich zwei Inkompatibilitätstypen vollständig voneinander unterscheiden ($S_i S_j \times S_k S_l$ und $\{i, j\} \neq \{k, l\}$). Der vollständige Wegfall von Paarungsbarrieren wird durch den Verzicht auf die Einfärbung der angrenzenden Seiten symbolisiert.

Die Samenplantage **Neuhemsbach** besteht im wesentlichen aus der vierfach wiederholten Ausspflanzung von 39 Vogelkirschenklonen.

Um ein Bild über mögliche Auswirkungen auf das Paarungsverhalten benachbarter Vogelkirschen in der Plantage zu erhalten, sind in der Abbildung 3-4 auszugsweise die Kompatibilitätsverhältnisse zu den jeweiligen Nachbarindividuen dargestellt:

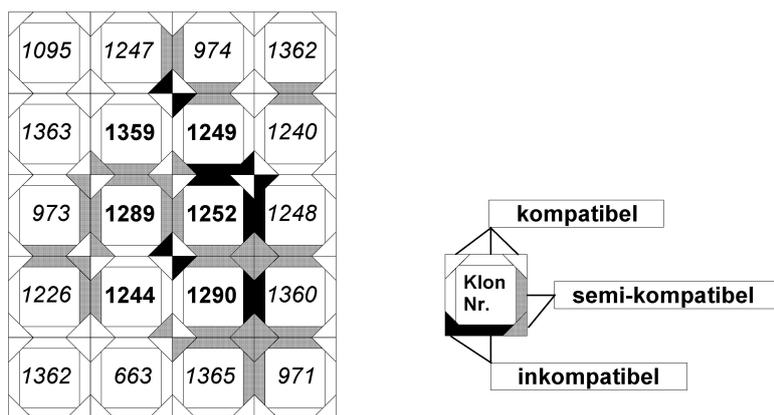


Abb. 3-4: Kompatibilitätsverhältnisse benachbarter Vogelkirschen in einem repräsentativen 4×5 Parzellenausschnitt der Samenplantage **Neuhemsbach**

In der Abbildung 3-4 sind für 6 Parzellen, deren Nummern durch Fettdruck hervorgehoben sind, Paarungsbeziehungen zu allen acht Parzellennachbarn dargestellt. Die übrigen mit kursiv gedruckten Nummern stellen eine Umrandung dar. Berücksichtigt man, daß etwa ein Viertel aller Klone den gleichen Inkompatibilitätstyp hat und somit untereinander inkompatibel ist, nehmen die Flächen mit schwarzer Farbe einen relativ geringen Anteil ein. Dieser Anteil ist sehr ungleichmäßig über die Plantage verteilt und klumpt an nur drei Stellen. Der Fall, daß ein Individuum von seinen Nachbarn reproduktiv vollständig isoliert ist, kommt in der Anpflanzung praktisch nicht vor. Der überwiegende Teil aller Paarungsbeziehungen ist semikompatibel, was sich an dem Anteil grauer Grenzlinien ablesen läßt.

Vogelkirschen der beiden Vorkommen **Weende** und **Geismar**, die auch in den Kreuzungsversuchen verwendet wurden, sind ebenfalls unter Verwendung der isoelektrischen Fokussierung hinsichtlich ihrer Inkompatibilitätstypen charakterisiert wor-

den. Insgesamt sind in beiden Vorkommen nur fünf *S*-Genotypen vorhanden, die insgesamt wiederum sieben verschiedene *S*-Allele repräsentieren.

Von den fünf *S*-Genotypen befinden sich zwei im Vorkommen **Weende**. Die Vogelkirschen BD 1 bis BD 10 sind nicht nur an den betrachteten Enzymgenloci genetisch identisch, sondern besitzen alle auch einheitlich den Genotyp S_2S_{4-} , in welchem das Allel S_{4-} eine durch Röntgenbestrahlung mutierte, hinsichtlich der Spezifikation seiner Inkompatibilität inaktivierte Form von S_4 darstellt (LEWIS & CROWE 1954). Mit S_1S_{12} erweist sich BD 11 zu diesen als vollständig kompatibel.

Die drei übrigen *S*-Genotypen sind im Vorkommen **Geismar** unter vier Kirschen nachgewiesen worden. Für die Vogelkirsche AS 1, die sowohl in den Kreuzungsversuchen als auch in den Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum eine zentrale Rolle einnimmt, wird der Inkompatibilitätsgenotyp S_4S_{12} notiert. Demnach ist AS 1 mit dem eingesetzten Pollenkollektiv von BD 1 bis BD 10 (S_2 und S_{4-}) einseitig vollständig **kompatibel**, da Pollen mit dem Allel S_{4-} Griffel mit dem nicht-mutierten Allel S_4 durchwachsen können. Aus der Paarung von S_{4-} und S_4 entstehen Homozygote, die durch eine verstärkte Einzelbande im Zymogramm abgebildet werden. Die Selbstfertilität vieler in Prüfung befindlicher Kultursorten gründet sich auf das Allel S_{4-} (SCHMIDT et al. 1999b).

BB 1 und BB 2, zwei spätblühende und rotfrüchtige Vogelkirschen, besitzen den gleichen *S*-Genotyp S_1S_6 , während EIS 1, ein frühblühender, schwarzfrüchtiger Einzelbaum, sich als Träger von S_4S_0 darstellt.

3.1.4 Vergleich der drei vorgestellten Verfahren und ihrer Ergebnisse

Zur Analyse des Inkompatibilitätssystems der Vogelkirsche wurden drei unterschiedliche Vorgehensweisen vorgestellt. Zwei davon basieren auf Kreuzungs- bzw. Bestäubungsversuchen und ermöglichen nur einen indirekten Zugang zum Inkompatibilitätsgenotyp, während die dritte die direkte Beobachtbarkeit dieses Genotyps nutzt.

Die Kreuzungs- bzw. Bestäubungsversuche sowohl im Freiland als auch *in vitro* können im Ergebnis nur zwischen inkompatibel und kompatibel unterscheiden. Im Fall einer Inkompatibilitätsreaktion sind die *S*-Genotypen der Paarungspartner identisch. Bei kompatiblen Paarungen kann entweder Semi- oder vollständige Kompatibilität vorliegen. Geht man davon aus, daß mittlerweile 20 *S*-Allele der Kirsche bekannt sind (BOŠKOVIĆ pers. Mitt.), lassen sich aus diesen $\frac{(n-1) \cdot n}{2}$ unterschiedliche *S*-Genotypen, i. e. 190 bei $n = 20$, bilden, von denen zu jedem *S*-Genotyp, der zu sich selbst inkompatibel ist, genau 36 *S*-Genotypen semikompatibel sind und 153 *S*-Genotypen vollständige Kompatibilität aufweisen (s. a. Abb. 3-1a).

Auf der Basis von Bestäubungen mit einer Vielzahl von bekannten Inkompatibilitätsgenotypen läßt sich ein unbekannter Inkompatibilitätstyp zuordnen, wenn seine *S*-Allele in dem Kollektiv bekannter *S*-Genotypen bereits enthalten sind. Dies ist in jedem Fall mit einem erheblichen zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden. Die Freilandkreuzungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ergaben bei etwa 50 künstlich bestäubten Narben einen Befruchtungserfolg von durchschnittlich etwa 20%. Übertragen auf die Bestäubungen *in vitro* bedeutet dies, daß in einem von fünf

Griffeln der Pollenschlauch zu einer erfolgreichen Befruchtung der Samenanlagen wachsen müßte, um als Indikator einer kompatiblen Paarung zu dienen. In beiden Verfahren sind das Zusammenspiel von vitalem Pollen und optimalem Bestäubungszeitpunkt von elementarer Bedeutung.

Die Bestäubungen *in vitro* kommen gegenüber den Freilandversuchen in der Regel mit weniger Blütenmaterial aus und sind weitaus weniger zeitaufwendig. Führen diese zu den gleichen Ergebnissen wie unter Freilandbedingungen, ist ihnen eindeutig ein Vorrang einzuräumen. Die vorliegenden Ergebnisse zu den Bestäubungsversuchen *in vitro* sind jedoch wenig ermutigend. Denn in ganz offensichtlichen Zweifelsfällen und bei Vorliegen widersprüchlicher Ergebnisse können bis zur endgültigen Klärung keine verbindlichen Aussagen zum Inkompatibilitätsgenotyp getroffen werden. Da sich die Kreuzungen nur während einer relativ kurzen Blühperiode durchführen lassen, entsteht ein enormer zeitlicher Verzug, wenn sich eine Vielzahl von Genotypen über mehrere Vegetationsperioden nicht eindeutig zuordnen lassen.

Im Unterschied zu den Kreuzungsversuchen, die der Identifikation des gametophytisch exprimierten *S*-Genlocus und seiner allelischen Varianten dienen, wird in der Obstzüchtung Bestäubungsversuche in Form klassischer Rückkreuzungen durchgeführt, um die Inkompatibilitätsgenotypen in erzeugten Kreuzungsnachkommenschaften bei bekannten elterlichen *S*-Genotypen zu identifizieren (SCHMIDT pers. Mitt.). Da die Inkompatibilitätsgenotypen der verwendeten Kreuzungseltern bekannt sind, beträgt der Bestand an unterschiedlichen *S*-Allelen bei kompatiblen Kreuzungseltern maximal vier. Jeder Nachkomme einer vollständig kompatiblen Kreuzung weist Semikompatibilität zu jedem der beiden Eltern auf.

Will man den *S*-Genotyp eines jeden Nachkommen aus einer vollständig kompatiblen Kreuzung, in der die elterlichen *S*-Genotypen (z. B. $(S_1S_2 \times S_3S_4)$) bekannt sind, identifizieren, bieten sich Bestäubungsversuche mit zwei Vorgehensweisen hinsichtlich der verwendeten *S*-Genotypen an:

Zum einen könnten dazu die vier *S*-Genotypen (im Beispiel: $S_1S_3, S_1S_4, S_2S_3, S_2S_4$), die unter den Nachkommen vorhanden sein sollten, verwendet werden.

Zum anderen könnten hierbei vier *S*-Genotypen (z. B. $S_1S_X, S_2S_X, S_3S_X, S_4S_X$ und $X \geq 5$) an, die jedes der vier elterlichen *S*-Allele exakt einmal enthalten, Verwendung finden.

In beiden Fällen sind Bestäubungen mit wenigstens drei der vier *S*-Genotypen notwendig, um den zuvor unbekanntem *S*-Genotypen eines Kreuzungsnachkommen festzustellen. Zur Kontrolle wäre die Bestäubung mit dem vierten *S*-Genotyp unter praktischen Gesichtspunkten durchaus empfehlenswert.

Die Nachkommenschaft eines semikompatiblen Elternpaares (z. B. $(S_1S_2 \times S_2S_3)$) spaltet in zwei *S*-Genotypen (hier: S_1S_3, S_2S_3), die untereinander und mit ihrem Sameneltern Semikompatibilität aufweisen. Einer der beiden *S*-Genotypen stimmt mit dem des Polleneltern überein und ist folglich zu diesem inkompatibel, während der andere zu diesem semikompatibel ist. In diesem Fall ließe sich die Nachkommenschaft mit geringstem Aufwand durch die Bestäubung mit dem *S*-Genotyp des Polleneltern (hier: S_2S_3) hin-

sichtlich ihrer *S*-Genotypen separieren. Der Gesamtaufwand für diesen Anwendungsbereich ist gegenüber der dargestellten Zuordnung eines Individuums mit unbekanntem *S*-Genotyp vergleichsweise gering.

Eine wesentliche Neuerung und arbeitstechnische Erleichterung stellt der direkte Nachweis des Inkompatibilitätsgenotyps durch Isoenzyme, den in Griffeln aktiven *S*-RNasen, dar. Diese Untersuchungen sind also auch an das blühfähige Alter einer Kirsche gebunden. Nachdem eine Vererbungsanalyse der beobachteten genetischen Merkmale vorliegt, kann anschließend jedes Individuum entsprechend seiner genetischen Information charakterisiert werden.

Bei der hohen Anzahl von Allelen ist es jedoch auch hier schwierig, im Vergleich zu den Isoenzymmustern bekannter Inkompatibilitätsgenotypen eine korrekte Zuordnung vorzunehmen. Dies geschieht unter kontrollierten Laborbedingungen und ist somit ganzjährig möglich, wenn man sich das entsprechende Untersuchungsmaterial im Frühjahr gesichert hat. Da sich die vorgestellten Ergebnisse vollständig mit denen aus langjährigen Kreuzungsversuchen decken, ist nur eine gelegentliche Überprüfung anhand von wenigen Testkreuzungen beim Auftreten neuer *S*-Allele notwendig.

Das vorgestellte laboranalytische Verfahren ist jedoch noch nicht überall implementiert, so daß es in Einzelfällen sinnvoll sein kann, mit Bestäubungsversuchen zu beginnen und erst in einem zweiten Schritt den Nachweis von *S*-RNasen vorzunehmen. Für die Bestäubungsversuche sollte eine Vielzahl bekannter Inkompatibilitätsgenotypen jederzeit verfügbar sein, z. B. in Form einer Klonsammlung. Entsprechendes gilt auch für die Referenzproben der *S*-RNasen, welche als Rohextrakt bei Tiefkühltemperaturen lange lagerfähig sind.

3.2 Analyse des Vererbungsmodus

3.2.1 Erläuterung der Zymogramme anderer Isoenzyme

Die biochemisch-genetischen Untersuchungen von KAURISCH et al. (1988, 1991) und GRANGER et al. (1993) dienen ausschließlich zur Sortenidentifikation. Die genetische Analyse von 8 verschiedenen Kreuzungsnachkommenschaften SANTI et al. (1990) erlaubten Hypothesen zum Vererbungsmodus von 7 Enzymgenloci bei der Vogelkirsche; für eine Kopplungsanalyse war die ihnen vorliegende Datenbasis jedoch zu gering. Kreuzungen zwischen 5 verschiedenen Kultursorten von *P. avium* L. bildeten die Grundlage für die Vererbungsanalyse, die GRANGER (1996b) am Sämlingsstadium der entstandenen Nachkommen und ihren Kreuzungseltern durchgeführt hat.

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit aufgetretenen Isoenzymmuster sind in der nachfolgenden Abbildung 3-5 schematisch wiedergegeben. Deren genetische Interpretation wurde durch DIPLOGEN (GILLET 1998) qualifiziert (s. a. 2.2.3, S. 24).

An dieser Stelle erscheint es für das weitere Verständnis sinnvoll, einige grundlegende Prinzipien der systematischen Interpretation der Isoenzymmuster, wie sie DIPLOGEN anwendet, noch einmal zu rekapitulieren.

Jedes Isoenzymmuster, soweit es aus einer oder mehreren Banden besteht, wird in verschiedene Elementarzonon aufgelöst, wobei über alle Muster hinweg für jedes in seiner

Lage unterschiedliche Band eine eigene Elementarzone ausgewiesen wird.

In einem ersten Schritt analysiert DIPLOGEN, ob die Elementarzonen fixiert bzw. nicht fixiert sind. Fixierte, in allen Mustern vorhandenen Banden werden als genetisch fixierte Zone bzw. Genlocus interpretiert.

Liegt keine Fixierung vor, wird in einem nächsten Schritt die Abhängigkeiten von Elementarzonen zueinander geprüft. Abhängigkeit liegt vor, wenn wenigstens zwei Elementarzonen zugleich ein bzw. kein Band aufweisen. In monomeren Enzymsystemen, bei denen ein Allel genau einem komplementären Enzymmolekül entspricht, wird diese Assoziation als strenge Kopplung zweier Genloci interpretiert. Setzen sich wie in polymeren Enzymsystemen die Allele aus mehrere Moleküleinheiten zusammen, kann zunächst nicht entschieden werden, welches das Hauptband und welches die Nebenzonen, die als Intralocus- oder Interlocus-Hybridenzyme interpretiert werden können, sind. Eine endgültige Aussage zur Vererbung kann erst nach dem letzten Programmschritt, der hypothesengestützten Vererbungsanalyse, erfolgen, was gilt auch für die nachweislich unabhängigen, nicht fixierten Elementarzonen gilt.

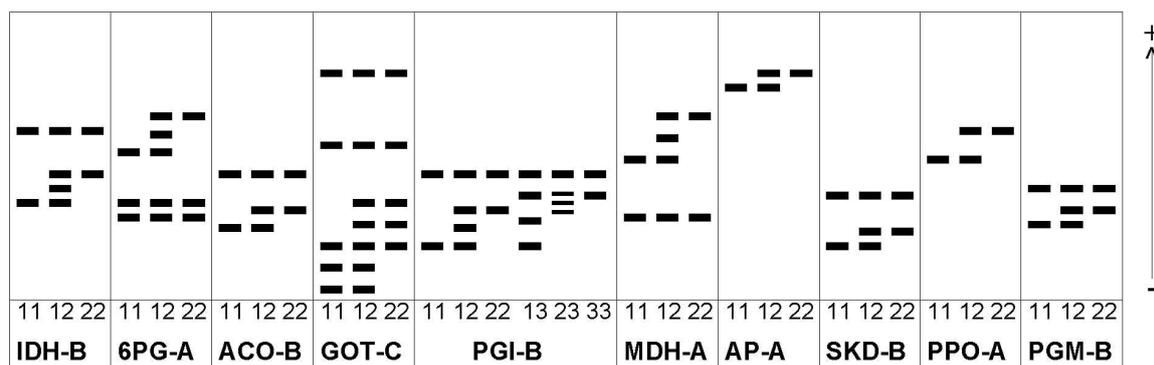


Abb. 3-5: Übersicht der Schemazeichnungen der interpretierten Enzymsysteme

Mit Ausnahme der Enzymsysteme AP und PPO sind in allen Zymogrammen neben dem variablen Enzymgenlocus auch eine oder mehrere nicht variable Zonen dargestellt, die nur für die Bezeichnung der Zonen innerhalb des Zymogramms eine Rolle spielen.

IDH: Während die obere A-Zone des dimeren Enzymsystems IDH nicht variiert, finden sich in in der B-Zone zwei Allele, die die drei dargestellten Genotypen B_1B_1 , B_1B_2 und B_2B_2 kodieren.

6PGDH: Das ebenfalls dimere Enzymsystem 6PGDH weist auch zwei Zonen auf, von denen nur die A-Zone mit ebenfalls zwei Allelen variabel ist. In dem untersuchten Klonmaterial lassen sich die drei Genotypen A_1A_1 , A_1A_2 und A_2A_2 nachweisen. Die näher zur Kathode gelegenen Zonen variieren nicht.

ACO: Das monomere Enzymsystem ACO besitzt in der B-Zone zwei Allele, die, wie bei IDH-B dargestellt, drei Genotypen B_1B_1 , B_1B_2 und B_2B_2 erzeugen. Die A-Zone ist invariabel.

GOT: Die C-Zone des dimeren Enzymsystems GOT weist Drei- und Fünffachbanden auf, die nicht den klassischen Muster homo- bzw. heterozygoter Individuen eines dimeren

Enzymsystems entsprechen. Es handelt sich hier vielmehr um zwei streng gekoppelte Genloci mit Interlocushybridbanden, die sich wie ein Genlocus darstellen. Die Dreifachbanden unterschiedlicher Lage entsprechen daher einem doppelt-homozygoten Genotypen und das Fünferbandmuster dem doppelt-heterozygoten Genotyp. A- und B-Zone weisen keine Variation auf.

PGI: Die A-Zone des dimeren Enzymsystems PGI ist ohne Variation. Dagegen lassen sich drei unterschiedliche Allele in der B-Zone nachweisen, die sechs verschiedene Genotypen B_1B_1 , B_1B_2 , B_2B_2 , B_1B_3 , B_2B_3 und B_3B_3 kodieren. Der Genotyp B_1B_1 ist bei der Vogelkirsche als sehr selten einzustufen.

MDH: Beim dimeren Enzymsystem MDH weist die A-Zone Variation auf. Es existieren drei Genotypen A_1A_1 , A_1A_2 und A_2A_2 . Die B-Zone ist invariabel.

AP: Beim monomeren Enzymsystem AP variiert die A-Zone mit zwei Allelen, die überwiegend die zwei Genotypen A_1A_1 und A_1A_2 ausgeprägt. Der Genotyp A_2A_2 ist äußerst selten und wurde bisher nur ein einziges Mal nachgewiesen.

SKDH: Die nachgewiesene Variation des monomeren Enzymsystems SKDH beschränkt sich auf die B-Zone mit drei Genotypen B_1B_1 , B_1B_2 und B_2B_2 . Die A-Zone ist monomorph.

PPO: Das Enzymsystem PPO ist ebenfalls monomer. In der A-Zone existieren drei Genotypen, von denen der Genotyp A_1A_1 bisher nur in einem Vorkommen bestätigt werden konnte. Auf die Darstellung von wenigstens zwei weiteren invariablen Zonen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

PGM: Die A-Zone des monomeren Enzymsystems PGM variiert nicht. Drei Genotypen B_1B_1 , B_1B_2 und B_2B_2 wurden in der B-Zone nachgewiesen.

3.2.2 Kopplungsanalyse

3.2.2.1 Vorbemerkungen

Die Verteilung einer Vielzahl von Genloci auf die limitierte Anzahl von Chromosomen eines Individuums führt zu dem Umstand, daß nicht alle Gene frei rekombiniert werden. Davon sind möglicherweise auch die in der vorgelegten Arbeit betrachteten polymorphen Genloci der Vogelkirsche betroffen. Die ideale Ausgangslage für Kopplungsanalysen bilden Kreuzungen von Einzelindividuen, die sich durch einen hohen individuellen Heterozygotiegrad hinsichtlich der zu betrachtenden Genloci auszeichnen. Für die präzise Rekonstruktion der Rekombinationsverhältnisse werden Zwei-Locus-Genotypen der Kreuzungsnachkommen benötigt, um die tatsächlich realisierten Paarungsbeiträge, aus denen sich die Kopplungsraten für alle gebildeten Allelkombinationen angeben ließen, elternspezifisch bestimmen zu können.

Existieren in einer Population nur zwei unterschiedliche Genotypen und lassen sich in deren Einzelbaumnachkommenschaften alle von außerhalb der Population stammenden Paarungsbeiträge identifizieren, gelten alle übrigen Nachkommen als aus der Paarung der beiden Genotypen entstanden. Um eine Kopplungsanalyse an solchem Samenmaterial aus freier Abblüte durchführen zu können, mußte die Stichprobe um den Anteil, der gesichert aus populationsexterner Befruchtung stammt, verringert werden. Diese

Nachkommen eignen sich somit gleichermaßen für eine Kopplungsanalyse wie die aus einer definierten Kreuzung stammenden, wenn die Träger identischen Genotyps den gleichen Inkompatibilitätsgenotyp besitzen und somit untereinander selbstinkompatibel sind. Ausgehend vom doppelt-heterozygoten Samenelter wurde die bei HATTEMER et al. (1993) dargestellte Vorgehensweise zur Schätzung der Kopplungsrate c auf die in den Tabellen 3-5a und 3-5b reduzierten Fallbeispiele für verschiedene Kombinationen von Enzymgenloci im Vorkommen *Weende* angewandt.

Die Anteile an der Gesamtnachkommenschaft einer Paarung, deren elterliche gametische Beiträge zugeordnet werden können, verringern sich mit zunehmender Heterozygotie des Pollenelters und beeinflussen somit maßgeblich die Größe einer zu untersuchenden Stichprobe.

So trat der Fall auf, in dem der Pollenelter an einem der beiden Genloci homozygot ist z. B. $\begin{pmatrix} A_1 A_1 \\ B_1 B_2 \end{pmatrix}$. Dadurch reduziert sich die Anzahl von Genotypen von 9 aus der Paarung zweier doppelt-heterozygoter Individuen (nach HATTEMER et al. 1993, S. 115) auf 6, wie die Tabelle 3-5a verdeutlicht.

Tab. 3-5a: Berechnung der genotypischen Verteilung nach Kreuzung eines einfach-heterozygoten mit einem doppelt-heterozygoten Individuums

♂ Gameten	♀ Gameten			
	$\frac{c}{2} \begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{1-c}{2} \begin{pmatrix} A_1 \\ B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{1-c}{2} \begin{pmatrix} A_2 \\ B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{c}{2} \begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix}$
$\frac{1}{2} \begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{c}{4} \begin{pmatrix} A_1 A_1 \\ B_1 B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{4} \begin{pmatrix} A_1 A_1 \\ B_1 B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{(1-c)}{4} \begin{pmatrix} A_1 A_2 \\ B_1 B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{4} \begin{pmatrix} A_1 A_2 \\ B_1 B_2 \end{pmatrix}$
$\frac{1}{2} \begin{pmatrix} A_1 \\ B_2 \end{pmatrix}$		$\frac{(1-c)}{4} \begin{pmatrix} A_1 A_1 \\ B_2 B_2 \end{pmatrix}$		$\frac{c}{4} \begin{pmatrix} A_1 A_2 \\ B_2 B_2 \end{pmatrix}$

Schließlich ergibt sich aus der Paarung mit einem doppelt-homozygoten Pollenelter der einfachste aufgetretene Fall, daß nur Pollen des Alleltyps $\begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix}$ gebildet werden (s. Tabelle 3-5b). Unter den Nachkommen sind nur vier Genotypen präsent, deren Elternschaft eindeutig differenzierbar ist, wie im Folgenden die Tabelle 3-5b belegt.

Tab. 3-5b: Genotypische Verteilung in der Nachkommenschaft nach Kreuzung eines doppelt-homozygoten mit einem doppelt-heterozygoten Individuums (nach HATTEMER et al. 1993, S. 118, Tab. 6-10)

♂ Gameten	♀ Gameten			
	$\frac{c}{2} \begin{pmatrix} A_1 \\ B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{1-c}{2} \begin{pmatrix} A_1 \\ B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{1-c}{2} \begin{pmatrix} A_2 \\ B_1 \end{pmatrix}$	$\frac{c}{2} \begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix}$
$\begin{pmatrix} A_2 \\ B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{c}{2} \begin{pmatrix} A_1 A_2 \\ B_1 B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{1-c}{2} \begin{pmatrix} A_1 A_2 \\ B_2 B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{1-c}{2} \begin{pmatrix} A_2 A_2 \\ B_1 B_2 \end{pmatrix}$	$\frac{c}{2} \begin{pmatrix} A_2 A_2 \\ B_2 B_2 \end{pmatrix}$

3.2.2.2 *Nachweis von Kopplung*

Die Population *Weende* besteht faktisch aus zwei vollständig kompatiblen Individuen, von denen das eine durch einen zentralen Baum BD 11 und das andere durch den genetisch an den beobachteten Enzymgenloci identischen Rest BD 1 bis BD 10 repräsentiert wird. Dabei weist BD 11 drei (PGM- B_1B_2 , SKDH- B_1B_2 und GOT- C_1C_2) und die anderen weisen vier Genloci in heterozygotem Zustand (PGM- B_1B_2 , PGI- B_1B_2 , 6PGDH- A_1A_2 und ACO- B_1B_2) auf. Da für die Kopplungsanalyse der Samenelter in jedem Fall zwei Genloci in heterozygotem Zustand besitzen muß, sind 45 Kombinationsmöglichkeiten an 9 Paaren von Enzymgenloci untersucht worden, 3 für BD 11 und 6 für die übrigen. Von jedem Individuum wurde eine Stichprobe von 160 Samen nach freier Abblüte mit Hilfe von Enzymgenmarkern untersucht. Während für BD 11 ausreichend Samen vorhanden waren, mußte für die zweite Stichprobe das Saatgut der übrigen Bäume, die aus Wurzelbrut entstanden sind, gemischt werden. Die Mischung ist proportional zur tatsächlich geernteten Samenmenge des einzelnen Klonvertreters vorgenommen worden.

Während eine Segregationsanalyse nur die Spaltungsverhältnisse von vererbbaaren Merkmalen an einem einzelnen Genort betrachtet, wird bei der Kopplungsanalyse die kombinierte Weitergabe von Merkmalen zweier Genloci auf ihre Unabhängigkeit geprüft.

Insgesamt erwiesen sich 92 Nachkommen der Vogelkirsche BD 11 und 76 der übrigen mit der Hypothese über ihre Abstammung konsistent. Diese konnten für die Kopplungsanalyse verwendet werden. In den Fällen, in welchen der bei Samen- und Pollenelter heterozygote Genotyp PGM- B_1B_2 in die Kopplungsanalyse integriert wurde, reduzierte sich die Anzahl der verwendbaren Nachkommen nochmals auf 49 (vgl. auch Tab. 3-5a).

Im Kopf der folgenden Tabelle 3-5c sind die erwarteten Kopplungsverhältnisse für die beiden jeweils betrachteten Genloci, die an dieser Stelle mit den Platzhaltern X und Y bezeichnet sind, angegeben und in den dazugehörigen Spalten die absoluten Häufigkeiten der identifizierten Kombinationen von Enzymgenloci dargestellt.

In der letzten Spalte sind die aus den vorliegenden Verhältnissen geschätzten Kopplungsraten c aufgelistet. Die Rekombinationsrate $1 - c$ ist das Komplement der Kopplungsrate zu eins und bezeichnet die Wahrscheinlichkeit dafür, daß zwischen den beiden betrachteten Genloci eine ungerade Zahl von Crossover stattfanden.

Die jeweils in den beiden Spalten unter $\begin{pmatrix} X_1 \\ Y_1 \end{pmatrix}$ und $\begin{pmatrix} X_2 \\ Y_2 \end{pmatrix}$ bzw. $\begin{pmatrix} X_1 \\ Y_2 \end{pmatrix}$ und $\begin{pmatrix} X_2 \\ Y_1 \end{pmatrix}$ aufgelisteten Werte sollten sich bei Kopplung in ihrer etwaigen Größenordnung entsprechen. Abweichungen hiervon sind möglicherweise auf Unregelmäßigkeiten bei der Segregation zurückzuführen.

Tab. 3-5c: Kopplungsverhältnisse und -raten zwischen Enzymgenloci

Kombinierte Enzymgenloci	♂ Gameten und ihre Häufigkeiten				Kopplungs- rate <i>c</i>
	$\begin{pmatrix} X_1 \\ Y_1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} X_1 \\ Y_2 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} X_2 \\ Y_1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} X_2 \\ Y_2 \end{pmatrix}$	
BD 2 bis 10:					
PGM- B_1B_2 /PGI- B_1B_2	24	7	1	17	0,837
PGM- B_1B_2 /6PGDH- A_1A_2	17	9	14	9	0,531
PGM- B_1B_2 /ACO- B_1B_2	17	9	14	9	0,531
PGI- B_1B_2 /ACO- B_1B_2	28	20	20	24	0,565
PGI- B_1B_2 /6PGDH- A_1A_2	23	25	20	24	0,511
6PGDH- A_1A_2 /ACO- B_1B_2	27	16	21	28	0,598
BD 11:					
PGM- B_1B_2 /GOT- C_1C_2	20	11	2	16	0,735
PGM- B_1B_2 /SKDH- B_1B_2	24	7	14	4	0,571
SKDH- B_1B_2 /GOT- C_1C_2	30	32	4	10	0,526

Da beide Sameneltern am Genlocus PGM-B heterozygot sind, ergeben sich zwangsläufig die meisten Kombinationen mit diesem Genort. Der stärksten beobachteten Kopplung unterliegen die Enzymgenloci PGM-B und PGI-B mit $c = 0,837$. Die Kombination von PGM-B und GOT-C weist mit $c = 0,735$ ebenfalls eine ziemlich strenge Kopplung auf. Die folgenden drei Kombinationen von SKDH-B, 6PGDH-A und ACO-B mit PGM-B weisen Abweichungen von der regelmäßigen Segregation der Gameten an den einzelnen Genloci sowie bei der Rekombination der aus ihnen erfolgreich gebildeten Genotypen auf. Daher ist deren Kopplung an den Enzymgenlocus PGM-B kaum nachweisbar.

Das Ausmaß der Kopplung zwischen PGI-B und ACO-B ist als gering einzustufen. Die Allele der Genloci PGI-B und 6PGDH-A rekombinieren frei ($c=0,511$). Mit einer Kopplungsrate $c = 0,598$ weist die Kombination von 6PDGDH-A und ACO-B bereits eine deutliche Abweichung von unabhängiger Vererbung auf. Dabei haben sowohl 6PDGDH-A als auch ACO-B in Kombination mit PGM-B die zahlenmäßig gleiche Verteilung der Genotypen, die sich aber jeweils auf unterschiedliche Individuen verteilen, und somit auffälligerweise eine identische Kopplungsrate ($c=0,531$) aufgewiesen. Obwohl für die Kombination SKDH-B und GOT-C keine strenge Kopplung nachweisbar ist, weisen die Genotypen deutliche Unterschiede im Hinblick auf ihre Gleichhäufigkeit auf, was auf mögliche Unterschiede in der Segregation an den Genloci hinweist, die durch eine präferentielle Befruchtung noch verstärkt worden ist.

Bei der Kulturkirsche haben BOŠKOVIĆ et al. (1997b) und BOŠKOVIĆ & TOBUTT (1998) sowie GRANGER (1996b) an inter- bzw. intraspezifischen Kreuzungen Kopplungsanalysen an einer großen Anzahl unterschiedlicher Enzymgenloci durchgeführt. BOŠKOVIĆ & TOBUTT (1998) bilden auf der Basis ihrer Ergebnisse die relative Lage der

Genloci zueinander ab. Auch wenn sie einige Enzymsysteme, wie GOT, 6PGDH oder PGI, untersucht haben, ergeben sich keine Vergleichsmöglichkeiten, da sie keine der hier untersuchten Kombinationen in wenigstens einem Individuum vorgefunden haben. GRANGER (1996b) klassifiziert acht untereinander und an den Inkompatibilitätgenlocus gekoppelte Enzymgenloci (6PGDH, G6PDH, MDH, PGM, SKDH, FDP, GOT und IDH) sowie einen davon unabhängigen (PGI). Dies steht im Widerspruch zu den hier vorgelegten Ergebnissen, die Kopplung zwischen PGM-B und PGI-B sowie weitgehend freie Rekombination zwischen PGM-B, SKDH-B und 6PGDH-A sowie zwischen PGI-B und GOT-C nachweisen. Die Schätzung der Rekombinationsraten zwischen GOT, SKDH und PGM wirft GRANGER (1996b) nicht aus, da er übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit feststellt, daß die Verteilung der Genotypen nicht regulär ist. Darüber hinaus sieht er einen Zusammenhang mit der Kopplung des Enzymgenlocus GOT an den Inkompatibilitätgenlocus.

Die Kopplungsverhältnisse zwischen Inkompatibilitäts- und untersuchten Strukturgenloci lassen sich bisher nur modellhaft wiedergeben (LEACH 1988), da nach bisherigen Erkenntnissen keine labortechnische Methode zur Identifikation des *S*-Genotyps an einem frühen Zygotenstadium, wie dem Samen der Vogelkirsche, existiert. *S*-Allele bei der Kirsche sind mit den heutigen Methoden erst mit der Blüte nachweisbar. Mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden haben TAO et al. (1999) zwei der sechs häufigsten *S*-Allele auch in Griffeln der Kulturkirsche nachweisen können. Bis alle *S*-Allele bei der Vogelkirsche auf molekularbiologischer Basis differenzierbar sind, wird noch einige Entwicklungsarbeit geleistet werden müssen. Ob sich diese Methoden künftig auch auf Samen anwenden lassen, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantworten.

3.3 Genetische Strukturen verschiedener Vogelkirschenvorkommen

3.3.1 Genetische Strukturen verschiedener Samenplantagen

Das Ergebnis der genetischen Inventur in vier Samenplantagen ist in Tabelle 3-6 in Form absoluter und relativer Genotyphäufigkeiten dargestellt. Die untersuchten polymorphen Enzymgenorte sind zeilenweise aufgelistet. Innerhalb der Zeile gibt jeweils die obere Zahl den absoluten und die untere den relativen Wert wieder.

Die 10 polymorphen Enzymgenloci weisen einen unterschiedlichen Polymorphiegrad auf. Vier davon sind nur wenig variabel und in einigen Klonsammlungen sogar fixiert. Es handelt sich um die Genloci PGM-B, SKDH-B, AP-A und PPO-A. An den übrigen sind kaum Unterschiede im Variationsmuster zu erkennen, da der an einem Genlocus häufigste Typ dies im Allgemeinen in allen anderen Samenplantagen gleichermaßen ist. Bedingt durch die unterschiedliche Größe der einzelnen Samenplantage ergeben sich zum Teil große Ähnlichkeiten in den relativen Häufigkeiten. Nur am Enzymgenlocus IDH-B weist GSED (GILLET 1984) für alle 4 Plantagen signifikant mehr Homozygote aus, als unter der Annahme von HARDY-WEINBERG-Strukturen zu erwarten sind. An allen übrigen Enzymgenloci sind keine signifikanten Abweichungen von HARDY-WEINBERG-Strukturen feststellbar.

Tab. 3-6: Absolute (obere Werte) und relative (untere Werte) Genotyphäufigkeiten verschiedener Enzymgenloci der Vogelkirsche in vier Samenplantagen. Die Werte der Heterozygoten sind hellgrau unterlegt und fehlende Variation ist stark gerahmt.

Plantage Genotyp	Rheinland-Pfalz I (N = 147)						Rheinland-Pfalz II (N = 92)						Neuhemsbach (N = 39)						Nordrhein-Westfalen I (N = 70)					
	11	12	22	13	23	33	11	12	22	13	23	33	11	12	22	13	23	33	11	12	22	13	23	33
GOT-C	118 .803	26 .177	3 .020				55 .598	34 .370	3 .032				27 .692	10 .256	2 .052				45 .643	24 .343	1 .014			
IDH-B	75 .510	25 .170	47 .320				50 .544	12 .130	30 .326				11 .282	13 .333	15 .385				34 .486	26 .371	10 .143			
6PGD-A	8 .054	58 .395	81 .551				13 .141	32 .348	47 .511				1 .026	13 .333	25 .641				3 .043	27 .386	40 .571			
PGI-A		10 .068	114 .775	1 .007	21 .143	1 .007		1 .011	82 .891		9 .098			1 .026	35 .897				6 .086	56 .800		8 .114		
PGM-B	144 .980	3 .020					92 1.0						39 1.0						69 .986	1 .014				
SKDH-B	3 .020	12 .082	132 .898					2 .022	90 .978						39 1.0				1 .014	69 .986				
LAP-A	141 .959	6 .041					74 .804	18 .196					39 1.0						70 1.0					
PPO-A		14 .095	133 .905						92 1.0					1 .026	38 .974					70 1.0				
ACO-B	3 .020	40 .272	104 .708				12 .130	35 .380	45 .490				1 .026	19 .487	19 .487				35 .500	500 .500				
MDH-A	3 .020	22 .150	122 .830					23 .250	69 .750					7 .179	32 .821				22 .314	48 .686				

Das ist für Klonsammlungen der Vogelkirsche ein bemerkenswertes Ergebnis, da diese nicht aufgrund sexueller Reproduktion entstanden sind und auch nicht unter Beachtung gewisser Mindestabstände der Ausgangsbäume in den Beständen zueinander zufällig zusammengestellt wurden.

Die genotypischen Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven an den einzelnen Genloci sind sehr gering. Durch die Vielzahl möglicher Kombinationen zwischen den Genloci läßt sich eine bessere Differenzierbarkeit der Kollektive erwarten. Stellvertretend für die Einzelwerte der Differenzierung jedes einzelnen Genlocus, die wegen ihrer geringen Größen kaum Unterschiede zwischen den Samenplantagen darstellen würden, wird die genische Differenzierung der Kollektive D_j^{GP} sowie deren mittlere Differenzierung δ als Vergleichswerte in Tabelle 3-7 angegeben. Bedeutsamer erscheinen an dieser Stelle die Differenzierung der Multilocus-Genotypen D_j^{MLG} und deren mittlere Differenzierung δ (s. Tabelle 3-7).

Tab. 3-7: Differenzierungen der Multilocus-Genotypen D_j^{MLG} und des Genpools D_j^{GP} in vier Samenplantagen sowie deren mittlere Differenzierung δ

Samenplantage	D_j^{MLG}	D_j^{GP}
<i>Rheinland-Pfalz I</i>	0,888	0,095
<i>Rheinland-Pfalz II</i>	0,860	0,094
<i>Nordrhein-Westfalen I</i>	0,928	0,087
<i>Neuhemsbach</i>	0,932	0,078
δ	0,896	0,091

Jede der vier Samenplantagen ist der Zusammensetzung ihrer Multilocus-Genotypen deutlich von den jeweils übrigen verschieden. Im Mittel beträgt die Multilocus-Differenzierung etwa 90%, während die des Genpools nur etwa ein Zehntel beträgt. Da jede Samenplantage eine andere Region in Westdeutschland repräsentiert, lassen sich diese Unterschiede als sehr regionalspezifisch interpretieren. MARIETTE et al. (1997) haben fünf Vogelkirschenpopulationen in Frankreich untersucht und finden, gemessen mit G_{ST} , der mittleren Populationsdifferenzierung nach NEI (1973), nur begrenzt genetische Unterschiede zwischen den Populationen.

Um die Variation innerhalb der Samenplantagen zu charakterisieren, wurden die Gesamtdifferenzierung der Multilocus-Genotypen δ_T^{MLG} und des Genpools δ_T^{GP} berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-8 wiedergegeben.

Tab. 3-8: Totale Differenzierung der Multilocus-Genotypen innerhalb jeder der vier Samenplantagen

Samenplantage	δ_T^{MLG}	δ_T^{GP}
<i>Rheinland-Pfalz I</i>	0,974	0,308
<i>Rheinland-Pfalz II</i>	0,980	0,325
<i>Nordrhein-Westfalen I</i>	0,973	0,303
<i>Neuhemsbach</i>	0,968	0,272

Die Gesamtdifferenzierung der Multilocus-Genotypen δ_T^{MLG} nimmt in allen Klon-sammlungen Werte von fast 1 an. Damit ist jede Samenplantage in sich nahezu vollständig differenziert. Demgegenüber betragen die Werte der Genpool-Gesamtdifferenzierung δ_T^{GP} weniger als ein Drittel hiervon. Aus den Tabellen 3-7 und 3-8 ergibt sich, daß die Kollektive ein hohes Maß an Differenzierung sowohl zwischen allen als auch innerhalb jedes aufweisen, was wegen der deutlich geringeren Genpool-Differenzierungen auffallend ist.

Die Multilocus-Diversität v_2 gibt die effektive Anzahl in der jeweiligen Plantage vorhandenen unterschiedlichen Genotypen an. In Tabelle 3-9 ist die Multilocusdiversität v_2 der Populationsgröße gegenübergestellt.

Tab. 3-9: Genotypische Multilocus-Diversität v_2 in vier Samenplantagen der Vogelkirsche

Samenplantage	v_2
<i>Rheinland-Pfalz I</i> (N=147)	30,651
<i>Rheinland-Pfalz II</i> (N=92)	32,305
<i>Nordrhein-Westfalen I</i> (N=70)	24,500
<i>Neuhemsbach</i> (N=39)	17,483

Die Plantage *Rheinland-Pfalz I* besitzt etwa 31 effektive Genotypen. Bezogen auf die Anzahl der gepfropften Klone entsprechen diese jedoch etwa einem Fünftel, was den geringsten Anteil unter allen Kollektiven ausmacht. Im Gegensatz dazu beträgt dieser Anteil in der Samenplantage *Neuhemsbach* mit 17 effektiven Genotypen nahezu der Hälfte aller Klone. Die 32 bzw. 24 effektiven Genotypen in den beiden übrigen Plantagen entsprechen 35% aller Klone.

Um erkennen zu können, worauf die genotypischen Unterschiede im Wesentlichen beruhen, wurde die individuelle Heterozygotie als Anzahl von Genloci, die ein Individuum in heterozygotem Zustand besitzt, für jede Plantage ermittelt. Die Verteilung der individuellen Heterozygotie ist für die vier Samenplantagen in Tabelle 3-10 dargestellt.

Tab. 3-10: Absolute und relative Häufigkeiten der individuellen Heterozygotie sowie des mittleren Heterozygotenanteils H_a in vier Samenplantagen der Vogelkirsche

Samenplantage	individuelle Heterozygotie						H_a
	0	1	2	3	4	5	
<i>Rheinland-Pfalz I</i>	0,170	0,361	0,224	0,163	0,075	0,007	0,163
<i>Rheinland-Pfalz II</i>	0,043	0,315	0,402	0,163	0,076		0,191
<i>Nordrhein-Westfalen I</i>	0,071	0,214	0,329	0,271	0,086	0,029	0,217
<i>Rheinland-Pfalz III</i>	0,077	0,359	0,385	0,128	0,051		0,172

Im Mittel sind 16 bis 22% der 10 untersuchten Enzymgenloci heterozygot. Diese verteilen sich bezüglich ihrer individuellen Heterozygotie auf Werte zwischen 0 und 5. Die maximale Heterozygotie von 5 ist nur in den beiden Samenplantagen ***Rheinland-Pfalz I*** und ***Nordrhein-Westfalen I*** erreicht. Der Anteil Individuen, die eine Heterozygotie 0 oder 4 aufweisen ist geringer als 10%; nur die Samenplantage ***Rheinland-Pfalz I*** besitzt demgegenüber einen höheren Anteil von 17% individueller Heterozygotie 0. Die meisten Individuen aller Kollektive weisen 1 oder 2 Genloci in heterozygoten Zustand auf, wobei ein deutliches Schwergewicht bei den doppelt-heterozygoten Individuen liegt. Davon abweichend verhält sich nur die Samenplantage ***Rheinland-Pfalz I***. Die individuelle Heterozygotie 3 ist in der Samenplantage ***Nordrhein-Westfalen I*** mehr als doppelt so hoch wie Einzelwerte der übrigen. Deren Anteile liegen immerhin zwischen 12 und 14%, was jeweils etwa einem Sechstel der Gesamtindividuenzahl entspricht.

Samenplantagen sind Klonsammlungen, die aus verschiedenen Ausgangsvorkommen zusammengetragen wurden. Der Anteil von Individuen, die bereits in der Ausgangspopulation asexuell reproduziert waren, ist zwar unbekannt, aber für die Reproduktion der Plantage von besonderem Interesse. Handelt es sich doch bei den bereits in den Ausgangsbeständen asexuell reproduzierten Individuen um den gleichen Inkompatibilitätsgenotyp. Unter diesem Aspekt ist es durchaus sinnvoll, auch in Klonsammlungen den Anteil von Genotypen zu ermitteln, die bereits im Ausgangsbestand aus Wurzelbrut stammen. Da für jeden Klon in den Plantagen der Ausgangsbestand bekannt ist, können alle Individuen nach dem in 2.2.8 vorgestellten Verfahren differenziert werden.

Die festgestellte, absolute Anzahl aus generativer Reproduktion in den Ausgangsbeständen stammender Individuen ($N_S = G_S$) sowie aus asexueller Reproduktion in diesen Beständen stammender Individuen N_C und Genotypen G_S sind als Basisdaten für die nachfolgenden Berechnungen der unterschiedlichen Maße für die Kollektive in Tabelle 3-11a aufgelistet. In der gleichen Tabelle sind die tatsächliche Anzahl Multilocus-Genotypen G und die maximale Anzahl realisierbarer Multilocus-Genotypen G_{max} einander gegenüberstellt.

Tab. 3-11a: Aus den Multilocus-Strukturen von vier Samenplantagen der Vogelkirsche festgestellte Basisdaten für die Berechnungen in Tab. 3-11b

Samenplantage	$N_S = G_S$	N_C	G_C	G	G_{max}
<i>Rheinland-Pfalz I</i> (N=147)	54	93	21	75	100
<i>Rheinland-Pfalz II</i> (N=92)	31	61	20	51	61
<i>Nordrhein-Westfalen I</i> (N=70)	30	40	13	43	50
<i>Neuhemsbach</i> (N=39)	17	22	8	25	28

G_{max} betrachtet den Fall, daß alle asexuell reproduzierten Multilocus-Genotypen im Kollektiv genau zweimal vorhanden sind. Im Vergleich der Anzahl vorhandener Multilocus-Genotypen G und maximal möglicher G_{max} zeigt sich, daß in den individuenreicheren Klonsammlungen der Unterschied größer ist. Je größer dieser Unterschied ist, umso stärker weicht die mittlere Anzahl aus asexueller Reproduktion stammender klongleicher Individuen N_C/G_C von einer absoluten Häufigkeit von 2 ab (s. a. 2.2.8, S. 33).

Zur Darstellung der verschiedenen Ansätze, die Abstammung aus asexueller Reproduktion beschreiben, sind N_C/N , G_S/G , $1 - \delta_T$ und G/N in Tabelle 3-11b aufgelistet. In der letzten Spalte ist die mittlere Anzahl asexuell reproduzierter Individuen N_C pro Multilocus-Genotyp G_C aus asexueller Reproduktion aufgelistet.

Tab. 3-11b:Gegenüberstellung von verschiedenen Ansätzen zur Beschreibung der Anteile aus asexueller Reproduktion in den Ausgangsbeständen stammender Klone von vier Samenplantagen der Vogelkirsche

Samenplantage	N_C/N	G_C/G	$1 - \delta_T$	G/N	N_C/G_C
<i>Rheinland-Pfalz I</i>	0,632	0,280	0,026	0,510	4.43
<i>Rheinland-Pfalz II</i>	0,663	0,392	0,020	0,554	3.05
<i>Nordrhein-Westfalen I</i>	0,571	0,302	0,027	0,614	3.08
<i>Neuhemsbach</i>	0,564	0,320	0,032	0,641	2.75

Betrachtet man die Einzelwerte von N_C/N , die zwischen 56 und 66% schwanken, waren bereits über die Hälfte aller Individuen der vier Samenplantagen in ihren Ausgangsbeständen vegetative Abkömmlinge. In der Plantage *Rheinland-Pfalz II* beträgt dieser Anteil fast exakt zwei Drittel der Individuen, während die individuenärmste Plantage *Neuhemsbach* mit 0,564 den geringsten Wert aufweist.

G_C/G , der prozentuale Anteil der asexuell reproduzierter Multilocus-Genotypen, weist Werte der Verklonung zwischen 28 und 39% aus. Auch hier ist die Plantage *Rheinland-Pfalz II* mit dem höchsten Anteil vertreten, während die Plantage *Rheinland-Pfalz I* den untersten Rang einnimmt.

An anderer Stelle wurde festgestellt, daß die Multilocus-Genotypen aller Samenplantagen fast vollständig differenziert sind. Mit Werten zwischen 2 und etwas mehr als

3% weist $1 - \delta_T$, das Komplement der Gesamtdifferenzierung zu 1 sehr geringe Anteile asexueller Reproduktion in den Ausgangsbeständen aus.

Der Quotient G/N spiegelt den Anteil unterscheidbarer Multilocus-Genotypen G in den Samenplantagen wider. Die Werte schwanken zwischen 51% in *Rheinland-Pfalz I* und 64% in *Neuhemsbach*. Damit sind, prozentual gesehen, nur geringfügig mehr Multilocus-Genotypen in den individuenärmeren Klonsammlungen vorhanden.

Die mittlere Anzahlen pro asexuell reproduziertem Genotyp in den vier Klonsammlungen schwanken zwischen 4,43 in der individuenreichsten Plantage *Rheinland-Pfalz I* und 2,75 in der individuenärmsten Plantage *Neuhemsbach*. Im Mittel aller Kollektive ist jeder asexuell reproduzierte Genotyp durch etwa 3 Klongschwister vertreten.

3.3.2 Genetische Strukturen der Vogelkirsche in einem Mischbestand

3.3.2.1 Variation der untersuchten Enzymgenloci

Das Ergebnis der genetischen Inventur des Vorkommens *Wibbecke* ist einzellocusweise in der Tabelle 3-12 dargestellt und im Folgenden erläutert.

Die Enzymgenloci AP-A, PPO-A und MDH-A sind in der Population fixiert. An den Genloci PGM-B, PGI-B, GOT-C und ACO-B sind nur zwei von drei möglichen Genotypen vorgefunden worden. PGM-B und PGI-B weisen zudem nur eine geringe Anzahl Heterozygoter auf. Nur am Enzymgenlocus 6PGDH-A weist GSED (GILLET 1994) keine signifikante Abweichung von der HARDY-WEINBERG-Struktur aus, während an den Genloci SKDH-B, GOT-C und ACO-B deutlich mehr Heterozygote vorhanden sind, als beim Vorliegen einer HARDY-WEINBERG-Struktur zu erwarten wäre. Wie schon in Zusammenhang mit den Samenplantagen aufgezeigt, weist IDH-B gegenüber der korrespondierenden HARDY-WEINBERG-Struktur signifikant mehr Homozygote auf.

Tab. 3-12: Absolute und relative (Werte in Klammern) Genotyphäufigkeiten verschiedener Enzymgenloci der Vogelkirsche im Vorkommen *Wibbecke*

Enzymgenlocus	Genotyp		
	11	12	22
AP-A	87 (1,0)		
PGM-B	78 (0,897)	9 (0,103)	
PGI-B		4 (0,046)	83 (0,954)
IDH-B	55 (0,632)	15 (0,173)	17 (0,195)
6PGDH-A	25 (0,297)	39 (0,448)	23 (0,265)
SKDH-B	1 (0,011)	67 (0,770)	19 (0,219)
GOT-C	62 (0,701)	26 (0,299)	
PPO-A			87 (1,0)
ACO-B		42 (0,484)	45 (0,517)
MDH-A			87 (1,0)

Absolut wurden 28 Multilocus-Genotypen in der Population nachgewiesen. Die

Multilocus-Diversität, ein weiterer Variationsparameter, weist etwas mehr als 13 effektive Genotypen in der Population nach, was weniger als die Hälfte der nachgewiesenen Multilocus-Genotypen entspricht.

Die Verteilung der individuellen Heterozygotie an sieben polymorphen Enzymgenloci ist in Tabelle 3-13 bezüglich ihrer Verteilung sowohl für die Gesamtindividuenzahl N als auch für die Anzahl unterschiedlicher Multilocus-Genotypen G dargestellt.

Tab. 3-13: Absolute (obere Werte) und relative (untere Werte) Häufigkeiten der individuellen Heterozygotie sowie des mittleren Heterozygotenanteils H_a der Vogelkirsche im Vorkommen **Wibbecke**, bezogen auf die Gesamtindividuenzahl N bzw. die Anzahl unterschiedlicher Multilocus-Genotypen G

	individuelle Heterozygotie				H_a
	0	1	2	3	
N=87	2	18	26	41	
	0,023	0,207	0,299	0,471	0,232
G=28	1	6	10	11	
	0,036	0,214	0,357	0,393	0,333

Im Mittel sind 23% aller untersuchten Genloci der Individuen heterozygot. Bezogen auf die geringe Anzahl von Multilocus-Genotypen beträgt der mittlere Heterozygotiegrad ein Drittel aller Genloci. Die Individuen der Population weisen Werte der individuellen Heterozygotie zwischen 0 und 3 auf. Nur zwei Individuen besitzen keine Genloci in heterozygotem Zustand. Etwa ein Fünftel der Individuen sind an einem Genlocus heterozygot. Doppelt-heterozygote Individuen machen ca. 30% der Gesamtindividuenzahl aus. Die Mehrzahl aller Individuen besitzt drei Genloci in heterozygotem Zustand. Betrachtet man im Vergleich dazu die Verteilung der Heterozygotie innerhalb der unterschiedlichen Multilocus-Genotypen, so zeigt sich ein ähnliches Bild. In der Population ist nur ein Multilocus-Genotyp vollständig homozygot. Die beiden korrespondierenden Individuen sind somit genetisch identisch an den beobachteten Enzymgenloci. In der Population wurden jeweils nur zwei Allele an jedem Genlocus beobachtet. Die Anzahl Multilocus-Genotypen, die nur an einem Genlocus heterozygot sind, ist somit durch die Anzahl polymorpher Genloci begrenzt und sechs von sieben möglichen sind realisiert. 10 unterschiedliche doppelt-heterozygote Multilocus-Genotypen und 11 mit jeweils drei verschiedenen Genloci in heterozygotem Zustand bilden das Gros aller realisierten Genotypen und sind nach absoluten Werten etwa gleich häufig. Die Anzahl potentiell realisierbarer Genotypen beträgt bei sieben polymorphen Genloci und jeweils zwei Allelen pro Genlocus 21 Doppelt-heterozygote ($\frac{n \cdot (n-1)}{2}$) und 35 Multilocus-Genotypen mit jeweils drei Genloci in heterozygotem Zustand ($\sum_i \frac{(n_i-1) \cdot (n_i-2)}{2}$). In Relation zu diesen Werten sind in der Population etwa die Hälfte aller doppelt-heterozygoten und etwa ein Drittel aller dreifach-heterozygoten Genotypen realisiert worden.

Die Variation der Multilocus-Genotypen innerhalb der Population, gemessen an der Gesamtdifferenzierung δ_T , beträgt 0,933. Die Unterschiede in der Population sind groß; im Vergleich zu den vier Samenplantagen, deren δ_T Werte zwischen 0,968 und 0,980 aufweist, wird jedoch ein geringerer Wert erreicht.

3.3.2.2 *Nachweis von klonalen Strukturen anhand der Verteilung der Multilocus-Genotypen*

Die geringe Zahl der in der Population nachgewiesenen Multilocus-Genotypen ($G=28$) läßt angesichts der Populationsgröße ($N=87$) eine entsprechend große Anzahl an den betrachteten Genloci identischer Individuen erwarten. Die maximale Anzahl in der Population realisierbaren Multilocus-Genotypen $G_{max} = (N + N_S)/2$ ist 49. Tatsächlich wurden in der Population aber nur 28 unterschiedliche Multilocus-Genotypen gefunden. Der Anteil asexuell reproduzierter unter allen Individuen dieser Population, ermittelt als Quotient N_C/N , beträgt 0,874. Der Anteil von Multilocus-Genotypen aus vegetativer Abstammung G_C/G ist 0,607. Die Population weist mit 0,067 einen geringen Grad der Fixierung auf, gemessen als $1 - \delta_T$, dem Komplement der Gesamtdifferenzierung zu 1.

Der Anteil unterscheidbarer Genotypen G/N beträgt 0,224. Daher muß die Mehrzahl aller aus asexueller Reproduktion stammenden Individuen mit einer absoluten Häufigkeit größer als 2 vorhanden sein. In der folgenden Tabelle 3-14 sind daher absolute Häufigkeiten, mit denen Multilocus-Genotypen in der Population vertreten sind, abgetragen. Diesen sind die Anzahl der vorhandenen Multilocus-Genotypen sowie der dazu korrespondierenden Individuen in absoluten Häufigkeiten zugeordnet worden. Die mittlere Anzahl asexuell reproduzierter Individuen pro Multilocus-Genotyp beträgt 4,47.

Tab. 3-14: Verteilung der Anzahlen von Multilocus-Genotypen G bzw. korrespondierenden Individuen N in Bezug auf die absolute Häufigkeit, mit der ein Multilocus-Genotyp im Vorkommen *Wibbecke* vorhanden ist.

Klasse	absolute Häufigkeit des Multilocus-Genotyps						
	1	2	3	4	5	6	18
$G=28$	11	4	4	4	2	2	1
$N=87$	11	8	12	16	10	12	18

11 der 28 Multilocus-Genotypen sind nur durch ein Individuum repräsentiert und stammen gemäß der *Annahme 1* auf Seite 35 aus generativer Reproduktion. Die übrigen 17 verteilen sich auf sechs Häufigkeitsklassen mit Werten zwischen 2 und 18. Jeweils 4 Multilocus-Genotypen besetzen die Klassen 2 bis 4. In den folgenden Klassen 5 und 6 sind jeweils 2 Genotypen vorhanden und ein weiterer Multilocus-Genotyp ist insgesamt durch 18 Vogelkirschen vertreten. Mit der Zunahme der absoluten Häufigkeitsklasse ist eine Abnahme der in dieser Klassen vorhandenen Genotypen verbunden. Die Multiplikation von absoluter Häufigkeit, mit der ein Multilocus-Genotyp in der Population vorhanden ist, und Anzahl verschiedener Genotypen dieser Häufigkeitsklasse ergibt die Verteilung

der Individuen auf die Häufigkeitsklassen, wie sie in der letzten Zeile der Tabelle 3-14 aufgelistet ist. Als Ergebnis dieser Rechenoperation läßt sich feststellen, daß sich die Individuen fast gleichmäßig auf die vorhandenen Klassen verteilen, wobei die absoluten Werte zwischen 8 und 18 schwanken. Das Minimum befindet sich in Klasse 2 und das Maximum in Klasse 18.

Die räumliche Verteilung der 28 verschiedenen Multilocus-Genotypen ist in Abbildung 3-6 dargestellt.

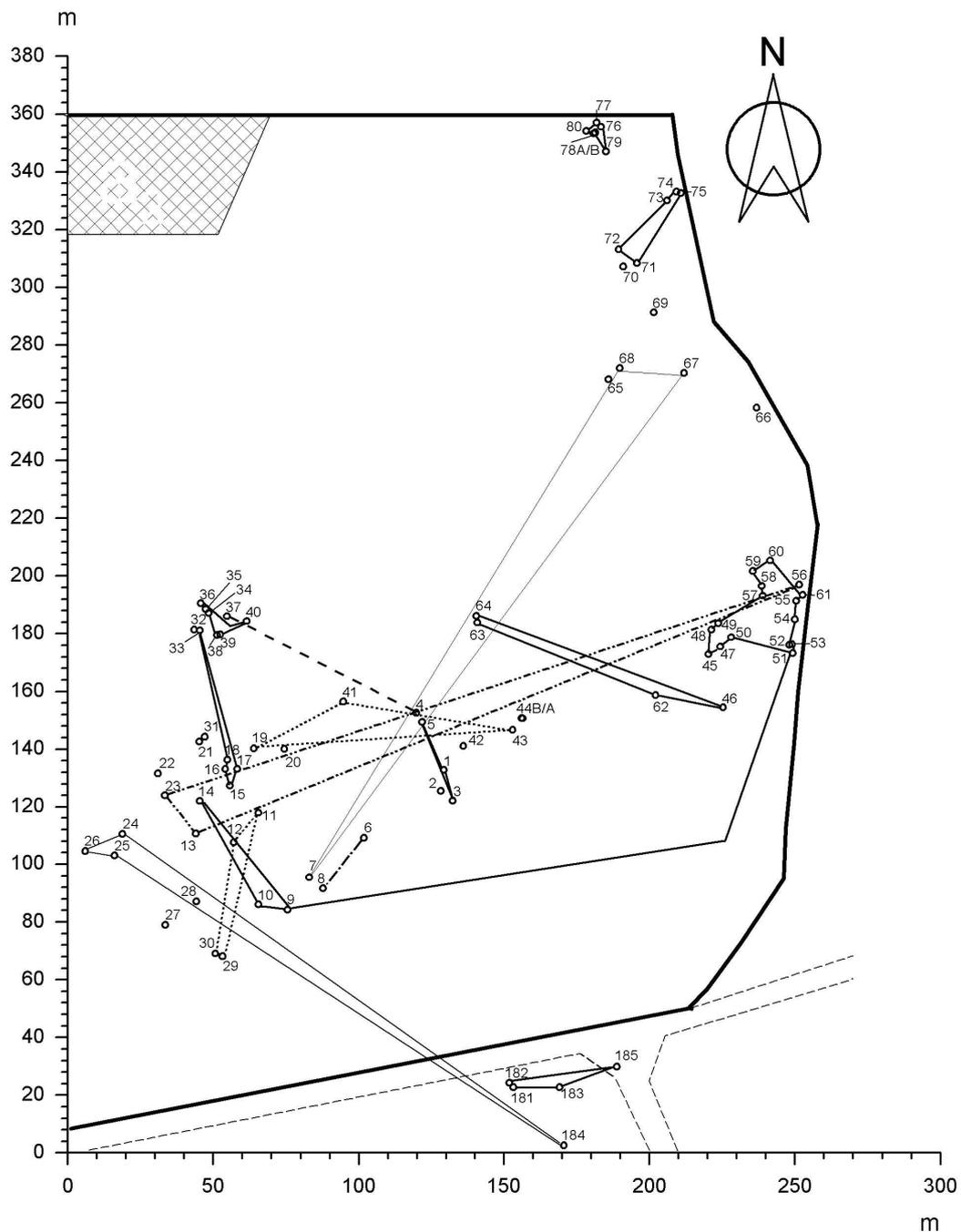


Abb. 3-6: Räumliche Verteilung der 28 Multilocus-Genotypen und Visualisierung der klonalen Strukturen im Vorkommen *Wibbecke* (Identische Genotypen sind durch Striche miteinander verbunden)

In der Abbildung 3-6 sind diejenigen Individuen mit identischem Multilocus-Genotyp durch Striche verbunden, da nach den o. a. Ergebnissen bei ihnen eine vegetative Abstammung zu erwarten ist. Wegen der Übersichtlichkeit wurde in größeren Gruppen gleichen Genotyps auf die Verbindung jedes Mitglieds des Kollektivs mit jedem verzichtet und nur die äußere Abgrenzung der Gruppen zu anderen skizziert. Vogelkirschen aus generativer Reproduktion (ohne Strichverbindungen) befinden sich vorwiegend am nordöstlichen (Nr. 65, 66, 69 und 70) und südwestlichen (Nr. 2, 27, 28 und 42) Rand der Population. Sehr viel differenzierter zeigen sich die Strukturen der aus asexueller Reproduktion stammenden Kirschen. Einige Klone verfolgen mehr lineare und andere sternförmige Ausbreitungsmuster. Im wesentlichen beschränkt sich die klonale Struktur eines Genotyps auf Entfernungen unter 50 Meter und nur in einigen Fällen werden Entfernungen von mehr als 100 Metern überbrückt. Dabei hat sich entweder ein Einzelbaum von einer kleineren Baumgruppe abgesetzt, wie z. B. Nr. 184 von den Nrn. 24 bis 26, oder es existieren zwei Baumgruppen.

3.3.2.3 Nachweis von generativen Abstammungsbeziehungen

Generative Abstammungsbeziehungen zwischen Individuen setzen eine vorausgegangene sexuelle Reproduktion voraus. Wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt, existieren im Vorkommen *Wibbecke* 11 Multilocus-Genotypen aus sexueller Reproduktion, deren tatsächliche Eltern unbekannt sind. Da 17 weitere die vegetativen Abkömmlinge von Vogelkirschen darstellen, die sich potentiell am reproduktiven Geschehen, aus dem die 11 vorgenannten entstanden sind, beteiligt haben könnten, wurde geprüft, ob alle Gameten, die zur Reproduktion dieser 11 Vogelkirschen beigetragen haben, auch von diesen potentiellen Eltern gebildet werden konnten. Wenn das der Fall ist, sollte eine Rekonstruktion von Abstammungsbeziehungen möglich sein. Wegen der Zuordnung der einzelnen Gameten zu bestimmten Eltern oder Gruppen solcher sind grundsätzlich drei denkbare Fälle der Elternschaft zu unterscheiden. Im ersten läßt sich jeder der beiden Paarungsbeiträge genau einem Elter zuordnen. Da es sich um ungeordnete Genotypen handelt, kann jedoch nicht nach männlichem und weiblichen Beitrag unterschieden werden. Der zweite betrifft solche Individuen, bei denen nur einer der beiden elterlichen Beiträge exakt zugeordnet werden kann, während beim dritten überhaupt keine konkrete Zuordnung möglich ist. In dem Fall, in dem keine exakte Rekonstruktion der Abstammungsbeziehung möglich ist, spricht man von multipler Elternschaft (ELLSTRAND 1984), was jedoch nur andeutet, daß die tatsächlichen Eltern aus einer Gruppe potentieller Eltern stammen, die den gesuchten Paarungsbeitrag beisteuern konnte.

Die 11 sexuell reproduzierten Kirschen und ihr potentielles Elternkollektiv besitzen gemeinsam insgesamt 25 Multilocus-Gameten, aus denen sich alle 11 sexuell reproduzierten Genotypen rekonstruieren lassen. Für vier der 11 generativ reproduzierten Vogelkirschen läßt sich jeweils ein potentieller elterlicher Beitrag eindeutig identifizieren. Da deren ursprüngliche Elternbäume aktuell durch die Genotypen von Klongruppen repräsentiert werden, ist nur eine Zuordnung zu diesen Gruppen möglich. So kann den Vogelkirschen 42 und 65 das Klonpaar 44 A/B sowie den Bäumen 22 und 28 das Paar 6 und 8 als potentieller Elter zugeordnet werden, während der komplementäre el-

terliche Beitrag durch mindestens 4, aber höchstens 7 Genotypen aus dem potentiellen Elternkollektiv gebildet worden sein könnte. Eine konkrete Zuordnung ist, wie auch bei den übrigen 7 sexuell reproduzierten Genotypen, nicht möglich, da die verwendeten Enzymgenmarker keine feinere Unterscheidung zwischen Multilocus-Gameten zulassen. Hilfreicher wären uniparental vererbte Merkmale, wie sie im Chloroplasten- oder Mitochondriengenom mancher Arten nachweisbar sind, bzw. hoch polymorphe DNA-Genmarker mit kodominanter Vererbung, um die Paarungsbeiträge besser unterscheiden zu können.

3.3.3 Schätzung des durch Pollen vermittelten Genflusses für eine isolierte Population

Um den durch Pollen vermittelten Genfluß innerhalb und von außerhalb einer Population darzustellen, wurde Einzelbaumsaatgut des Vorkommens *Weende* isoenzymatisch untersucht. Die Zusammensetzung der weitgehend isolierten Population wurde bereits für die Kopplungsanalyse detailliert beschrieben (s. a. 3.2.2.2, S. 55 ff.). 10 von 11 vorkommenden Vogelkirschen sind an 10 Enzymgenloci identisch und besitzen die vier Enzymgenloci (PGM-B, PGI-B, 6PGDH-A und ACO-B) in heterozygotem Zustand. Außerdem repräsentieren sie den gleichen Inkompatibilitätsgenotyp, der, wie in 3.1.3, S. 49, dargestellt, selbstinkompatibel ist. Im Einzelnen handelt es sich um die Bäume BD 1 bis 10. Von diesem Kollektiv identischer Klone genotypisch verschieden stellt sich die Kirsche BD 11 dar. Sie besitzt drei Enzymgenloci (PGM-B, SKDH-B und GOT-C) in heterozygotem Zustand und ist vollständig kompatibel zu den übrigen. Insgesamt verfügt die Population somit über genetische Variation an sechs der beobachteten Enzymgenloci.

Tab. 3-15: Relative Genotyphäufigkeiten verschiedener Enzymgenloci der Vogelkirsche in Einzelbaumsaatgut einer isolierten Population. **Fettdruck normal** = heterozygoter Genort des Samenelters; **Fettdruck kursiv** = fehlerhafte Zuordnung

Enzymgenlocus	Genotyp	BD 2 bis 10			Genotyp	BD 11		
		11	12	22		11	12	22
AP-A	A_1A_1	0,750	0,250		A_1A_1	0,569	0,431	
PGM-B	B_1B_2	0,369	0,388	0,244	B_1B_2	0,400	0,444	0,156
PGI-B	B_1B_2	0,031	0,563	0,406	B_2B_2		0,513	0,487
IDH-B	B_2B_2		0,100	0,900	B_2B_2		0,025	0,975
6PGDH-A	A_1A_2	0,450	0,487	0,063	A_1A_1	0,575	0,425	
SKDH-B	B_1B_1	0,687	0,313		B_1B_2	0,800	0,200	
GOT-C	C_1C_1	0,794	0,200	0,006	C_1C_2	0,481	0,381	0,138
PPO-A	A_2A_2			1,0	A_2A_2			1,0
ACO-B	B_1B_2	0,431	0,500	0,069	B_1B_1	0,475	0,525	
MDH-A	A_2A_2			1,0	A_2A_2			1,0

Zwei Stichproben von jeweils 160 Samen aus dem einzelbaumweise nach freier Abblüte geernteten Saatgut wurde untersucht. Die eine repräsentiert die Nachkommen

des Kollektivs BD 2 bis 10, da der Baum BD 1 in dem betreffenden Erntejahr keine Früchte trug; die andere die Zygotenpopulation der Kirsche BD 11 nach freier Abblüte. In Tabelle 3-15 sind die relativen Häufigkeiten der vorkommenden Genotypen aufgelistet. Die Genloci in heterozygotem Zustand sind in Tabelle 3-15 individuell durch **Fettdruck** gekennzeichnet. Unter den Nachkommen des Kollektivs BD 2 bis 10 wurde der Genotyp C_2C_2 am Enzymgenlocus GOT-C nachgewiesen, der mit dem Samenelternkollektiv kein gemeinsames Allel besitzt und somit dem Kollektiv fehlerhaft zugeordnet wurde. Dem wurde zum einen durch *kursiven Fettdruck* in der Tabelle 3-15 und zum anderen durch die Reduktion der Stichprobe auf 159 als neue Bezugsgröße für die Genflußschätzung Rechnung getragen. Während die Individuen des Kollektivs nur sechs polymorphe Enzymgenloci besitzen, wurde für deren Nachkommen Variation an zwei weiteren nachgewiesen. Es handelt sich dabei um die Enzymgenorte AP-A und IDH-B. Der Genotyp A_1A_2 des Genlocus AP-A ist mit 25 bzw. 43% relativ häufig vertreten. Das Allel A_2 ist in dem Kollektiv nicht vorhanden und kann ausschließlich durch externen Pollen in die Zygotenpopulation gelangt sein. Der Genotyp des potentiellen Pollenelterns ist unbekannt, wobei unter der Annahme, daß dieser im heterozygoten Zustand vorliegt, der ermittelte Wert die untere Grenze des tatsächlichen Genflusses darstellt.

Nicht nur das hohe Ausmaß des Genflusses durch externen Pollen, sondern auch die vorhandenen Unterschiede zwischen den Individuen bedürfen einer weiteren Betrachtung. Da der Pollen durch Insekten transportiert wird, müssen diese für einen effektiven Genfluß zwischen Polleneltern und -empfänger hin- und herfliegen. Sie werden dies umso intensiver durchführen, als die Attraktivität der beiden in Form von Nektar- und Pollenangebot hoch ist. Bereits geringfügige individuelle Unterschiede in der Zahl rezeptiver Blüten können also zu einem differenziellen Insektenbesuch zwischen den Individuen führen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in der unterschiedlichen Kompatibilitätseigenschaft von Pollen- und Sameneltern begründet. Die beiden Sameneltern sind untereinander vollständig kompatibel und besitzen somit zusammen vier S -Allele. Besitzt ein potentieller Polleneltern eines der vier S -Allele und ein zusätzliches, das nicht mit den vier übereinstimmt, liegt Semikompatibilität zu einem der beiden Sameneltern vor. Bei gleichen Pollentransportraten zu beiden Sameneltern würde im Fall der Semikompatibilität jedoch nur die Hälfte der transportierten Pollen effektiv werden. Im Vergleich zum Genlocus AP-A sind die relativen Anteile der Heterozygoten unter den Nachkommen am Genort IDH-B mit 10 bzw. ca. 3% geringer. Dabei kehren sich die Verhältnisse des jeweils höheren Eintrags von effektivem externen Pollen unter den Nachkommen der beiden Sameneltern um, was auf mindestens zwei externe potentielle Polleneltern schließen läßt.

Genfluß- und Inkompatibilitätssystem lassen sich also nicht unabhängig voneinander betrachten, da Genfluß nur zwischen kompatiblen Individuen stattfinden kann und die Befruchtung eines Individuums durch Eigenpollen im Falle der Selbstinkompatibilität ausgeschlossen ist. Unter diesem Aspekt lassen sich weitere externe Pollenbeiträge in dem untersuchten Kollektiv identifizieren. Haben wir eben den Fall betrachtet, daß der untersuchte Genlocus sich für beide Sameneltern in homozygotem Zustand befindet, sollen im Folgenden alle Genorte analysiert werden, für die einer der beiden Sameneltern he-

terozygot und der andere homozygot ist. Gametophytische Inkompatibilität angenommen, kann der unter den Sameneltern nicht vorhandene Homozygote nur durch externe Pollenbeiträge unter den Nachkommen des heterozygoten Samenelters entstanden sein. Da aber innerhalb des Kollektivs BD 2 bis 10 Selbstbefruchtungen möglich sind, kann an den heterozygoten Genloci des Samenelters unter den gebildeten Zygoten nicht zwischen potentiellen Selbst- und tatsächlichen Fremdbefruchtungen unterschieden werden.

Unter Zuhilfenahme eines weiteren Genlocus im homozygoten Zustand kann der Anteil an Nachkommen bestimmt werden, der an diesem heterozygot ist und somit gesichert aus Fremdbefruchtung stammt. Bei den übrigen könnte demnach sowohl Selbstbefruchtung als auch Fremdbefruchtung vorliegen, was für neun Nachkommen (fast 6%) zutrifft. Der beobachtete Anteil des unter den Sameneltern nicht vorhandenen Homozygoten stellt die untere Grenze des tatsächlichen, durch externen Pollen verursachten Genflusses dar, wie auch in Tabelle 3-16 angegeben. Externer Pollen kann in gleichem Maße auch das andere der beiden Allele befruchtet haben. Dies bleibt jedoch unentdeckt.

Tab. 3-16: Relativer Anteil von aus externen Pollenbeiträgen entstandener Nachkommen einer isolierten Population als untere Grenzen des tatsächlichen Genflusses

Enzymsystem	Sameneltern		Vorkommen
	BD 2 bis 10 (<i>N</i> = 159)	BD 11 (<i>N</i> = 160)	<i>Weende</i> (<i>N</i> = 319)
AP-A	0,252	0,431	0,342
IDH-B	0,101	0,025	0,063
GOT-C		0,138	0,069
ACO-B	0,050		0,025
6PGDH-A	0,050		0,025
PGI-B	0,006		0,003
Multilocus	0,365	0,525	0,445

Die Tabelle 3-16 leitet sich aus der vorhergehenden ab und listet ausschließlich die Enzymgenorte auf, an denen externe Pollenbeiträge eindeutig nachgewiesen werden konnten. In der letzten Spalte sind die Mittelwerte für das gesamte Vorkommen *Weende* aufgelistet. Die beiden ersten Ergebniszeilen von AP-A und IDH-B wurden für die beiden Sameneltern bereits in vorangehenden Text eingehend besprochen. Für das Kollektiv ergeben sich Genflußraten von 34% bei AP-A und von 6% bei IDH-B. Für den Sameneltern BD 11 wurden am Genlocus GOT-C zusätzlich an fast 14% Nachkommen populationsexterne Pollenbeiträge identifiziert. Das ist mehr als doppelt soviel, wie an jedem der beiden Genloci ACO-B bzw. 6PGDH-A des anderen Samenelters, für den an einem weiteren heterozygoten Enzymgenort PGI-B nur ein Anteil von weniger als 1% aller Nachkommen populationfremde Pollenbeiträge gesichert enthalten. Vergleicht man die Genloci un-

tereinander, so zeichnet sich einerseits eine nicht unerhebliche Streuung der Einzelwerte deutlich ab und andererseits repräsentiert keiner der Loci die über alle Loci festgestellten Verhältnisse auch nur näherungsweise. Die hier aufgelistete Multilocus-Betrachtung addiert alle Nachkommen, deren Pollenbeiträge wenigstens an einem Genlocus als populationsextern identifiziert wurden, und relativiert deren Anteil bezogen auf die untersuchte Nachkommenschaft eines Samenelters. Die unteren Grenzen des nachgewiesenen, durch externen Pollen vermittelten, Genflusses betragen für das Sameneltekollektiv BD 2 bis 10 mindestens 36% und für den Einzelbaum BD 11 wenigstens 52%, was angesichts der isolierten Lage der Population mehr als bemerkenswert ist. 44.5% stellen die untere Grenze des gesamten beobachtbaren Genflusses. Genfluß insektenbestäubter Arten findet somit über durchaus größere Entfernungen und in erheblichem Umfang statt.

3.4 Bestandesstruktur und Phänologie in Abteilung 1 a_1

Zur Einschätzung der Bestandesstruktur und der Phänologie wurden Daten in Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke erhoben. Im Mittel aller Vogelkirschen ergab sich ein Brusthöhendurchmesser von 27,2 cm. Nur eine Vogelkirsche (Nr. 66, Randbaum) findet sich in der KRAFT'schen Klasse 1. Die Mehrzahl (N=72) aller Vogelkirschen ist mitherrschend (KRAFT'sche Klasse 2). Weitere 11 Individuen besitzen eingeklemmte Kronen und wurden in die KRAFT'sche Klasse 3 eingeordnet. Nur vier, das sind die Nummern 6, 13, 28 und 68, werden von ihren Nachbarbäumen stark unterdrückt.

3.4.1 Verteilung der Vogelkirsche im Vorkommen Wibbecke

In Abbildung 3-7 ist die Verteilung der Vogelkirschen in der Abteilung 1 a_1 und dem südlich angrenzenden Feldgehölz angegeben.

Die Vogelkirschen sind nicht gleichmäßig über die Fläche verteilt, sondern konzentrieren sich in zwei Streifen unterschiedlicher räumlicher Tiefe. Der eine Streifen von ca. 50 Metern Breite zieht sich entlang des östlichen Randes des Mischbestandes. Der zweite mit einer Tiefe von etwa 150 Metern verläuft in einem Abstand von 50 Metern entlang des südlichen Randes des Gesamtbestandes. Innerhalb der Streifen finden sich sowohl Einzelbäume als auch Baumgruppen. Eine geringe Anzahl von Randbäumen ist ausschließlich am Ostrand vorhanden (Nr. 51 bis 56, 61, 66, 75, 185).

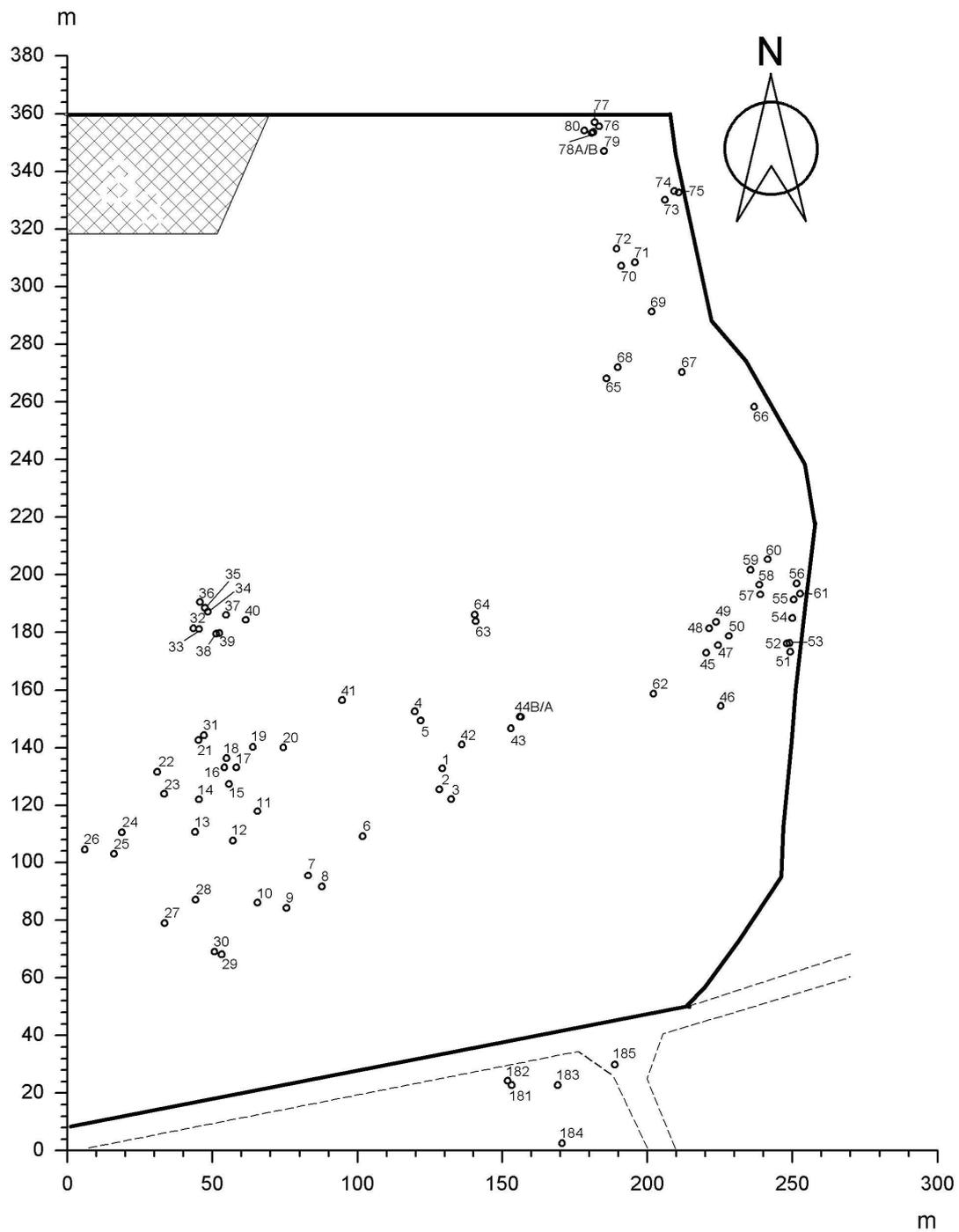


Abb. 3-7: Verteilung und Numerierung der 87 Vogelkirschen im Vorkommen *Wibecke*

3.4.2 Verteilung der Phänologie

3.4.2.1 Blühverlauf

Der Blühverlauf des Bestandes ist in Tabelle 3-17 in absoluten Häufigkeiten wiedergegeben.

Tab. 3-17: Verteilung der Blühstärke im Vorkommen *Wibbecke* an fünf Boniturtagen

Blühstärke	Datum				
	10. April	18. April	22. April	2. Mai	7. Mai
0	86	67	49	4	16
1		13	23	27	
2			7	9	19
3		6	7	42	12
4				4	39

Am 10. April waren die Blüten sämtlicher Vogelkirschen (N=86) noch geschlossen. Die beginnende Blüte der Vogelkirsche wurde am 18. April festgestellt. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt haben sechs Vogelkirschen ihre volle Blüte entfaltet. Bei 13 weiteren ist die Blüte erst in ihrem Anfangsstadium. 4 Tage später hat sich der Anteil blühender Kirschen verdoppelt. Davon befindet sich die Mehrzahl der blühenden Kirschen (N=23) am Beginn der Blüte, während für die übrigen zu gleichen Teilen (N=7) bereits mittlere Blühtätigkeit bzw. Vollblüte verzeichnet wurde. Ihren Höhepunkt erreichte die Blüte am 2. Mai, an dem etwa die Hälfte aller Vogelkirschen in voller Blüte stand und nur vier Bäume an der Blüte nicht beteiligt waren. Die Bonitur vom 7. Mai dokumentiert die ausklingende Blüte von 39 Vogelkirschen. Zu gleicher Zeit sind noch 30 Bäume in mittlerer bzw. voller Blüte. Die Verteilung der blühenden Vogelkirschen und deren bonitierte Blühintensität sind in der folgenden Abbildung 3-8 für vier Boniturtage räumlich dargestellt.

Beginnend oben links in der Abb. 3-8 ist die Verteilung der Blühstärke am 18. April dargestellt. Am südöstlichen Rand des Vorkommens haben einige Vogelkirschen schon ihre volle Blütenpracht (Blühstärke 3) entfaltet, während an den übrigen Rändern wie auch im vorgelagerten Feldgehölz einzelne erst mit der Blüte beginnen (Blühstärke 1). Insgesamt nehmen nur wenige Individuen am reproduktiven Geschehen teil.

Am 22. April hat sich die Entfaltung der Kirschenblüten vom Südrand weiter in das Bestandesinnere verlagert (oben rechts in Abb. 3-8). Der Anteil von Kirschen in voller Blüte (Blühstärke 3) hat sich jedoch kaum verändert. Dagegen zeigen einige eine Zunahme in ihrer Blühintensität (Blühstärke 2) und bei weiteren setzt die Blüte ein (Blühstärke 1). Weniger als ein Drittel der Individuen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in Blüte.

Mit etwa der Hälfte aller Individuen erreicht die Vollblüte (Blühstärke 3) am 2. Mai ihren Höhepunkt, wie unten links in Abbildung 3-8 dargestellt. Diese lassen zu Gruppen zusammenfassen, von denen die größte im südwestlichen Teil des Vorkommens angesiedelt

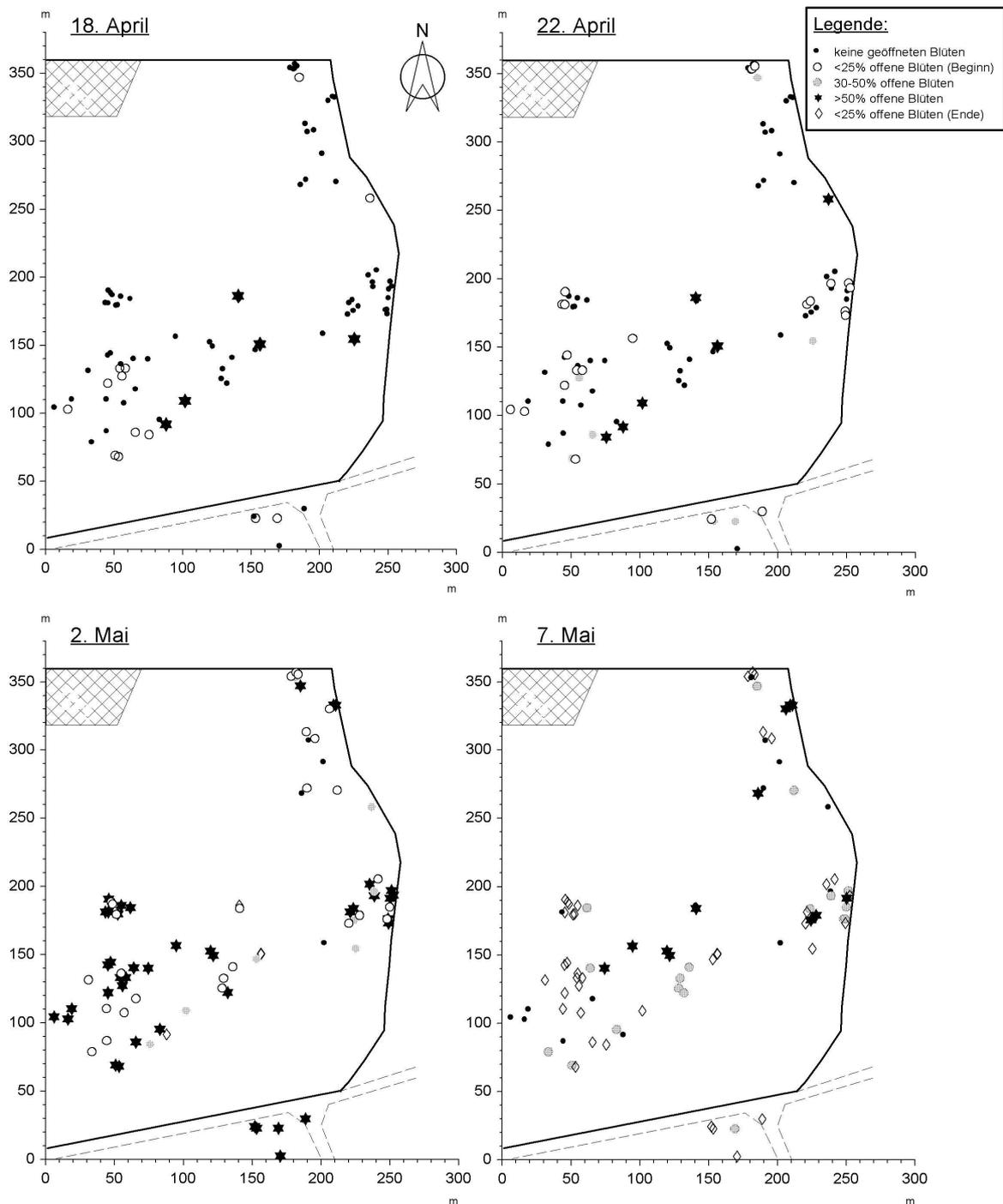


Abb. 3-8: Blühverteilung und -stärke im Vorkommen *Wibbecke* am 18. und 22. April sowie am 2. und 7. Mai

ist. Im Feldgehölz sind alle Kirschen in voller Blütenpracht, während sich über den ganzen Bestand Kirschen mit beginnender (Blühstärke 1) bzw. mittlerer Blüte (Blühstärke 2) verteilen. Bei sehr wenigen Kirschen klingt die Blüte bereits ab (Blühstärke 4).

Das Bestandesübersicht unten rechts in Abbildung 3-8 spiegelt den Ausklang der Blüte wider, wie er am 7. Mai bonitiert wurde. Die überwiegende Zahl aller Vogelkirschen – zuvor noch in voller Blütenpracht – befindet sich jetzt in dieser Phase (Blühstärke 4).

Zu diesem Zeitpunkt ist dennoch ein erheblicher Anteil von Individuen vorhanden, die den Höhepunkt ihrer individuellen Blütenentfaltung noch nicht überschritten haben und eine mittlere (Blühstärke 2) bis volle Blüte (Blühstärke 3) zeigen.

3.4.2.2 Blattmorphologie

Tabelle 3-18 listet die absoluten Häufigkeiten der im Vorkommen *Wibbecke* beobachteten herbstlichen Blattfarben auf.

Tab. 3-18: Absolute Häufigkeiten unterschiedlicher Herbstblattfarben bei der Vogelkirsche im Vorkommen *Wibbecke*

Boniturnote	Blattfarbe	Anzahl Individuen
10	grün	2
20	gelb	2
30	rot	2
12	grün-gelb	22
13	grün-rot	8
23	gelb-rot	50

Von den monochromen Blattfarben (grün, gelb bzw. rot) sind jeweils nur 2 Individuen vorhanden. Das Gros der Individuen zeigt Blätter mit der Mischfarbe **gelb-rot**. Die Mischfarben grün-gelb und grün-rot treten unter den Individuen zu ungleichen Anteilen auf. Bäume mit grün-gelben Blättern sind mehr als doppelt so häufig wie solche mit grün-roten.

Die Verteilung der sechs bonitierten Herbstblattfarben der Vogelkirsche im Vorkommen *Wibbecke* ist in Abbildung 3-9 dargestellt.

Die Vogelkirschen mit **gelb-roter** Herbstfärbung dominieren den Bestand; sie sind aber keineswegs gleichmäßig über den Bestand verteilt. Deutliche Schwerpunkte liegen im Norden, Osten und Westen des Vorkommens. Im Zentrum überwiegt die Blattfarbe grün-gelb, während im südwestlichen Zipfel grün-rot verstärkt vertreten ist. Die vier der Vertreter der monochromen Farben befinden sich ebenfalls am Südwestrand des Vorkommens. Im Norden und Westen sind die beiden anderen zu lokalisieren.

Sowohl die Blühphänologie als auch die Herbstlaubfärbung stimmt in Teilbereichen mit der nach genetischen Kriterien differenzierten Klonverteilung überein. In anderen Fällen kommen diese zu entgegengesetzten Aussagen bezüglich der möglichen Klonzugehörigkeit.

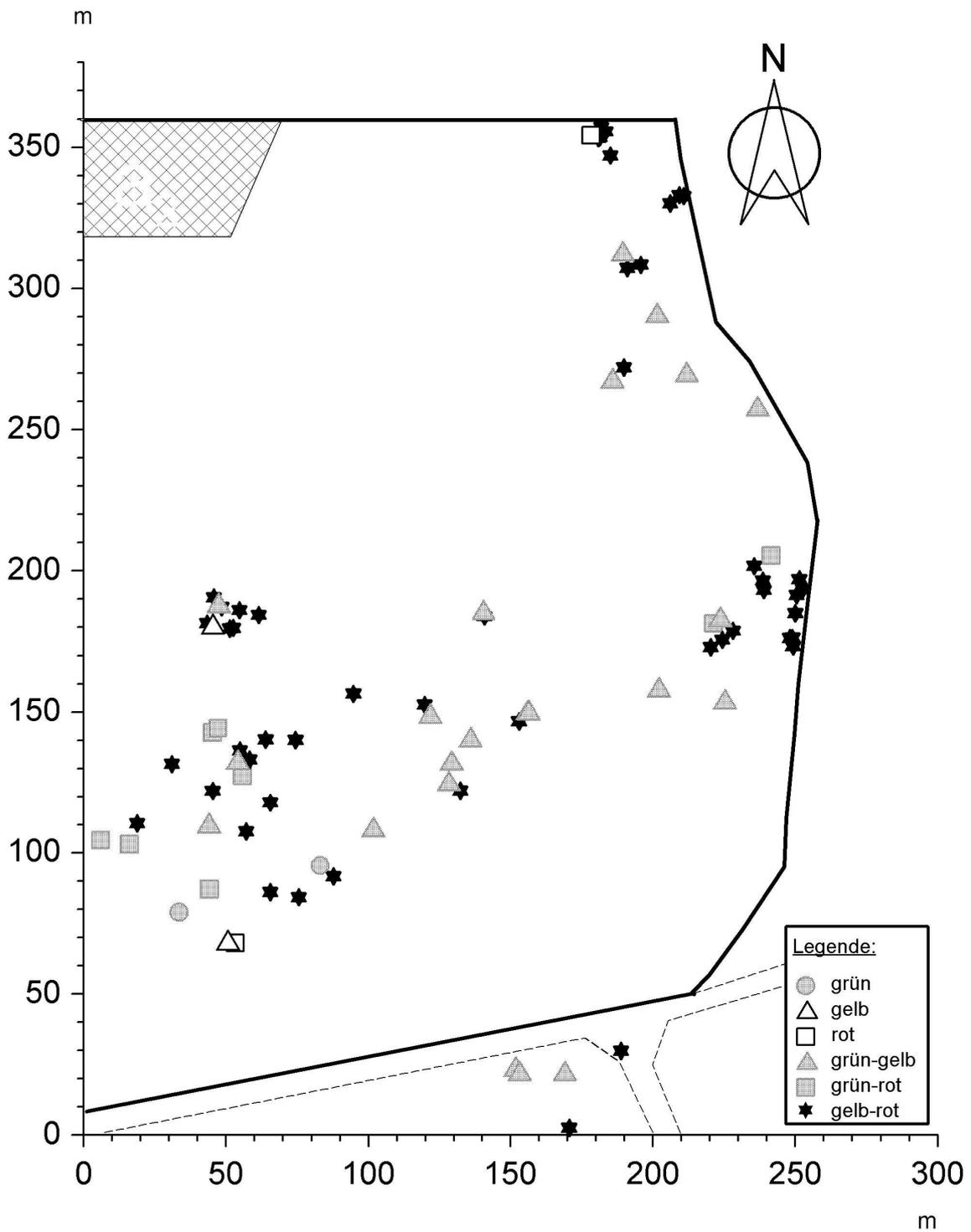


Abb. 3-9: Verteilung individuellen Herbstblatffärbung bei der Vogelkirsche im Vorkommen *Wibbecke* am 16. Oktober

Sollte die Umwelt in dem Mischbestand einigermaßen ähnlich sein, könnte man die Phänologie als Ausdruck der genetischen Variation interpretieren. Andererseits würden sich genetisch identische Kirschen in ihrer Phänologie kaum unterscheiden. Ein direkter Vergleich der einzelnen Blühbonitur mit den klonalen Strukturen, die mittels genetischer Marker beschrieben werden, ist prinzipiell möglich. Dieser würde jedoch nur sehr punktuell für alle zu diesem Zeitpunkt an der Blüte beteiligten Individuen gelten. Um eine möglichst große Anzahl blühender Kirschen zu berücksichtigen, bietet sich einerseits die Bonitur der Hauptblüte vom 2. Mai, andererseits eine summarische Betrachtung über den gesamten Boniturzeitraum an.

In Abbildung 3-10a ist die Verteilung der Blühstärke vom 2. Mai mit den mit Hilfe von Genmarkern identifizierten klonalen Strukturen der Vogelkirsche unterlegt.

Zu diesem Zeitpunkt sind alle fünf Boniturstufen im Bestand vertreten und zeigen somit das weitestmögliche Spektrum der Blühintensität bei der Vogelkirsche. Abweichungen um eine Stufe innerhalb von Klongruppen erscheinen mehr die kleinräumigen als die Identitätsunterschiede zwischen den Individuen widerzuspiegeln. Dennoch treten in einigen dieser Gruppen erheblichere Unterschiede (um mehr als eine Stufe) auf, die teilweise auch genetischen Ursprungs sein könnten. Da sich die überwiegende Zahl aller Kirschen in der Vollblüte befindet, sind potentielle Unterschiede zwischen diesen schwer auszumachen. Diese könnten sich hinsichtlich der individuellen Blühdauer ergeben.

Daher wurden die individuellen Boniturnoten aufsummiert. Mit der genetisch identifizierten Klonstruktur unterlegt, ergibt sich das Schaubild (Abb. 3-10b).

In Abbildung 3-10a waren einige Unterschiede der individuellen Blühintensität in den einzelnen Klongruppen nicht erkennbar. Diese treten bei der Summenbildung deutlicher hervor. Innerhalb der verschiedenen Klongruppen existieren somit Individuen mit einer unterschiedlichen Blühstärke und -dauer. Dies könnte ein Hinweis auf bisher nicht nachgewiesene genetische Unterschiede oder auf stark differenzierte mikroklimatische Einflüsse sein. Die gleichen Merkmale stützen in anderen Klongruppen die Hypothese genetischer Identität, sogar über Entfernungen von über 100 Metern. Aussagen zur Klonzugehörigkeit ausschließlich anhand der eingeschätzten individuellen Blühintensität und -dauer erscheinen wegen der wenigen Boniturstufen kaum möglich. Die Blühphänologie läßt sich jedoch nutzen, um die reproduktiven Zusammenhänge innerhalb von Vogelkirschenvorkommen besser zu verstehen.

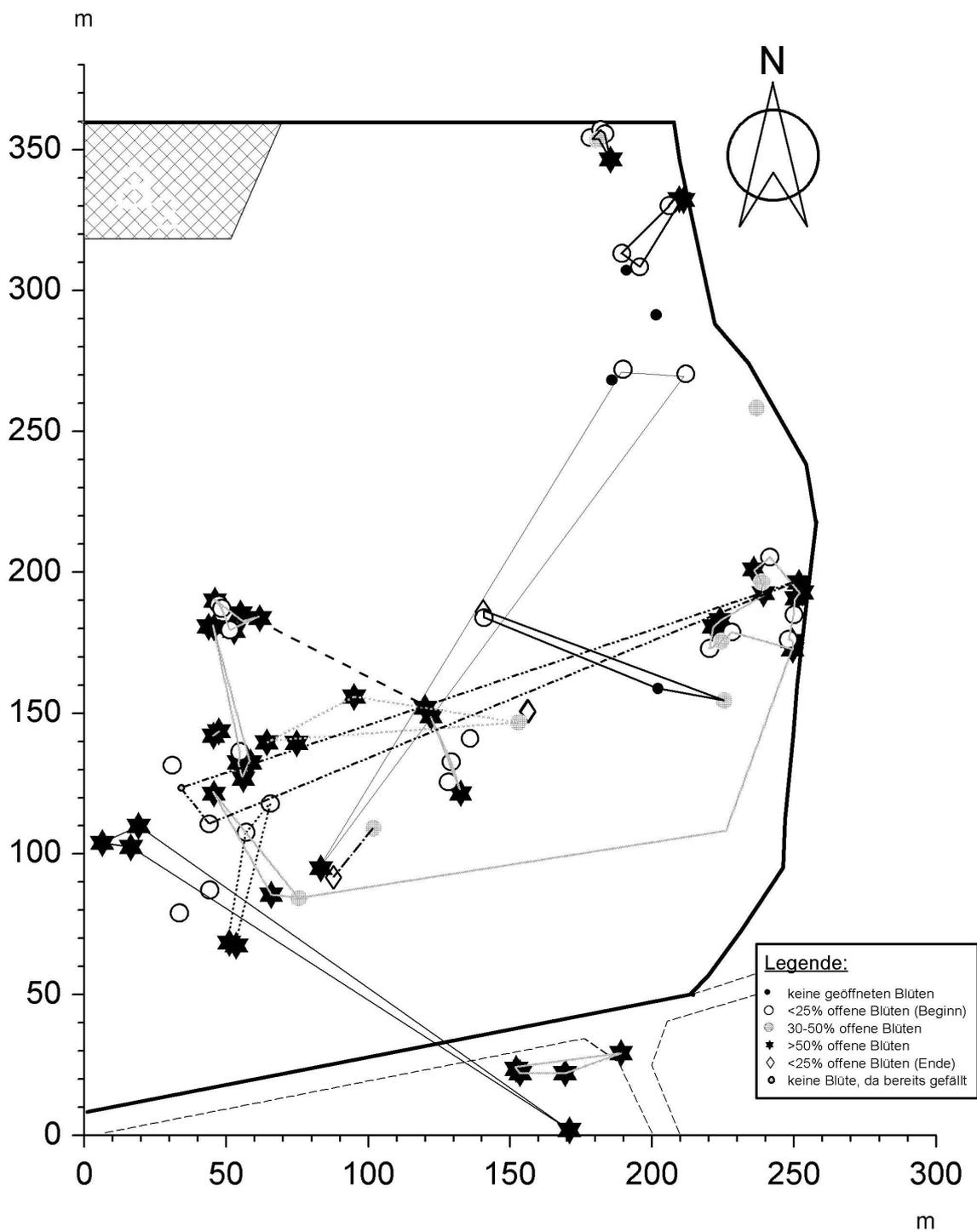


Abb. 3-10a: Verteilung der individuellen Blühstärke am 2. Mai, unterlegt mit den genetisch identifizierten Klonstrukturen im Vorkommen *Wibbecke*

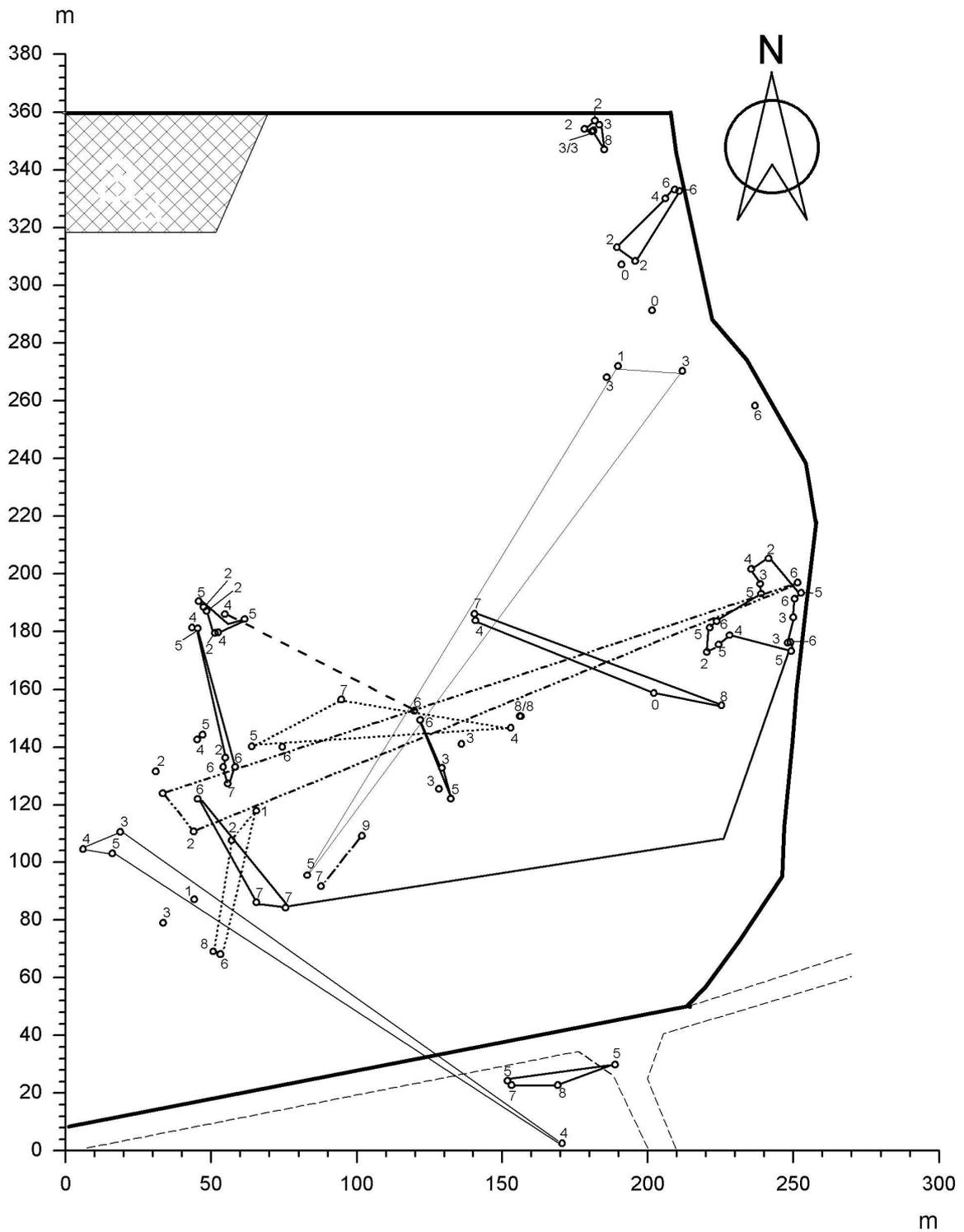


Abb. 3-10b: Verteilung der summarischen Blühstärke, unterlegt mit den genetisch identifizierten Klonstrukturen im Vorkommen *Wibbecke*

3.5 Samenmorphologie der Vogelkirsche

Die Ergebnisse der Wägungen und Messungen an je 50 Samen von 36 Einzelbäumen sind in Tabelle 3-19 wiedergegeben.

Tab. 3-19: Samengewichte und mittlere Samengröße von 36 Vogelkirschen aus vier Populationen

Vorkommen	Baum	Samen- gewicht g/50 Samen	Samengröße im Durchschnitt		
			Länge in mm	Breite in mm	Höhe in mm
Hüttners Hochzucht	1	7,02	7,262	6,652	5,648
	2	6,67	7,098	6,578	5,558
	3	6,92	7,282	6,608	5,608
	4	6,78	7,194	6,604	5,600
Göttingen-Weende	BD 2	7,89	7,970	6,976	5,680
	BD 3	9,16	8,300	7,312	5,934
	BD 4	9,97	8,278	7,469	6,020
	BD 5	9,22	8,028	7,400	5,996
	BD 6	8,55	7,730	7,294	5,920
	BD 7	9,05	7,896	7,362	5,976
	BD 8	9,36	7,692	7,238	5,880
	BD 9	8,43	7,762	7,254	5,890
	BD 10	8,60	7,886	7,272	5,892
	BD 11	10,60	9,062	7,645	6,040
Göttingen-Geismar	AS 1	7,74	8,918	6,928	5,726
	BB 1	10,46	8,956	7,756	6,114
	BB 2	9,72	8,568	7,658	6,394
	EIS 1	9,70	9,214	7,642	5,896
	WB 1	11,22	8,690	7,998	6,664
	WB 2	8,14	8,336	6,940	5,554
	WB 3	10,56	8,754	7,820	6,490
	WB 4	8,18	8,382	7,026	5,740
Süddeutschland	1	13,45	10,446	8,694	6,978
	2	14,00	10,646	8,884	7,184
	3	13,73	10,622	8,910	7,208
	4	13,37	10,470	8,766	7,114
	5	13,78	10,550	8,746	6,980
	6	13,74	10,618	8,820	7,058
	7	13,98	10,698	8,824	7,082
	8	13,82	10,582	8,742	7,014
	9	14,16	10,698	8,870	7,124
	10	14,16	10,710	8,920	7,220
	11	13,41	10,490	8,642	6,930
	12	13,62	10,596	8,746	7,026
	13	13,78	10,682	8,796	7,042
	14	13,99	10,536	8,848	7,138

Das Saatgut stammt von einzeln beernteten Vogelkirschen aus vier Populationen, von denen zwei, *Weende* und *Geismar*, das Gesamtvorkommen *Göttingen* in Tabelle

repräsentieren. Die erhobenen Parameter der Samengröße sind als Durchschnittswerte angegeben. Die Streuung der Einzelwerte wurde auf Normalverteilung getestet. Die Normalverteilungshypothese wurde durch die Teststatistik in keinem Fall abgelehnt. Die dargestellten Mittelwerte repräsentieren somit das Saatgut des jeweiligen Einzelbaums gut. Die erfaßten Parameter der Samengröße variieren innerhalb eines jeden Vorkommens unterschiedlich stark. Die Länge streut dabei ähnlich stark wie das Gewicht, während die Breite deutlich geringer und die Höhe am geringsten variiert. Beim Vergleich der Samengewichte in den verschiedenen Populationen ist auffällig, daß diese innerhalb der Vorkommen *Hüttners Hochzucht* und *Süddeutschland* kaum variieren. Der Unterschied zwischen dem geringsten und dem höchsten Wert innerhalb der beiden Vorkommen beträgt weniger als 0,5g/50 Samen bzw. 1 g/50 Samen. Demgegenüber sind in den Vorkommen *Weende* und *Geismar* deutlichere individuelle Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Kirschen zu beobachten. Die größte Differenz der Samengewichte beträgt für das Gesamtvorkommen *Göttingen* fast 3,5 g/50 Samen. Entsprechendes gilt für die Variation der mittleren Samenlänge, -breite und -höhe innerhalb der Einzelvorkommen, da Samengewicht und mittlere Samengröße nicht unabhängig voneinander variieren. So zeichnen sich hohe Samengewichte durch entsprechend hohe Einzelwerte bei der Samengröße aus. Lassen sich innerhalb der Vorkommen nur geringe Unterschiede im Gewicht finden, so variieren die Werte zwischen den Vorkommen erheblich, was in Tabelle 3-20 ausführlicher verglichen wird.

In der folgenden Tabelle 3-20 sind die in Saatgutmischproben verschiedener Vorkommen ermittelten Samengewichte und Mittelwerte der Samengröße zusammengestellt.

Die Werte der Vorkommen *Göttingen*, *Hüttners Hochzucht* und *Süddeutschland* wurden aus den Einzelbaumdaten in Tabelle 3-19 ermittelt. Als Ergebnis der Samenwägungen ist festzuhalten, daß die Differenz zwischen der leichtesten und der schwersten Saatgutpartie mehr als das Doppelte beträgt. Für eine Baumschule bedeutet dies, daß bei gleicher Saatgutmenge der einzelnen Saatgutpartien bei Vorliegen gleicher Keimungsraten sehr unterschiedliche Pflanzanzahlen angezogen werden können.

Die Samengröße der einzelnen Vorkommen variiert in absoluten Werten bezüglich der Samenlänge, -breite und -höhe sehr. Zwar scheinen bei rein subjektiver Betrachtung der einzelne Samenpartien, diese aus mehr rundlichen bzw. länglichen Samen zu bestehen. Auf der Basis der Mittelwerte ergeben sich über alle Vorkommen hinweg jedoch ziemlich einheitliche Beziehungen zwischen Länge, Breite und Höhe, so daß im Mittel die Längen das 1,4fache und die Breiten das 1,2fache der Höhen betragen.

Eine Identifikation von Saatgutpartien anhand der Samengröße wird wegen der Streuung der Einzelwerte nicht möglich sein, obwohl die Samen der Einzelbäume innerhalb der Partien deutlich geringere Schwankungen hinsichtlich ihrer Größe aufweisen, als dies zwischen diesen der Fall ist. Betrachtet man ausschließlich das Saatgut der Samenplantage Liliental sowie ihrer Klonkopie in Neuhemsbach, fällt auf, daß sowohl zwischen den beiden Standorten als auch zwischen den beiden Jahren sehr geringe Schwankungen hinsichtlich Samengewicht und -größe zu verzeichnen sind. Der Samenhandel trägt schon seit langem den Größen- und letztendlich den Gewichtsunterschieden des Kirschensaatguts - auch

unter dem Gesichtspunkt einer Verunreinigung durch im Vergleich deutlich großkernige Kulturkirschensamen - Rechnung und bietet besonders kleinkerniges Saatgut, z. B. aus dem Odenwald, getrennt an (EISELE pers. Mitt.).

Tab. 3-20: Samengewichte und mittlere Samengröße von 16 Vogelkirschenvorkommen

Vorkommen	Samen- gewicht g/50 Samen	Samengröße im Durchschnitt		
		Länge in mm	Breite in mm	Höhe in mm
Hüttners Hochzucht*	6,85	7,209	6,611	5,604
Fürstenberg	7,84	7,946	6,760	5,690
Westerwinkel	7,93	7,816	7,046	5,692
Aschaffenburg	8,08	8,198	6,858	5,586
Zweibrücken	8,86	8,112	7,254	5,796
Thiergarten	9,06	8,294	7,136	5,776
Hadamar	9,10	8,272	7,118	5,832
Göttingen**	9,36	8,390	7,405	5,985
Odenwald-Spessart	9,57	8,392	7,634	6,122
Obermosel	9,89	8,508	7,500	6,142
Liliental 1996	10,43	8,932	7,610	6,154
Neuhemsbach	10,62	8,798	7,430	5,984
Liliental 1997	10,66	9,142	7,542	5,962
Schlüchtern	11,38	9,156	7,986	6,222
Süddeutschland***	13,79	10,583	8,801	7,167
Lebenau	14,64	10,200	9,178	7,376

*: 4 Bäume/200 Samen

** : 18 Bäume/900 Samen

***: 14 Bäume/700 Samen

4. Diskussion

4.1 Mechanismen der asexuellen und sexuellen Reproduktion

Der wesentliche Vorteil der sexuellen Reproduktion gegenüber der asexuellen gründet in der Rekombination der vererbten Unterschiede (FISHER 1930, MULLER 1932 zitiert nach WHITEHOUSE 1950). Sexuell reproduzierende Arten besitzen unter dem Einfluß natürlicher Selektion den Vorteil eines schnelleren Responses, was evolutionäre Vorteile impliziert (WHITEHOUSE 1950). Um die Vorteile der Rekombination umsetzen zu können, ist ein möglichst hoher Anteil an Fremdbefruchtung, besser noch vollständige Fremdbefruchtung, eine notwendige Voraussetzung. Erreicht werden kann dies durch ein Paarungssystem, das Selbstpaarungen verhindert und Fremdpaarungen fördert. Demgegenüber böte Selbstfruchtbarkeit den Vorteil, gänzlich ohne andere Individuen sexuell reproduzieren zu können (WHITEHOUSE 1950). Vorwiegend selbstbefruchtende Pflanzen zeichnen sich jedoch durch ein hohen Grad an Homozygotie an vielen Genloci aus. Fixierung auf möglicherweise nur eine genetische Variante ist gleichbedeutend mit dem Verlust genetischer Variation und dem damit meist verbundenen Anpassungspotential der Art. Ausschließlich fremdbefruchtende Arten dürften daher ein hohes Maß an Anpassungsfähigkeit besitzen.

4.1.1 Bedeutung der gametophytischen Inkompatibilität

Um Selbstpaarung zu verhindern, haben sich vorwiegend jedoch bei den Angiospermen unterschiedliche Inkompatibilitätssysteme herausgebildet. Da für die systematische Unterteilung der Inkompatibilitätsreaktionen sehr unterschiedliche Kriterien herangezogen werden können, ist eine universelle Gliederung nicht zu erwarten. Diverse Autoren (LEWIS 1944, MATHER 1944, BATEMAN 1952, DE NETTANCOURT 1977, u. a. m.) teilen ihre Vorstellungen einer Systematik der Inkompatibilitätssysteme mit. Ein wesentliches Merkmal stellt aus genetischer Sicht die genetische Kontrolle der Pollenkeimung bzw. deren Hemmung dar. Die klassische Unterscheidung zwischen gametophytischen und sporophytischen Inkompatibilitätssystemen beschreibt die Pollenspezifität zu einer Narbe. Während bei sporophytischen System Wechselwirkungen zwischen dem diploiden Pollenspender und der bestäubten Pflanze über die Pollenkeimung entscheiden, treten beim gametophytischen Interferenzen zwischen dem haploiden männlichen Gametophyten (Pollenschlauch) und dem Griffel der bestäubten Pflanze auf.

Inkompatibilitätssysteme bei Pflanzen verhindern Selbstbefruchtung und Paarung zwischen Individuen mit gleichem *S*-Genotyp (DE NETTANCOURT 1977). Deshalb erregten Inkompatibilitätssysteme bei Pflanzen bereits in den Anfängen das Interesse der theoretischen Populationsgenetik, wie die Arbeiten von WRIGHT (1939) zur Verteilung von *S*-Allelen in Populationen und BATEMAN (1947) zur Anzahl der *S*-Allele in einer Population belegen. Trotz intensiver Befassung mit der Thematik, u. a. durch NAGY-LAKI (1975), konnte die Frage nach einer globalen Attraktivität der uniformen Gleichgewichtsstruktur am gametophytisch exprimierten *S*-Genlocus erst etwa zeitgleich von BOUCHER (1993) und STEINER & GREGORIUS (1994, 1995) eindeutig beantwortet werden. Dieses Ergebnis sowie seine Folgeergebnisse erlauben vielfältige Anwendungen

in der populationsgenetischen Analyse. STEINER (1992) entwickelte eine Klassifikation der Inkompatibilitätssysteme bei Pflanzen nach populationsgenetischen Gesichtspunkten. Einige neuere Arbeiten zur Populationsgenetik der Inkompatibilität beschäftigen sich beispielsweise mit der Anzahl von *S*-Allelen in endlichen Subpopulationen (SCHIERUP 1998), der Evolution des gametophytischen Inkompatibilitätssystems (STEINBACHS & HOLSINGER 1999) oder weisen komplexere Formen der Inkompatibilität bei der Roterle und der Grauerle (STEINER & GREGORIUS 1999) nach.

Die gametophytische Inkompatibilität der Rosaceen zeichnet sich durch eine Vielzahl von verschiedenen Allelen an einem Inkompatibilitätslocus aus. WRIGHT (1939) und WHITEHOUSE (1950) weisen darauf hin, daß die gametophytische Inkompatibilität das am weitesten verbreitete System bei homostylen Blütenpflanzen ist und für den Erhalt seiner Funktionsfähigkeit im Minimum drei funktionsverschiedene *S*-Allele benötigt. Hierbei ist weniger die allelische Struktur am *S*-Genlocus, sondern vielmehr die vollständige Realisation aller potentiellen *S*-Genotypen in der Population bedeutend, weil in dem speziellen Fall, daß nur zwei unterschiedliche *S*-Genotypen vorhanden sind, das Ausfallen eines einzigen zur Extinktion der Population führen würde.

Dieser Umstand hat WRIGHT (1964, ebenfalls S. 611) veranlaßt, für eine minimale Anzahl von drei *S*-Allelen den allelischen Gleichgewichtszustand am *S*-Genlocus aus nur zwei *S*-Genotypen S_1S_2, S_1S_3 approximativ zu ermitteln. Bei seiner Darstellung des Übergangs von der Parental- zur ersten Filialgeneration ist eigentümlicherweise effektiver Pollenflug nur in einer Richtung zugelassen, so daß erst in der nächsten Filialgeneration alle drei *S*-Genotypen realisiert werden. Nachdem bei WRIGHT (1964) alle Genotypen etabliert sind, kann er zeigen, daß die Modellpopulation den Gleichgewichtszustand, in dem alle drei *S*-Allele etwa gleich häufig sind, nicht erreicht, auch wenn er dies nicht beweisen konnte. Dies gelingt, wie an anderer Stelle bereits erwähnt, etwa zeitgleich BOUCHER (1993) und STEINER & GREGORIUS (1994, 1995). Für eine im Gleichgewichtszustand befindliche Modellpopulation, in der zudem jeder *S*-Genotyp nur einmal realisiert ist, lassen sich die Kompatibilitätsverhältnisse der Typen zueinander darstellen (s. 3.1, S. 37). Diese Verhältnisse sind zwar idealisiert, aber sie zeigen dennoch, daß die Differenzierung am *S*-Genlocus eine entscheidende Rolle für die realisierbaren Paarungsbeziehungen spielen.

Bei den diploiden Vertretern der Rosaceen, zu denen neben vielen Obstbäumen auch die insektenbestäubte Vogelkirsche zählt, wurden gametophytische Inkompatibilitätssysteme identifiziert. Untersuchungen zum Inkompatibilitätssystem der Kirschen sind ausschließlich an Kulturkirschensorten durchgeführt worden, da dieses im Obstbau eine Bedeutung für den Fruchtansatz und den damit verbundenen Ernteerfolg besitzt. Selbst- und Kreuzungskompatibilität zwischen Süßkirschensorten waren daher bekannt. Erste systematische Untersuchungen, die in der Postulierung eines gametophytischen, multiallelen Inkompatibilitätslocus bei der Süßkirsche mündeten, wurden von CRANE & LAWRENCE (1929) durchgeführt. CRANE & LAWRENCE (1931) konnten durch Kreuzungen zwischen 19 Kultursorten und Beobachtungen des Fruchtansatzes fünf Inkompatibilitätsgruppen bilden und diesen 19 Kultivare zuordnen. KOBEL

et al. (1938) untersuchten das Inkompatibilitätssystem bei schweizerischen Kulturkirschen und kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie CRANE & LAWRENCE (1931) mit einer von diesen abweichenden Numerierung der Allele. Bis heute hat sich die klassischen Untersuchungsmethode, durch Kreuzung der einzelnen Kultursorten deren Zugehörigkeit zu einer der Inkompatibilitätsgruppen zu bestimmen, erhalten. Durch die Beurteilung des Pollenschlauchwachstums bereits 48 Stunden nach der Bestäubung liegen in kürzerer Zeit im Vergleich zur klassischen Methode, bei welcher die Fruchtbildung abgewartet werden muß, Ergebnisse zur Beurteilung der Inkompatibilität des eingesetzten Materials vor (SCHMIDT & TIMMANN 1997; SCHMIDT et al. 1999). Dabei sind in der Obstzüchtung sowohl die klassische als auch die neuere Untersuchungsmethode bis zu endgültigen Feststellung der *S*-Genotypen langwierig und in Abhängigkeit von der Größe des Untersuchungskollektivs sowie seiner stetigen Veränderung arbeitsintensiv und zeitaufwendig. Die Feststellung, ob die Kreuzung zweier Individuen semikompatibel oder vollständig kompatibel ist, ist nur durch die Rückkreuzung der Nachkommen mit ihren Eltern möglich (STEINER 1992). Waren die *S*-Genotypen der Eltern bekannt, lassen sich die Nachkommen entsprechend zuordnen. Anderenfalls sind diese nur aufwendig durch Kreuzung mit Individuen der unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen feststellbar. BOŠKOVIĆ et al. (1997a) und BOŠKOVIĆ & TOBUTT (1996) haben gezeigt, daß sich Kultivare den Inkompatibilitätsgruppen bei der Kulturkirsche durch elektrophoretische Untersuchung von griffelbürtigen S-Ribonukleasen, die den Inkompatibilitätslocus der Kirsche abbilden, laboranalytisch zuordnen lassen. Die Ergebnisse stimmen mit den von SCHMIDT (pers. Mitt.) an Pollenschlauchwachstum bzw. in Kreuzungsversuchen beobachteten Inkompatibilitäten überein.

Molekulargenetische Methoden zur Bestimmung des *S*-Genotyps werden bei der Japanischen Birne bereits praktiziert und stetig verfeinert, wie die Arbeiten von SASSA et al. (1993) und ISHIMIZU et al. (1996, 1998, 1999) zeigen. Bei der Kulturkirsche präsentieren TAO et al. (1999) die DNA-Sequenzen der häufigsten *S*-Allele.

BERGER (1963) berichtet erstmals von Fertilitätsuntersuchungen an der Wildkirsche und führt dazu Testkreuzungen zwischen 10 Individuen durch. Er findet eine inkompatible Kreuzungskombination und schließt folgerichtig auf Identität im Inkompatibilitätsgenotyp. Da er die kompatiblen Kreuzungen nicht nach semi- oder vollständig kompatibel differenzieren kann, stellt er Überlegungen zur minimal und maximal möglichen Anzahl von *S*-Allelen in diesem Kollektiv an. Während er die maximale Anzahl möglicher *S*-Allele korrekt mit $2N$ angibt, irrt er hinsichtlich deren minimaler Anzahl, weil er davon ausgeht, daß dazu alle Individuen ein *S*-Allel gemein haben müßten, was Semikompatibilität aller zueinander bedeuten würde. Die minimale Anzahl von *S*-Allelen wird jedoch nicht von der Kompatibilität zwischen den Individuen, sondern von ihrer Gleichhäufigkeit bestimmt, so daß BERGER (1963) diesen Anteil deutlich überschätzt hat. Bereits WRIGHT (1939) gibt unter definierten Voraussetzungen als untere Grenze für Gruppen, die aus 10 Individuen bestehen, im Mittel 5,3 *S*-Allele an. In einer am *S*-Genlocus genotypisch vollständig differenzierten Modellpopulation sind bei 10 Individuen im Minimum exakt 5 *S*-Allele vorhanden, berechnet nach der Formel

$$\frac{(n_{S_{min}} - 1) \cdot n_{S_{min}}}{2} \text{ (s. 3.1, S. 37)}$$

Bei der Vogelkirsche, die sich durch ein sehr zerstreutes Vorkommen in Mischbeständen sowie durch Konkurrenz der anderen Baumarten vergleichsweise kleinen Baumkronen auszeichnet, ist ein regelmäßiges Fruchten trotz jährlich intensiver Blüte selten. Hierfür kann zum einen ein durch die anderen Mischbaumarten verhinderter Paarungskontakt (Bienenflug) und zum anderen das Inkompatibilitätssystem der Kirschen, das Paarungen zwischen gleichen Inkompatibilitätstypen verhindert, verantwortlich gemacht werden. FRASCARIA et al. (1993) und DUCCI & SANTI (1997) weisen in waldbaulich sowohl behandelten als auch unbehandelten Wäldern Klumpungen identischer Genotypen der Vogelkirsche nach und schließen auf eine überwiegend vegetative Ausbreitung der Vogelkirsche innerhalb der Bestände. Paarungen zwischen benachbarten Individuen aus asexueller Reproduktion, die folglich genetisch identisch sind und somit auch den gleichen Inkompatibilitätstyp besitzen, sind ausgeschlossen. Durch die Überführung von Klonen in Samenplantagen lassen sich zum einen die vorhandenen Paarungsbarrieren beseitigen und zum anderen die Zahl unterschiedlicher Inkompatibilitätstypen innerhalb der Plantagen erhöhen. Für die Erhaltung der Anpassungsfähigkeit ist nicht nur generell die Erhaltung genetischer Variation, sondern auch der Variation am Inkompatibilitätsgenlocus von Bedeutung.

4.1.2 Bedeutung des Genflusses für die effektive Größe einer Population

4.1.2.1 Durch Pollen vermittelter Genfluß

Insekten bewältigen effektiven Pollentransport über größere Distanzen (GRANT 1949). Neben der Bestäuberbiologie einer Art spielen die Blühintensität und -dauer eine bedeutsame Rolle für den reproduktiven Zusammenhalt der Population. Nur Individuen, die kompatibel sind und gleichzeitig blühen, können paaren. Hinzu kommt die bei der Kirsche vorhandene Protogynie, deren direkte Beobachtbarkeit im Freiland nahezu unmöglich ist. Geht man davon aus, daß innerhalb einer Blüte die Rezeptivität der Narbe mit deren Bestäubung beendet ist und sich die Pollensäcke zeitverzögert öffnen, verändert sich das Verhältnis von bestäubbaren Narben und gebildetem Pollen eines Individuums mit fortschreitender Blüte stetig. Für den Pollentransport bedeutet dies, daß Pollen zu Beginn der Blüte überwiegend importiert und erst später auch exportiert werden kann. Anfangs stellen die rezeptiven Narben eine deutliche Senke für ein geringes Pollenangebot dar. Mit Fortschreiten der Blüte egalisieren sich die Verhältnisse, um sich mit ihrem Ausklingen umzukehren. Das reproduktive Hauptgeschehen findet somit während der Vollblüte der Population in Abhängigkeit von der Aktivität der Bestäuberarten statt.

Wie sich die individuelle Attraktivität jeder Vogelkirschen im Tagesgang darstellt, hängt von deren aktuellem Pollen- und Nektarangebot ab. Ändert sich dieses im Tagesverlauf, werden sich daran auch die effektiven Blütenbesuche durch die Insekten orientieren. Insektenflug innerhalb einer Baumkrone führt zur Übertragung überwiegend inkompatibler Pollen, während z. B. Kundschafterflüge von Bienen mehrere unterschiedliche Individuen einer Population ansteuern, um deren aktuelles Pollen- und Nektarangebot zu erkunden. PASCALE & JACOBI (1998) modellieren die Insektenbestäubung bei selbst-

inkompatiblen Pflanzen und haben an *Ludwigia sericea* (*Onagraceae*) beobachtet, daß Bienen in lokal begrenzten Populationen von Blütenpflanzen häufig verschiedene blühende Individuen anfliegen.

Der Anteil befruchteter Blüten eines Einzelbaums des Vorkommens *Geismar* beträgt bei freier Abblüte im Mittel etwa 11%, womit deutlich wird, daß nur ein geringer Anteil der Blüten zur Fruchtbildung gelangt. Es bleibt jedoch offen, ob der überwiegende Rest an Blüten nach Selbstbestäubung oder unbestäubt abgefallen ist.

Unter den befruchteten Blüten ist jener Anteil des effektiv gewordenen Pollens interessant, der als Import in das Kollektiv gelangt ist. Betrachtet man das Vorkommen *Weende* als weitgehend isoliertes Vorkommen, das letztlich aus zwei Individuen besteht, so beträgt die untere Grenze des beobachtbaren, durch Pollen vermittelten, Genflusses 44%. Die individuell festgestellten, durch Pollenimporte verursachten Fremdbefruchtungsraten weichen davon um 8% nach oben und unten ab. GOODELL et al. (1997) geben den Genfluß für den insektenbestäubten, selbstinkompatiblen *Raphanus sativus* differenziert nach der Populationsgröße an. Für Gruppen aus nur zwei Individuen wird die größte Genflußrate von $46\% \pm 5\%$ effektivem Externpollen geschätzt, während diese mit zunehmender Individuenzahl deutlich abnimmt. Dieses Ergebnis kann mehrere Ursachen haben. Zum einen erhöht sich mit der Individuenzahl der Pollenflug innerhalb der Kollektive und zum anderen erreichen prozentual weniger externe Pollen die Population. Mit zunehmender Populationsgröße etablieren sich immer mehr genetische Varianten, die die Unterscheidung von internem und externem Pollen erschweren. Damit einher geht die abnehmende Schätzgenauigkeit für den effektiven Genfluß.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen weist GRANGER (1996a) den über drei Reproduktionsperioden gemittelten Genfluß effektiver, externer Pollen am einzigen homozygoten Enzymgenlocus SKDH der selbstfertilen Sorte *Stella* mit nahezu 50% aus. Darüber hinaus schätzt er den Anteil der Selbstbefruchtungen mit 29%, was dem fast Fünffachen des in dieser Arbeit ermittelten Umfangs entspricht. Die Schätzung von GRANGER (1996a) beruht auf der stark vereinfachenden Annahme, daß ein potentieller Hauptbestäuber, der sich nur durch seine synchrone Blüte mit *Stella* qualifiziert, am Enzymgenlocus 6PGDH homozygot ist und der komplementäre Homozygote nur aus Selbstbefruchtung stammen kann. Die Pflanzreihe von *Stella* befindet sich jedoch nach den eigenen Angaben von GRANGER (1996a) zwischen den Sorten *Sam* und *Venus*, so daß sich tatsächlich mindestens zwei verschiedene Bestäubersorten in der unmittelbaren Nachbarschaft von *Stella* befinden. Darüber hinaus sind in der Plantage noch weitere potentielle Bestäubersorten vorhanden, die das fragliche Allel am Enzymgenlocus 6PGDH ebenfalls besitzen. Daher darf die angegebene Höhe der von GRANGER (1996a) festgestellten Selbstbefruchtungsrate angezweifelt werden.

4.1.2.2 *Samenmorphologie und -verbreitung der Vogelkirsche*

Die Samenmorphologie wurde zunächst an Samen einzelner Bäume erhoben. Die auffallende Ähnlichkeit der Samengewichte und -größe innerhalb der Vorkommen *Hüttners Hochzucht* und *Süddeutschland* legen den Verdacht nahe, daß es sich hierbei möglicherweise um Saatgut von genetisch identischen Vogelkirschen, z. B. aus asexueller Reproduktion

tion, handelt. Trifft diese Annahme zu, würde jeder Baum faktisch das jeweilige Vorkommen vollständig repräsentieren können. Da die genetische Zusammensetzung dieser beiden Vorkommen bedauerlicherweise unbekannt ist, kann kein direkter Nachweis für diese Hypothese geliefert werden. Jedoch liefern die genetischen Untersuchungen an den beiden übrigen Vorkommen den Hinweis, daß bei Individuen aus asexueller Reproduktion eine große Ähnlichkeit in deren Samenmorphologie zu erwarten ist.

Die Vorkommen *Weende* und *Geismar* wurden genetisch charakterisiert. Danach sind in dem Gründervorkommen *Weende* die Vogelkirschen BD 1 bis BD 10 genetisch identisch und stammen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit aus asexueller Reproduktion; BD 11 läßt sich von diesem Klonkollektiv genetisch unterscheiden und kann aufgrund seiner ebenfalls nachgewiesenen vollständigen Kompatibilität zu BD 1 bis 10 nur als Samen aus einem benachbarten Vorkommen in diese Population gekommen sein. Trotz der nachgewiesenen genetischen Identität von BD 1 bis 10 variieren deren Samengewichte und -größe erheblich und im Vergleich zu den Vorkommen *Hüttners Hochzucht* und *Süddeutschland* sogar erheblicher als diese. Die Samenmorphologie von BD 11 unterscheidet sich von diesen wiederum, auch wenn dies zunächst am Samengewicht nicht deutlich wird. Besonders deutlich werden diese Unterschiede jedoch an der mittleren Samenlänge und -breite. In dem relativ weit gestreuten Vorkommen *Geismar* weisen nur WB 2 und 4 genetische Identität auf, was sich auch an deren Samengewicht und Samenlänge sehr gut widerspiegelt.

Um die Ausbreitungseffizienz einer Art durch ihre Samen bestimmen zu können, ist es notwendig, den Samenelter am bereits transportierten Samen individuell zu identifizieren. In Populationen, in welchen die individuellen Saatgutgewichte eine diskrete Variation aufweisen, lassen sich anhand der Morphologie von Samen *nach* der Verbreitung deren potentielle Sameneltern eingrenzen. Konkrete Untersuchungen existieren dazu bisher nicht. Geringere Variation in der Samenmorphologie bedeutet vielfach genetische Ähnlichkeit, die möglicherweise auf asexuelle Reproduktion innerhalb der Population zurückzuführen ist. Liefert die Samenmorphologie nur Hinweise zum möglichen Samenelter, lassen sich die Verbreitungshypothesen mit Hilfe von hochvariablen Genmarkern überprüfen.

In der Molekulargenetik etablieren sich zunehmend uniparental vererbte Marker, z. B. cpDNA-Haplotypen, mit denen sich wesentlich sicherer als über die Samenmorphologie die Ausbreitungseffizienz bestimmen läßt. Für die Vogelkirsche sind diese jedoch bisher nicht entwickelt. Ein Nachteil dieses Markertyps ist, daß nur der Samenelter nicht aber der Pollenspender identifiziert werden kann. Dieser wäre nützlich, wenn man zur Transportentfernung des Samens die Flugweite des zugehörigen Pollens bestimmen möchte, um sich mit dem durch den Samen vermittelten Genfluß als zusammengesetzte Größe von Pollen- und Eizellentransport auseinanderzusetzen.

4.1.3 Vegetative Ausbreitung

Zur Unterscheidung von Individuen aus generativer und asexueller Reproduktion wurde in 2.2.8 angenommen, daß Individuen, die durch einen einzigen Genotyp in einer Population repräsentiert sind, auf sexuellem Weg entstanden sind. Die weiteren Schlußfolgerungen zur asexuellen Reproduktion sind u. a. auf dieser Annahme aufgebaut.

Nun ist jedoch prinzipiell vorstellbar, daß dieser Genotyp mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch aus asexueller Reproduktion entstanden sein könnte und als einziger überlebt hat. Dieser Fall ist grundsätzlich denkbar und kann nach bisherigen Erkenntnissen auch nicht von der sexuellen Reproduktion unterschieden werden. Daraus ergibt sich faktisch, daß die angegebenen Schätzwerte zur asexuellen Reproduktion untere Grenzen ihres tatsächlichen Vorhandenseins darstellen.

Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß sich unter den als asexuell reproduzierten Individuen solche befinden, die tatsächlich aber das Ergebnis sexueller Reproduktion sind. Um dieses mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können, müssen entsprechende Verfahren noch entwickelt werden. Einige Autoren (BERG & HAMRICK 1994, DUCCI & SANTI 1997, MENN 1998, CHUNG et al. 2000) benutzen daher den metrischen Abstand, mit dem zwei genetisch identische Individuen voneinander entfernt stehen, als zusätzliche Absicherung ihrer Hypothesen zur asexuellen Reproduktion. Für die folgende Diskussion soll jedoch davon ausgegangen werden, daß die eben diskutierten Unsicherheiten bei der Bestimmung von vegetativer Abstammung bedeutungslos sind.

Die Vogelkirsche verfolgt zur Sicherung von ihr besiedelter Habitate die Strategien asexuellen wie sexueller Reproduktion, wobei nach den hier vorliegenden Ergebnissen ein deutliches Gewicht auf der asexuellen Reproduktion liegt. Als Beispiele dafür wurden die Gründerpopulation *Weende*, in der 10 von 11 Individuen aus Wurzelbrut bzw. Stockausschlag stammen, und das Vorkommen *Wibbecke*, wo ein Anteil aus asexueller Reproduktion stammender N_C/N von über 87% unter allen Individuen festgestellt wurde. Auch DUCCI & SANTI (1997) stellten mit Hilfe von Enzymgenmarkern in waldbaulich behandelten und unbehandelten Wäldern eine hohe Anzahl aus asexueller Reproduktion stammender Vogelkirschen fest. Bei ihren Untersuchungen, die die Information von neun polymorphen Genloci zu Klonidentifikation nutzen, fanden sich nur sehr wenige Individuen, die sich genotypisch vollständig von allen übrigen der Population unterscheiden ließen. Wendet man die in dieser Arbeit beschriebene Konzeption zur Unterscheidung von Individuen aus asexueller und generativer Reproduktion auf die Ergebnisse von DUCCI & SANTI (1997) an, gilt der überwiegende Anteil aller untersuchten Individuen und Genotypen als asexuell entstanden. N_C/N bzw. G_C/G schwanken nach eigenen Berechnungen auf der Basis der von DUCCI & SANTI (1997) mitgeteilten Multilocus-Genotyphäufigkeiten in den Vorkommen zwischen 73 und 100% unter allen Individuen bzw. 43 und 100% unter allen Genotypen. Gemessen mit $1 - \delta_T$, sind in der genotypreichsten Population etwa 3% durch klonale Strukturen erklärt, während in einem aus zwei Genotypen bestehenden Kollektiv 54% den Grad ihrer Fixierung beschreiben.

MENN (1998) weist sowohl sexuelle als auch asexuelle Reproduktion in Vorkommen der Elsbeere nach, wobei er nur solche Individuen als asexuell reproduziert ansieht, die den identischen Multilocus-Genotyp besitzen und weniger als 10 Meter voneinander entfernt stehen. Obwohl MENN (1998) die Zahl der Individuen, die aus asexueller Reproduktion stammen, angibt, setzt er sie nicht in Verhältnis zur Gesamtpopulation. Um seine Ergebnisse bei der Elsbeere mit denen der Vogelkirsche vergleichbar zu machen,

wurden die Werte nachträglich ermittelt. Im Mittel aller Elsbeerenvorkommen sind etwa 55% aller Individuen asexuell reproduziert, wobei die Einzelwerte zwischen 35 und 75% je nach Vorkommen und unabhängig von deren Größe schwanken. Gegenüber der Vogelkirsche scheint die Elsbeere, eine ebenfalls rezedente und insektenbestäubte Baumart aus der Familie der Rosaceen, deutlich geringer asexuell zu reproduzieren.

CHUNG et al. (2000) empfehlen, die relative Anzahl unterscheidbarer Multilocus-Genotypen G/N in einer Population (ELLSTRAND & ROOSE 1987) als Maß für die Klondiversität zu verwenden. Tatsächlich gibt dieses Maß nur den Anteil der Population an, der genetisch unterschieden werden kann. Von einem Maß, das den Grad der asexuellen Reproduktion einer Population mißt, wird erwartet, daß es im Fall vollständiger asexueller Reproduktion 1 und bei ausschließlich sexueller Reproduktion 0 wird. Diese Erwartung erfüllt G/N nicht. Wenn die Population auf einen Genotyp fixiert ist ($G = 1$), nimmt G/N den Wert $\frac{1}{N}$ (nicht 1) an. Sind alle Genotypen sexuell reproduziert, gilt $G = N$ und G/N wird 1 (nicht 0).

Ein weiteres Beispiel soll dies nochmals verdeutlichen. Eine Population N besitzt einen Anteil unterscheidbarer Genotypen G , von den nur einer aus asexueller Reproduktion stammt und die übrigen $(G - 1)$ generativ reproduziert wurden. Dann gibt $(G - 1)/N$ den Anteil der Population an, der auf sexuellem Weg entstanden ist. Bei sehr großen Populationen mit einer effektiv hohen Anzahl von Genotypen würde sich dieser Wert immer weiter G/N , der Anzahl unterscheidbarer Genotypen, annähern. Die Häufigkeit des asexuell reproduzierten Genotyps N_C entscheidet hierbei über das Verhältnis $(G - 1)/N$, da $G - 1 = N - N_C$ ist und somit $(G - 1)/N = 1 - N_C/N$ entspricht. Der Anteil dieser Population N_C/N , der aus asexueller Reproduktion stammt, wäre somit genau $1 - \frac{G-1}{N}$.

Da die tatsächliche Anzahl unterscheidbarer Genotypen und deren Häufigkeit die Zusammensetzung einer Population bestimmen, weichen diese in den meisten Fällen von dieser idealisierten Betrachtung ab. G/N ist daher nicht geeignet, Aussagen über klonale Strukturen in Populationen zu treffen.

Der Kehrwert N/G bezeichnet die absolute Häufigkeit, mit der jeder Multilocus-Genotyp in der Population vorhanden wäre, wenn alle Genotypen gleich häufig sind. Dieser Wert führt selten zu ganzzahligen Ergebnissen, was als Hinweis auf eine in der Population vollständig davon abweichende genotypische Häufigkeitsverteilung zu werten ist. Andererseits kann N/G nur für $G = P_G$ und $P_G \in \{1, 2, 3, \dots, n\}$ ganzzahlige Ergebnisse liefern, wenn P_G die absolute Häufigkeit ist, mit der jeder Genotyp in der Population vertreten ist.

Ist $P_G < n$, liegen klonale Strukturen vor. Bei $P_G = 2$, sind nur zwei Genotypen vorhanden und stammen entsprechend der Annahme 1 aus asexueller Reproduktion. Mit anderen Worten besteht die Hälfte der Population aus unterschiedlichen Genotypen $G = N/2$ und der Quotient G/N wird 0,5, obwohl die Individuen der Population vollständig asexuell reproduziert sind. Auf der einen Seite wird mit der Zunahme von P_G der Quotient G/N immer kleiner und auf anderen Seite steigt paradoxerweise die Zahl der Individuen aus asexueller Reproduktion an.

Weder G/N noch sein Kehrwert N/G beziehen den Reproduktionsmodus der Indi-

viduen konzeptionell in die Betrachtung klonaler Strukturen ein.

Wie bereits dargestellt, kann man dem einzelnen Genotyp nicht ansehen, auf welchem Weg sein Trägerindividuum entstanden ist. Nur im Vergleich mit anderen kann dies nur für den Anteil, der potentiell aus asexueller Reproduktion stammt, ergründet werden (GREGORIUS pers. Mitt.). In diesem Zusammenhang erscheint es erstrebenswert, die genetische Identität zweier Individuen wahrscheinlichkeitstheoretisch abzusichern.

Waren im Vorkommen *Wibbecke* klonale Strukturen in den meisten Fällen auf Entfernungen von weniger als 50 Metern beschränkt, was auch DUCCI & SANTI (1997) in ihren Beständen bestätigt finden, erscheinen darüber hinaus gehende Ausbreitungsmuster einer besonderen Betrachtung. Einerseits begrenzen die Anzahl und Variabilität der verwendeten genetischen Marker durch die Anzahl unterscheidbarer Genotypen, die Möglichkeiten die tatsächlichen genetischen Identität eines Individuums festzustellen, und andererseits könnte die Entfernung zwischen zwei genetisch identischen Individuen als Maß für die Fähigkeit der Art zur Bildung von Wurzelschößlingen - auch über längere Zeiträume - genutzt werden.

In Mittelwaldbeständen wird mit Ausnahme von Laßreiteln, meist Eichen, der Baumbestand im wirtschaftlichen Alter von 10 bis 20 Jahren komplett auf den Stock gesetzt. Nur Arten, die aus dem Stock wieder ausschlagen oder Wurzelschößlinge bilden, finden sich im Folgebestand wieder ein. In seltenen Fällen hatten einzelne Bäume schon das reproduktive Alter erreicht und konnten sich über Sämlinge etablieren. Stockauschlag verändert den Standplatz nicht, während sich Wurzelbrut nur in einiger Entfernung vom Stock bilden kann. Entsteht durchschnittlich in 10 Metern Entfernung Wurzelbrut, haben sich Individuen eines Klons bei jeder Nutzung im Durchmesser bereits 20 Meter voneinander entfernt. Nach 10 Nutzungen im Mittelwald, was etwa einem Zeitraum von 100 bis 200 Jahren entspräche, und ausreichender vegetativer Potenz könnte der Abstand zwischen zwei Individuen aus asexueller Reproduktion mit gemeinsamem Ursprung 200 Meter betragen. Bei uferbegleitenden *Salix*-Arten lassen wegen ihrer Diözie Beobachtungen ausschließlich einen Geschlechts im Baumbewuchs entlang von Bachläufen die Vermutung zu, daß diese Population aus vegetativen Abkömmlinge eines einzigen Individuums entstanden ist. Die Reproduktion durch Wurzelschößlinge hat kleinräumig Vorteile, wenn sich das Individuum bereits adaptiert hat. Die Besiedlung neuer, nur durch Samentransport erreichbarer, Lebensräume ist jedoch nur durch generative Reproduktion möglich.

Besitzen die Individuen einer Population nur einen eingeschränkten Gametenpool, aus dem sie selbst entstanden sind, wäre die sexuelle Entstehung zweier an den beobachteten Genloci identischen Individuen ebenfalls wahrscheinlich. BERG & HAMRICK (1994) berechnen daher die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei genetisch identische Genotypen aus einer Grundgesamtheit zufällig gezogen werden können, als Summe der erwarteten relativen Genotyphäufigkeiten. Das Ziehen findet mit anschließendem Zurücklegen statt. Die Wahrscheinlichkeit für die Multilocus-Genotypen entsteht durch Multiplikation der Einzellocuswahrscheinlichkeiten unter der Annahme ihrer genetischen Unabhängigkeit (STIMM & BERGMANN 1994).

Das Modell von BERG & HAMRICK (1994) unterstellt explizit Produktstrukturen,

wie sie für zufallspaarende Populationen üblich sind. Nur unter der Annahme, alle Individuen stammen aus sexueller Reproduktion, lassen sich diese Wahrscheinlichkeiten exakt berechnen, denn die erwarteten Genotyphäufigkeiten leiten sich von den tatsächlichen her. Im Fall klonaler Strukturen sind bestimmte Genotypen häufiger und führen zu Fehleinschätzungen bei den zu erwartenden Genotyphäufigkeiten, die sich aus Multiplikation der tatsächlichen Allelhäufigkeiten ergeben. Will man tatsächlich zwei identische Genotypen unabhängig voneinander ziehen, darf man sie nach dem Ziehen nicht wieder zurücklegen. Denn mit dem Zurücklegen muß damit gerechnet werden, daß dasselbe Individuum zweimal nacheinander gezogen werden kann.

CHUNG et al. (2000) nutzen diesen Schätzwert für Multilocus-Genotypen als Wahrscheinlichkeit dafür, daß zwei identische Multilocus-Genotypen aus sexueller Reproduktion stammen. Im Umkehrschluß leiten CHUNG et al. (2000) aus ihren errechneten geringen Multilocuswahrscheinlichkeiten ab, daß in der Population häufige Multilocus-Genotypen asexuell reproduziert sind. Das Modell von BERG & HAMRICK (1994) berücksichtigt den tatsächlichen Reproduktionsmodus einer Population nicht, daher ist dieser Schätzwert für die Interpretation klonaler Strukturen ungeeignet.

Die Darstellungen genetischer Strukturen in Populationen der Vogelkirschen (Tab. 3-6 und 3-12) berücksichtigen nicht deren Eigenart, gleichzeitig sowohl asexuell als auch generativ zu reproduzieren, da diese alle inventierten Individuen enthalten. Eine besondere Schwierigkeit bildet der Vergleich zu den HARDY-WEINBERG-Strukturen, die ausschließlich die sexuelle Reproduktion unter definierten Bedingungen repräsentieren. Die Aussagen, die vorgefundenen Strukturen weisen Abweichungen von den HARDY-WEINBERG-Strukturen auf, relativieren sich daher ein wenig. In allen Kollektiven wurden mehr Homozygote beim Enzymgenlocus IDH-B nachgewiesen als in einer HARDY-WEINBERG-Struktur vorhanden wären. Da der überwiegende Anteil aller Individuen aus asexueller Reproduktion stammt, müssen sich unter diesen gehäuft Homozygote befinden. Betrachtet man ausschließlich alle aus generativer Reproduktion stammenden Individuen, dürfte sich dieses vermutete Ungleichgewicht ein wenig nivellieren. Da sich an allen anderen betrachteten Enzymgenloci keine Unterschiede zu den HARDY-WEINBERG-Strukturen finden ließen, ist an diesen die asexuelle Reproduktion aller Genotypen eher gleichmäßig verlaufen (s. a. Tab. 3-6). In dem untersuchten Mischbestand (Tab. 3-12) waren an drei Enzymgenloci deutlich mehr Heterozygote, als unter HARDY-WEINBERG-Strukturen erwartet werden, vorhanden. Der Bestand zeichnet sich zudem durch eine hohe individuelle Heterozygotie und einen hohen Grad an asexueller Reproduktion aus.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, daß die teilweise asexuelle Reproduktion einer Population effektiv weniger genetische Variation erhält, als dies auf rein generativem Weg möglich wäre. Hierin kann ein besonderer Prozeß der Anpassung an die Umwelt und Lebensweise der Art gesehen werden. Diese strebt zwar die Etablierung weniger, gut angepaßter Varianten und deren langfristige Bestandssicherung an, aber verzichtet im gleichen Maße auf die Realisation einer maximalen genetischen Vielfalt.

4.2 Selbstfertilität als Voraussetzung für den Zusammenbruch des Inkompatibilitätssystems

Die durch züchterische Maßnahmen implizierte Selbstfertilität ist ursprünglich nur bei der Kulturkirsche bedeutsam. Sie soll den alleinigen Anbau einer einzigen Ertragsorte ermöglichen. GRANGER (1996a) stellt fest, daß der Fruchtertrag der selbstfertilen Sorte *Stella* in kommerziellen Anpflanzungen (Anmerkung: vermutlich ausschließlich diese Sorte) wegen überwiegender Selbstbefruchtung deutlich hinter dem Ertrag bei freier Abblüte in Mischung mit anderen Sorten zurückbleibt. Nach SCHMIDT et al. (1999a) sind die derzeit auf dem Markt verfügbaren selbstfertilen Sorten Befruchter für alle mit ihnen gleichzeitig blühenden anderen Sorten. Unter den Süßkirschenselektionen, die derzeit auf ihren Sortenwert geprüft werden, befindet sich ein hoher Anteil Selbstfertiler (SCHMIDT et al. 1999b). In den vorliegenden Untersuchungen fand sich ein Kollektiv selbstfertiler Kirschen, die wahrscheinlich aus Hybridisierungen der Kultur- und Wildform entstanden sind. Dieses Kollektiv besiedelt als Gründerpopulation einen Bahndamm, welcher Bestandteil der anthropogen beeinflussten Kulturlandschaft ist. Dieses Vorkommen zeigt auf, daß Wildpopulationen keinesfalls isoliert betrachtet werden können und daß mit Introgression in der Kulturkirsche weitverbreiteter *S*-Allele gerechnet werden muß. Wie die Analyse der Inkompatibilitätsverhältnisse der Samenplantage *Neuhemsbach* ergeben hat, sind die von der Kulturkirsche her bekannten Allele S_1 , S_2 und S_6 überrepräsentiert. Unter den Kulturkirschen besitzen die am weitesten verbreiteten Sorten jedoch die Allele S_3 und S_4 , während die Allele S_1 , S_2 und S_6 nur in wenigen Kultivaren vorkommen (SCHMIDT et al. 1999a). Die Überschwemmung der Wildpopulationen mit Pollen der Kulturkirsche hängt andererseits sehr von den jeweils regional bevorzugten Sorten und den von ihnen repräsentierten *S*-Genotypen ab. Da in Populationen die Allele eines gametophytisch exprimierten Inkompatibilitätslocus eine Gleichverteilung anstreben, scheinen sie keine Unterschiede in ihren Selektionseigenschaften zu besitzen. Jedes neugebildete *S*-Allel hat in der Etablierungsphase einen Vorteil, bis der Zustand der Gleichverteilung aller *S*-Allele wiederhergestellt ist. Für ein mutiertes *S*-Allel, das Selbstbefruchtungen zuläßt, gilt dieser Vorteil während seiner Etablierung ebenfalls. Darüber hinaus besitzt es jedoch den Vorteil der Selbstpaarung, was zu einer in Vergleich zu den anderen *S*-Allelen erhöhten Häufigkeit bis zur Fixierung führen kann, wenn keine Mechanismen einer balanzierten Selektion (Fertilitäts- und Viabilitätsnachteile der gebildeten Nachkommen) dem gegenüberstehen. Lokal begrenzter Flug der Bestäuber kann bei entomophilen Arten die Ausbreitung verzögern.

TSUKAMOTO et al. (1999) diskutieren verschiedene mögliche Mechanismen für die Entstehung selbstkompatibler Individuen und den damit verbundenen Zusammenbruch des Inkompatibilitätssystems. Zum einen sind Mutationen am *S*-Genlocus, die die Inkompatibilitätsreaktionen unterbinden (LEWIS & CROWE 1954 und 1958, SASSA et al. 1997), und zum anderen Duplikationen der chromosomalen Region des Pollen-*S* (NETTANCOURT 1977, 1997) dafür verantwortlich. Ein dritter Mechanismus wird in einem die Inkompatibilitätsreaktion kontrollierenden Genkomplex gesehen, wie er im sporophytischen Inkompatibilitätssystem nachweisbar ist (McCUBBIN & KAO

1999). Unter 33 Pflanzen einer natürlichen Population von *Petunia axillaris* fanden TSUKAMOTO et al. (1999) drei selbstkompatible mit einem gemeinsamen funktionslosen *S*-Allel. Die Selbstfertilität ermöglicht die Entstehung von Homozygoten am Inkompatibilitätslocus, womit der Erhalt des ursprüngliche Reproduktionsmodus einer Art gefährdet ist, die zuvor ausschließlich fremdgepaart hat. Zugleich benötigen isoliert stehende, selbstfertile Vogelkirschen keinen Fremdpolleneintrag mehr, um sich sexuell zu reproduzieren. Ob sich hieraus ein Vorteil für die Etablierung durch Sämlinge gegenüber der Bildung von Wurzelbrut ergibt, hängt vom Anpassungspotential und von der Viabilität der generativ reproduzierten Nachkommen ab. Deutliche Vorteile besitzen vegetative Abkömmlinge möglicherweise dadurch, daß sie sich an die herrschenden Umweltbedingungen nicht erneut anpassen müssen.

5. Schlußfolgerungen

5.1 Erhalt der Funktionsfähigkeit der Mechanismen des genetischen Systems

Eine zentrale Rolle für den reproduktiven Artzusammenhalt der Vogelkirsche spielt das gametophytische Inkompatibilitätssystem, da es Selbstbefruchtungen effektiv verhindert und ausschließlich Fremdpaarungen zuläßt. Die Vogelkirsche und die seit langem kultivierte Süßkirsche besitzen abstammungsgeschichtlich den gleichen Ursprung und sie bilden auch heute noch eine Art. Die moderne Obstzüchtung hat sich die Entwicklung selbstfertiler Hohertragsorten als Nahziel gesetzt, die langfristig den Zusammenbruch des auch bei der Kulturform vorhandenen Inkompatibilitätssystems zur Folge haben kann. Da in der Zukunft mit der zunehmenden Etablierung selbstfertiler Sorten gerechnet werden muß und deren Pollen auch Populationen der Vogelkirsche kontaminieren könnten, sind mögliche Folgen für den Erhalt der Wildform heute noch nicht absehbar. Während sich bei Wildapfel und -birne kaum noch reine Formen in den heimischen Wäldern finden lassen und diese vor ihrer Extinktion stehen, scheint die Vogelkirsche bisher nur wenig Introgression von der Kulturform erfahren zu haben. Ausschlaggebend dafür scheint die hohe vegetative Potenz der Vogelkirsche zu sein, die sie den Nieder- und Mittelwaldbetrieb überdauern ließ. Klonale Strukturen lassen sich in waldbaulich behandelten wie unbehandelten Beständen (s. a. FRASCARIA et al. 1993, DUCCI & SANTI 1997) nachweisen und legen nahe, daß die Vogelkirsche nach ihrer Etablierung möglichst lange in dem einmal gewonnenen Terrain zu überdauern in der Lage ist. Bestandeslücken im Wald oder Waldränder besiedelt sie bevorzugt durch Neuansamung, wohin die Samen durch Vögel und Säugetiere verschleppt werden.

Bei der Vogelkirsche können zur Zeit über 20 *S*-Allele unterschieden werden (BOŠKOVIĆ pers. Mitt.), über deren Verteilung im Verbreitungsgebiet der Art noch wenig bekannt ist. Wegen der überwiegenden asexuellen Reproduktion der Vogelkirsche sind zum einen regionale Unterschiede und zum anderen eine starke Sippenbildung innerhalb der Populationen zu erwarten.

Wichtige Bestäuberarten der Kirsche sind Bienen, u. a. die Honigbiene, die während der Kirschenblüte den Pollen zwischen den Individuen übertragen. Im Obstbau werden daher gezielt, Bienenvölker in die Nähe von Plantagen gesetzt, um den Fruchtertrag zu fördern. Da Bienen sich auf der Nahrungssuche maximal bis zu drei Kilometer von ihren Stock entfernen können, unterliegen Populationen der Vogelkirschen in geringer Entfernung zu Süßkirschenplantagen oder Hausgärten potentiell einer Pollenkontamination. Der Eintrag von Pollen der Kulturkirsche ließe sich verringern, wenn in gleichem Maße Bienenvölker in die Nähe von Vogelkirschenvorkommen im Wald aufgestellt würden.

5.2 Erhalt effektiver Populationsgrößen

Gründerpopulationen setzen sich meist aus wenigen, meist sogar verwandten Individuen zusammen. Für die generative Reproduktion sind im Minimum zwei Individuen mit drei unterschiedlichen Inkompatibilitätsallelen notwendig. Eine Population erhält sich jedoch erst dauerhaft, wenn bei drei *S*-Allelen auch sämtliche Genotypen realisiert sind. Da ein Samenerler mit seinen direkten generativen Nachkommen immer semikom-

patibel ist, sind nach sexueller Reproduktion in der Folgegeneration im Minimum drei *S*-Allele vorhanden. Diese bilden die Keimzelle einer Population, die nur durch weiteren, durch Pollen vermittelten, Genfluß zusätzliche *S*-Allele erhalten kann. Sind die Entfernungen, über die die Samen verbreitet werden, geringer als die Reichweite der Bestäuber, ist der Paarungskontakt mit dem ursprünglichen Samenelter gesichert. Für den reproduktiven Artzusammenhalt sind daher Strukturen von Bedeutung, die einen effektiven Genfluß zwischen Populationen oder einzelnen Individuen erlauben. Wichtig erscheinen daher Einzelbäume oder Gruppen in der freien Landschaft, die den Genfluß zwischen Populationen oder Teilen davon ermöglichen.

In der forstlichen Praxis hat die Gewinnung von Saatgut für die Nachzucht der Vogelkirsche eine besondere Bedeutung. Da diese lange Zeit keiner gesetzlichen Regelung unterlegen hat, sind mit der Ausweisung von Saatguterntebeständen und der Anlage von Samenplantagen zwei Wege beschritten worden, die Saatgutgewinnung freiwillig zu regulieren. Die Deutsche Kontrollvereinigung für forstliches Saat- und Pflanzgut e. V. hat eine Vielzahl von Vogelkirschenvorkommen als Erntebestände anerkannt, darunter auch die Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke. Die Flächengrößen dieser Erntebestände schwanken zwischen 0,1 und 5,1 ha, wobei ein deutlicher Schwerpunkt bei Größen zwischen 0,1 und 1,5 ha liegt (Angaben der DKV. Stand: 1996). Die Flächenangaben beziehen sich auf die von der Vogelkirsche eingenommene Teilfläche eines Bestandes und lassen keine Rückschlüsse auf die Anzahl der vorhandenen Vogelkirschen zu. Da jedoch mit einem hohen Anteil asexuell reproduzierter Individuen in Vogelkirschenvorkommen zu rechnen ist, wie für Abteilung 1 a_1 der Forstgenossenschaft Wibbecke nachgewiesen, erscheinen die Einhaltung einer Mindestzahl von in einem Bestand vorhandenen Vogelkirschen und einer Mindestfläche für die Ausweisung von Saatguterntebeständen zwingend erforderlich. Für die Auswahl von Vogelkirschen, die in Samenplantagen reproduzieren sollen, sollten ebenfalls Kriterien gelten, die verhindern, daß Individuen aus asexueller Reproduktion mehrfach vertreten sind. Kann man die Genotypen der Kirschen nicht bestimmen, sollte ein Abstand von 50 Metern zwischen zwei Bäumen daher eingehalten werden, um potentiell zwei unterschiedliche Genotypen zu gewinnen. In ehemaligen Nieder- und Mittelwäldern müßte dieser Abstand möglicherweise noch deutlich erhöht werden, wie die Ergebnisse im Vorkommen **Wibbecke** zeigen. Übertragen auf die Mindestzahl und -fläche bei der Ausweisung von Saatguterntebeständen der Vogelkirsche würde dies bedeuten, daß zwischen vier und sieben unterschiedliche Genotypen pro Hektar potentiell vorhanden sein sollten. Kleinere, reproduktiv isolierte Bestände (deutlich unter einem Hektar) sollten von der Saatguterzeugung ausgenommen werden und statt dessen in Samenplantagen zusammengeführt werden.

6. Zusammenfassung

Wegen ihrer Fähigkeit zusammenhängende, Reproduktionseinheiten zu bilden, erscheinen dominierende Baumarten, die forstlich unter dem Terminus Hauptbaumarten geführt werden, offensichtlich in ihrem reproduktiven Artzusammenhalt, abgesehen von der globalen Bedrohung aller Baumarten durch das Waldsterben, wenig gefährdet. Demgegenüber unterliegen rezedente (i. e. nicht dominante, deshalb meist zerstreut vorkommende und weniger konkurrenzkräftige) Baumarten ständig der Gefahr durch lokale Extinktion, den reproduktiven Artzusammenhalt zu verlieren. Die zentrale Frage der vorliegenden Dissertation lautet daher, welche Mechanismen des genetischen Systems können den reproduktiven Zusammenhalt einer rezedenten Mischbaumart garantieren. Untersucht wird der Einfluß von Reproduktionsmodus, Paarungs- und Genflußsystem im Hinblick auf deren Beitrag für die Erhaltung der genetischen Variation innerhalb der Art.

Einleitend wird die besondere ökologische Stellung rezedenter Mischbaumarten dargelegt (Kapitel 1.1). Arten aus der Familie der Rosaceen sind besonders häufig unter den rezedenten Waldbaumarten vertreten. Dazu zählt auch die Vogelkirsche (*Prunus avium* L.), die als untersuchte Modellbaumart kurz porträtiert (Kapitel 1.1.1.) und hinsichtlich ihrer Eignung für die vorgesehenen populationsgenetischen Betrachtungen charakterisiert wird (Kapitel 1.1.2). Dabei scheinen das Nebeneinander von asexueller Reproduktion durch Wurzelbrut und der Existenz eines Inkompatibilitätssystems bei der Vogelkirsche ein ökologisches Paradoxon zu sein, das dem reproduktiven Zusammenhalt der Art eher entgegensteht. In diesem Kontext ergeben sich folgende Kernfragen zum Reproduktionsmodus, Paarungs- und Genflußsystem.

- Wie groß sind die Anteile asexueller und generativer Vermehrung bei der Vogelkirsche?
- Welchen Einfluß hat die Inkompatibilität auf das Paarungsverhalten?
- Wie hoch ist der Anteil des durch Pollen vermittelten Genflusses?

Feststellung genetischer, phänologischer und morphologischer Variation

Die Stabilität eines Ökosystems basiert im wesentlichen auf der Angepaßtheit und Anpassungsfähigkeit der Populationen aller Arten, die das Ökosystem repräsentieren. Genetische Variation wiederum bildet die Basis für die Angepaßtheit und Anpassungsfähigkeit einer Population an heterogene Umweltbedingungen. Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel. Der Besitz unterschiedlicher Varianten an den Enzymgenloci deutet auf ein differenziertes Anpassungsregime hin. Die kodominante Merkmalsausprägung zeichnet Enzymgenmarker besonders für Beobachtung genetischer Variation aus.

Die Analyse des Vererbungsmodus von polymorphen Enzymgenloci bei der Vogelkirsche (Kapitel 3.2) beginnt mit der Beschreibung der Zymogramme. Mit Ausnahme vom Enzymgenlocus PGI-B, an dem drei unterschiedliche Allele nachweisbar sind, besitzen alle anderen untersuchten gerade zwei Allele. Die Vererbung der Isoenzymmuster analysierte DIPLOGEN, ein computergestütztes Auswertungsprogramm für Zymogramme (GILLET 1998), in dem es Hypothesen zur möglichen Anzahl der kodierenden Genloci und Allelvarianten formuliert und überprüft.

Da eine mögliche Kopplung der betrachteten Genloci deren Verwendung und Aussagefähigkeit beim Nachweis von Genfluß beschränkt, werden der allgemeine Versuchsaufbau und die Methode der Kopplungsanalyse sowie ein erweiterter Ansatz für die Vogelkirsche vorgestellt. Kopplung von Enzymgenloci wurde an den Nachkommenschaften zweier Individuen, die an drei bzw. vier Enzymgenloci heterozygot sind, analysiert. Da für die Kopplungsanalyse der Samenelter in jedem Fall zwei Genloci in heterozygotem Zustand besitzen muß, sind bei $\frac{n(n-1)}{2}$ Kombinationsmöglichkeiten 9 Paare von Enzymgenloci untersucht worden. Der Enzymgenlocus PGM-B erweist sich mit $c=0.837$ an PGI-B in der einen Nachkommenschaft und mit $c=0.735$ an GOT-C in der anderen als gekoppelt, was teilweise im Widerspruch zu den bei der Kulturkirsche veröffentlichten Ergebnisse steht (GRANGER 1996b). Die übrigen Kombinationen zeigen sehr geringe bis keine Kopplung, was GRANGER (1996b) für einen Teil der Kombinationen anders einschätzt.

Aus der Verteilung der genetischen Variation in verschiedenen Vogelkirschenvorkommen ergeben sich deren genetische Strukturen (Kapitel 3.3). Die genetischen Inventur von vier Samenplantagen (Kapitel 3.3.1) weist an 9 von 10 Enzymgenloci keine signifikante Abweichung von HARDY-WEINBERG-Strukturen auf. Nur am Genlocus IDH-B sind gegenüber diesen deutlich mehr Homozygote vorhanden. Da es sich bei Samenplantagen um Klonsammlungen handelt, deren Strukturen eher zufällig zusammengestellt sind, fallen die vorhandenen HARDY-WEINBERG-Strukturen sehr auf. Individuen mit einem oder zwei Enzymgenloci in heterozygotem Zustand bilden Mehrheiten in den Kollektive zwischen 54% und 75%. Die Samenplantagen sind auf der Basis von Multilocus-Genotypen zu etwa 90% voneinander verschieden (mittlere Differenzierung δ). Auch ist jede Klonsammlung in sich fast vollständig differenziert. Die Werte der Gesamtdifferenzierung δ_T schwanken zwischen 0.968 und 0.980.

Die Vogelkirschen eines aus Mittelwaldwirtschaft hervorgegangenen Mischbestands (Kapitel 3.3.2) erwiesen sich an 7 der 10 untersuchten Enzymgenloci als genetisch variabel. Über drei Viertel aller Individuen sind an zwei oder drei Enzymgenloci heterozygot mit einem deutlichen Schwerpunkt bei den Dreifach-Heterozygoten. In der Population wurden 28 Multilocus-Genotypen und 13.209 effektive Genotypen (Diversität v_2) nachgewiesen. Die Population ist auf der Ebene der Multilocus-Genotypen ebenfalls fast vollständig differenziert ($\delta_T = 0.933$).

Um die räumliche Verteilung der Vogelkirsche in dem Bestand zu beschreiben, wurde die Standplätze aller Vogelkirschen erfaßt. In dem gleichen Vorkommen wurden blühphänologische und blattmorphologische Daten erhoben, um den Einfluß der Phänologie auf den reproduktiven Zusammenhalt der Art zu analysieren. Dazu wurde der Verlauf und die Intensität der Blüte im Frühjahr 1998 an fünf Tagen einzelbaumweise bonitiert.

Zum ersten Boniturtermin waren die Blüten aller Vogelkirschen noch geschlossen. Mit dem zweiten Termin erreichten wenige schon die Vollblüte, während einige erst begannen und die Mehrzahl noch nicht blühte. Der nächste Termin stellt den Übergang zur Vollblüte, die am 2. Mai erreicht wurde, dar. Auch hier blühten etwa die Hälfte

aller Kirschen noch nicht. Zur Vollblüte standen alle mit Ausnahme der Bäume, die während der gesamten Blühperiode nicht geblüht haben, in Blüte, die Mehrzahl sogar in voller Pracht. Der abschließende Boniturtermin zeigt das Abklingen der Blüte, bei der die Mehrheit aller Vogelkirschen nicht mehr blühte oder sich kurz vor Beendigung der Blüte befand. Ein Vergleich der summarischen Blühstärke mit den genetisch festgestellten Klonstrukturen zeigt teils geringe, teils erhebliche Unterschiede innerhalb der festgestellten Klongruppen. Ob dies ein Hinweis auf mögliche, bisher nicht identifizierte Unterschiede innerhalb der Gruppen ist, bleibt offen.

Im Oktober 1998 wurde im gleichen Vorkommen die herbstliche Blattfärbung festgestellt. Die Bonitierung der individuellen Herbstlaubfärbung in dem Vorkommen hat ergeben, daß Vogelkirschen mit gelb-roten Blättern im Vorkommen dominieren, jedoch keineswegs gleichmäßig über den Bestand verteilt sind. Im Zentrum des Vorkommens finden sich Vertreter mit grün-gelben Blättern und im Südwesten des Vorkommens diejenigen mit grün-rotem Laub. Hinsichtlich der Eignung dieses Merkmals zur Identifikation zusätzlicher Unterschiede zwischen den Individuen gelten die für das Blühverhalten getroffenen Aussagen.

Um die Variation am *S*-Genlocus darzustellen, wurden die 39 Vogelkirschenklone der Samenplantage Neuhemsbach analysiert. 17 verschiedene *S*-Genotypen, die insgesamt 12 *S*-Allele repräsentieren, wurden nachgewiesen. S_2S_6 stellt mit 10 Individuen gut ein Viertel des Kollektivs und neun *S*-Genotypen, ebenfalls etwa ein Viertel, sind nur einmal vorhanden. Die übrigen *S*-Genotypen (Anzahl der Genotypen in Klammern) sind mit absoluten Häufigkeiten von 2 (3), 3 (3) und 5 (1) präsent. Insgesamt sind zur Zeit bei der Kultur- und Vogelkirsche etwa 20 *S*-Allele bekannt.

Inkompatibilitätssystem

Die Anzahl in einer Population vorhandener *S*-Allele und die aus ihnen gebildeten *S*-Genotypen bestimmen maßgeblich das Paarungsverhalten. Ausgehend von einer am *S*-Genlocus vollständig differenzierten Modellpopulation, in der die minimal mögliche Anzahl von *S*-Allelen realisiert und jeder *S*-Genotyp genau einmal vorhanden ist, werden die Paarbeziehungen in-, semi- und vollständig kompatibler *S*-Genotypen in Abhängigkeit zur Anzahl vorhandener *S*-Allele quantifiziert.

Die Funktion des gametophytischen Inkompatibilitätssystem bei der Kirsche wird eingangs beschrieben. Drei Verfahren zu dessen Analyse werden vorgestellt und hinsichtlich ihrer Ergebnisse verglichen. Zwei dieser Methoden nutzen Bestäubungsversuche, während das dritte auf dem direkten, biochemisch-genetischen Nachweis des *S*-Genlocus basiert (Kapitel 2.2.1).

Künstliche Bestäubungen an einer blühphänologisch isolierten Vogelkirsche weisen den Baum als selbstinkompatibel und alle eingekreuzten als zu diesem kompatibel aus. Der relative Reproduktionserfolg der Kreuzungen ist mit 23% aller bestäubten Blüten doppelt so groß wie bei freier Abblüte, was die Effizienz der Bestäuberarten widerspiegelt. Bestäubungsversuche *in vitro* führten teilweise zu Widersprüchen in den Inkompatibilitätsreaktionen der verwendeten Kreuzungspartner, womit keine eindeutige Zuordnung dieser möglich war. Die in den Kreuzungsversuchen verwendeten Vogelkirschen wurden

mit Hilfe der Elektrophorese hinsichtlich ihrer *S*-Genotypen charakterisiert. Unter den 15 Vogelkirschen sind fünf unterschiedliche *S*-Genotypen vorhanden, die untereinander teils semi-, teils vollständig kompatibel sind. Vergleicht man die drei Verfahren, die zwei methodisch unterschiedliche Ansätze haben, so sind die Bestäubungsversuche zeit- und materialaufwendiger als der kostenintensivere biochemisch-genetische Nachweis durch *S*-RNasen. Die Überprüfung der Vererbung von *S*-RNasen wird andererseits kaum ohne Kreuzungsnachkommenschaften zu realisieren sein.

Da die Vogelkirsche im Wald meist verstreut vorkommt und die Gewinnung von Blühreisern wegen der Baumhöhen schwierig ist, wurden die *S*-Genotypen von 39 Vogelkirschenklone der Samenplantage Neuhemsbach analysiert und die Paarbeziehungen eines Baumes zu seinen maximal acht Parzellennachbarn dargestellt. Obwohl gut ein Viertel aller Individuen untereinander inkompatibel ist, stehen diese selten benachbart. Zur Mehrheit aller Nachbarn besteht Semikompatibilität.

Innerhalb der Mechanismen des genetischen Systems bildet das gametophytische Inkompatibilitätssystem eine tragende Säule, die den reproduktiven Artzusammenhalt der Vogelkirsche fördert. Es verhindert wirksam Selbstungen sowie Paarungen mit Individuen des gleichen *S*-Genotyps und fördert gleichzeitig Fremdpaarungen, darunter bevorzugt solche, in denen die beteiligten *S*-Allele vollständig verschieden sind. Der Anteil Individuen, zu denen vollständige Kompatibilität besteht, nimmt mit der Anzahl verschiedener *S*-Allele in der Population stetig zu, um dem Gleichgewichtszustand einer total differenzierten Modellpopulation entgegenzustreben, in der alle *S*-Allele und die aus ihnen gebildeten *S*-Genotypen gleich häufig werden. Mit jedem weiteren *S*-Allel, das in die Population gelangt, beginnt diese Dynamik zur Gleichverteilung erneut.

Reproduktionsmodus

Um im Falle einer reproduktiven Isolation wenigstens eine zweite Baumgeneration zu überleben, besitzt die Vogelkirsche die Fähigkeit, sich vegetativ zu regenerieren. Untereinander sind die Kloneschwister als vegetative Abkömmlinge eines isolierten Klonelters jedoch inkompatibel.

Neben Enzymgenmarkern wurden in einem aus Mittelwaldwirtschaft hervorgegangenen Vogelkirschenvorkommen, das einen Anteil von weniger als 5% der Bestockung eines Traubeneichenbestandes darstellt, blühphänologische und blattmorphologische Daten erhoben, um den Einfluß des Reproduktionsmodus zu analysieren.

Ausgehend von bekannten Vorgehensweisen zur Bestimmung von asexueller Reproduktion in Kollektiven wird zunächst die Abstammung aus asexueller Reproduktion konzeptionell über die genetische Identität der Individuen definiert. Auf dieser Grundlage werden Verfahren zur Ermittlung von Anteilen asexuell reproduzierter Individuen und Genotypen sowie asexueller Reproduktion in Kollektiven entwickelt.

Von einem Maß, das den Grad der asexuellen Reproduktion einer Population mißt, wird erwartet, daß es im Fall vollständiger asexueller Reproduktion 1 und bei ausschließlich sexueller Reproduktion 0 wird. G/N gibt die Anzahl unterscheidbarer Genotypen in der Population an und wird allgemein zur Beschreibung klonaler Strukturen verwendet. Wenn die Population auf einen Genotyp fixiert ist ($G = 1$), nimmt G/N

den Wert $\frac{1}{N}$ und nicht, wie systematisch hergeleitet, 1 an. Da andererseits G/N niemals 0 werden kann, ist dieser Quotient kaum geeignet asexueller Reproduktion zu beschreiben.

Um Vorstellungen über Klonstrukturen in Populationen zu gewinnen, werden die absolute Anzahl aus asexueller Reproduktion stammender Individuen N_C bzw. Genotypen G_C eingeführt. Jeder der beiden Werte kann jedoch nicht die Häufigkeitsverteilung des jeweils anderen berücksichtigen, so daß auch diese nur bedingt geeignet sind, klonale Strukturen in Populationen darzustellen. Daher wird $1 - \delta_T$, das Komplement der Differenzierung, als mögliche Alternative zur Bestimmung von asexueller Reproduktion in Populationen diskutiert.

Von den Vogelkirschen des Mischbestands (Kapitel 3.3.2) stammen 87% aller Individuen und 61% aller Genotypen aus asexueller Reproduktion. Dennoch weist die Population auf der Ebene der Multilocus-Genotypen nur einen geringen Grad der asexuellen Reproduktion ($1 - \delta_T = 0.067$) auf.

Samenplantagen sind Klonsammlungen, die aus verschiedenen Ausgangsvorkommen zusammengetragen wurden. Nach dem Verbringen als Pfropflinge in die Samenplantage sind sie faktisch alle verklont. Bestimmt man die Individuen, die sich bereits in den Ausgangsbeständen asexuell reproduziert haben, so beträgt dieser Anteil zwischen 56 und 66%. Unter den Multilocus-Genotypen der Samenplantagen befinden sich 28 bis 39%, die ausschließlich Abstammung aus asexueller Reproduktion repräsentieren. Der Anteil unterscheidbarer Genotypen G/N beträgt zwischen 51 und 64%. Der Grad der asexuellen Reproduktion in den Kollektiven ist jedoch sehr gering, gemessen mit $1 - \delta_T$ für Multilocus-Genotypen. Die Werte schwanken zwischen 0.020 und 0.032.

Abschließend kann daher festgehalten werden, daß die Vogelkirsche trotz enormer vegetativer Potenz einen hohen Differenzierungsgrad in den untersuchten Populationen aufweist.

Genflußsystem

Genfluß wird als Mechanismus zur Erhaltung genetischer Variation identifiziert (Kapitel 2.2.7). Direkter Vaterschaftsausschluß und Maximum-Likelihood-Schätzverfahren sind Methoden zur Messung bzw. Schätzung von durch Pollen vermitteltem Genfluß. Die für eine korrekte Ermittlung des Genflusses komplette Zygotenpopulation eines Kollektivs ist in der praktischen Untersuchungen nicht abgrenzbar. Daher greifen die klassischen Verfahren vereinfachend auf einzelbaumweise geerntetes Saatgut von Populationen als Abbild einer frühen Zygotenpopulation zurück und vernachlässigen insbesondere mögliche Pollenexporte des Kollektivs. In der vorliegenden Untersuchung wurde der durch Pollen vermittelte Genfluß ebenfalls an Einzelbaumsaatgut mittels Vaterschaftsausschluß festgestellt. Der so ermittelte Genfluß stellt somit die untere Grenze des tatsächlichen dar.

An jeweils 160 Nachkommen zweier Individuen, die eine isolierte Gründerpopulation repräsentieren, wurde der durch Pollen vermittelte Genfluß mit Hilfe von Enzymgenmarkern analysiert. Die beiden Individuen sind an sechs Enzymgenloci polymorph, während deren Nachkommen an acht Genloci Variation aufweisen. Die beiden zusätzlich polymorphen Genloci können daher direkt für die Ermittlung des Genflusses verwendet werden.

Aufgrund von Selbstinkompatibilität des einen Samenelters und Besitz von Genloci in homozygotem Zustand des anderen konnte zusätzlicher Genfluß entdeckt werden. Die untere Grenze der importierten Pollen beträgt für den einen Samenelter mindestens 36% und für den anderen mindestens 52%. Etwa 44% der effektiven Pollen stammen aus Importen, was für die isolierte Lage der Population ein beträchtlicher Anteil ist.

Um die Eignung der Samenmorphologie für die Identifizierung von Genfluß durch Samen zu ergründen, wurden Samengröße und -gewicht an Saatgutstichproben von 35 einzelnen Vogelkirschen aus vier Vorkommen und an Saatgutmischproben von 16 Vogelkirschenvorkommen festgestellt.

Die Einzelbaumabsaaten von zwei Vorkommen weisen relativ geringe Unterschiede hinsichtlich der erhobenen Merkmale auf, während die der beiden anderen deutlichere Schwankungen der Einzelwerte verzeichnen. Selbst bei Individuen, die gesichert aus vegetativer Reproduktion stammen, ist die Streuung der Werte größer als in den beiden erstgenannten Vorkommen. In Vorkommen, in denen die Zusammensetzung der Sameneltern hinsichtlich der Samengröße inhomogen ist, sind Rückschlüsse auf den Samenelter denkbar. Die Streuung der Samengewichte und -größe in 16 Vogelkirschenvorkommen variiert wesentlich deutlicher als bei den Einzelbäumen. Die zweifelsfreie Identifikation einer Saatgutpartie allein anhand des Gewichts oder der Größe dürfte daher nicht immer möglich sein.

Eine tragende Säule des reproduktiven Artzusammenhalts ist der Genfluß. Dabei ergänzen sich Inkompatibilitäts- und Genflußsystem in ihrer Wirkung, solange ein Austausch genetischer Information zwischen Populationen stattfindet. Besonders bedeutsam ist Genfluß in individuenarmen, teilweise isolierten Gründerpopulationen, da diese erst nach der Realisation der Mindestanzahl von drei verschiedenen *S*-Allelen und drei *S*-Genotypen ihren reproduktiven Zusammenhalt manifestiert haben.

Zusammenbruch des Inkompatibilitätssystems durch Selbstfertilität

In der Obstzüchtung gewinnen Süßkirschensorten an Bedeutung, die selbstfertil sind. Für die Vogelkirsche bedeutet die Selbstfertilität den beginnenden Zusammenbruch des Inkompatibilitätssystems, wenn Pollen der Kultursorten in nennenswertem Umfang in die Wildpopulationen gelangt. In der untersuchten, weitgehend isolierten Gründerpopulation an einem Bahndamm konnten selbstfertile Kirschen nachgewiesen werden.

Schlußfolgerungen

Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse werden folgende Schlußfolgerungen für eine nachhaltige Bewirtschaftung der Vogelkirsche (Kapitel 5) abgeleitet:

- Die Funktionsfähigkeit der Mechanismen des genetischen System sollte erhalten werden. Dies gilt insbesondere für das Inkompatibilitätssystem, das durch selbstfertile Kulturkirschen gefährdet ist.
- Effektive Populationsgrößen bei der Vogelkirsche sollten erhalten werden, um eine lokale Extinktion und den somit unterbundenen Genfluß zwischen Populationen zu verhindern.
- Die asexuelle Reproduktion der Individuen einer Population darf bei der Auswahl geeigneter Saatguterntebestände nicht unterschätzt werden.

7. Summary

Asexual and sexual reproduction in populations of wild cherry (*Prunus avium* L.)

Because of the competition regime in mixed forests, recedent tree species (i. e. not dominant and usually with a patchy or scattered distribution) are permanent in danger of local extinction. The central question of this study reads as follows: How could the characteristics of the mechanisms of the genetic system guarantee the reproductive coherence of a recedent tree species? To answer this question, the mode of reproduction, the mating system and the gene flow system of wild cherry (*Prunus avium* L.) were studied.

By way of introduction, the stabilizing contribution of recedent tree species to forest ecosystems is pointed out. In Central Europe, most of these species belong to rosaceous family. Wild cherry was chosen as a recedent model tree specie because of its faculty of asexual reproduction and its specific incompatibility system.

The gametophytic incompatibility system as a part of the mating system was first analyzed on a system-theoretical basis. The distribution of S genotypes in a totally differentiated model population is shown. Pollination experiments and investigations of gene markers for the S gene locus were compared as whether they are suitable methods or they provide serious results, for the observation of the incompatibility system in wild cherry populations. In natural populations of wild cherry, the mating references are difficult to describe. Therefore the mating relations of neighbouring trees in a seed orchard of wild cherry were demonstrated. Although one fourth of all clones in this collection belongs to the same incompatibility genotype, in total less than 10 percent of all neighbouring mates are incompatible. In the remaining 90% mating relation among neighbouring trees, about one half is semi-compatibel and the other half is fully compatibel.

The inheritance and linkage of 10 enzyme gene loci was studied. It was found that PGM-B is linked to PGI-B ($c=0,837$) in one double-heterozygot individual and to GOT-C ($c=0,735$) in another. For most of the other pairs of gene loci, no or only slight linkage was present. Although there exist only a few numbers of genotypes in four seed orchards and in a natural population, their genotypic multilocus differentiation, measured by δ_T , shows that all populations are almost totally differentiated ($0,933 \leq \delta_T \leq 0,980$).

The genetic concept of asexual reproduction of individuals is based on their genetic identity at all gene loci. The inversion of this implies that an individual was sexually reproduced if its genetic identity is totally different from all others. Transferring this concept to observable multilocus genotypes, each unique type which occurs in a population will be defined as sexually reproduced. Consequently, the rest of types with an absolute frequency ≥ 2 must be asexually reproduced. A seed orchard is collection of clones, which originate from different stands. Based on multilocus genotypes representing 10 polymorphic gene loci, the wild cherry clones of four seed orchards were tested whether they were already asexually reproduced in the stands from which they originated or not. The amount of asexual reproduction in the stands ranges between 56 and 66 percent of all individuals. Relative to the number of existing genotypes in the clone

collections, 28 to 39 percent seem to be asexually reproduced. In a natural population, 87 percent of all individuals or 61 percent of all genotypes were vegetative descendants. Both measures are partially unsuitable to represent the population amount of asexual reproduction, because the one is based only on the absolute population size N ignoring the number of different genotypes, and the other reveals the number of genotypes G but ignores their frequency distribution within the population. G/N , a widely used measure to explain clonal structures in populations, is also unsuitable for this purpose because, if a population is totally differentiated ($G = N$), the amount is 1 and, if the population is fixed ($G = 1$), the amount is $\frac{1}{N}$. Thus G/N could never reach 0. A measure which represents the amount of asexual reproduction should equal 0 if no individual is asexually reproduced and equal 1 if all are vegetative descendants. In this context the measure $1 - \delta_T$ was introduced as a possible measure. $1 - \delta_T$ interprets the above-mentioned results of differentiation in a contrary way as the fixed part of a population. As seen above, all studied populations are almost totally differentiated, so that at most 2 to 7 percent of all types belong to clonal reproduction. The spatial distribution of the identical multilocus genotypes shows that in most cases the distance between two individuals of the same type is less than 50 metres. Only in a few cases did the distance span more than 100 metres.

Pollen gene flow is directly measured by identifying imported pollen carrying new genetic variants (alleles). In an isolated founder population containing two genetically different individuals, the individual outcrossing rate at its minimum amounts to between 36 and 52 percent of all effective pollen. The minimum rate of pollen gene flow into this population is 44 percent, which is definitely high for an isolated population.

All individuals that flower at the same time could potentially mate. Therefore observations during the flowering in a mixed stand containing wild cherry is of outmost interest for the mating system. If the phenology of an individual also is completely independent of environmental effects, it could be used as an excellent genetic marker for the identification of clonal structures. On the one hand, differences in the flowering behaviour of two genetically identical individuals could be interpreted as a indicator that the involved gene markers are unable to describe the existing genetic diversity. On the other hand the flowering of an individual represents its vitality via fecundity, so that existing differences within a clonal group are a response to a kind of resource management.

In some cases, differences in seed weight and size of cherry-stones both between trees and between populations are very obvious and motivated a detailed measurement of the seed size. If the differences in seed size between seed trees are significant, it could be used as a maternal marker. Thus, if the corresponding seed tree of a dispersed seed could be identified without doubt, the seed characteristic could be used to measure effective gene flow via seeds. But this is only realizable in populations with highly differentiated seed sizes.

The incompatibility system in wild cherry is endangered by activities in fruit tree breeding to increase self-fertility in sweet cherry. Since sweet cherry is the cultured variety of wild cherry, they are fully compatible. This may lead to a long-term breakdown of the incompatibility system in wild cherry.

The main conclusions which can be drawn for recedent tree species are the importance of preserving the mechanisms of the genetic system, especially protection of the incompatibility system from self-fertility alleles of the cultivated variety, and of conserving effective population sizes and differentiation within and between populations. Clone collections for the establishment of seed orchards should note that a considerable number of wild cherries in mixed stands are asexually reproduced.

8. Literaturverzeichnis

- ACQUAIAH G 1972. Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research. Dioscorides Press, Portland, Oregon: 1-126
- ADAMS WT, DS BIRKES 1991. Estimating mating patterns in forest tree populations. In: FINESCHI S, ME MALVOLTI, F CANNATA, HH HATTEMER (eds.). Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees. The Hague: SPB Academic Publisher, The Netherlands. 157-172
- ADAMS WT, AR GRIFFIN, GF MORAN 1992. Using paternity analysis to measure pollen dispersal in plant populations. The American Naturalist 140: 762-780.
- ARASU NN 1968. Self-incompatibility in angiosperms: a review. Genetica 39: 1-24
- BARTELS H 1971. Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. Planta 99: 283-289
- BATEMAN AJ 1947. Number of *S*-alleles in a population. Nature 160: 3
- BATEMAN AJ 1952. Self-incompatibility in angiosperms. I. Theory. Heredity 6: 285-310
- BELL PR 1995. Incompatibility in flowering plants: Adaption of an ancient response. Plant Cell 7: 5-16
- BERG EE, JL HAMRICK 1994. Spatial and genetic structure of two sandhills oaks: *Quercus laevis* and *Quercus margaretta* (*Fagaceae*). American Journal of Botany 81: 7-14
- BERGER K 1963. Fertilitätsuntersuchungen an der Wildkirsche, *Prunus avium* L. var. *avium*. Die Kulturpflanze, Band XI. Akademie-Verlag, Berlin: 358-375
- BERGMANN F 1971. Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. Allgemeine Forst- und Jagd-Zeitung 142: 278-280
- BERGMANN F, FW RUETZ 1991. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. Forest Ecology and Management 46: 39-47
- BOŠKOVIĆ R, KR TOBUTT 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. Euphytica 90: 245-250
- BOŠKOVIĆ R, KR TOBUTT 1998. Inheritance and linkage relationships of isoenzymes in two interspecific cherry progenies. Euphytica 103: 273-286
- BOŠKOVIĆ R, K RUSSELL, KR TOBUTT 1997a. Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, and reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. Euphytica 95: 221-228
- BOŠKOVIĆ R, KR TOBUTT, FJ NICOLL 1997b. Inheritance of isoenzymes and their linkage relationships in two interspecific cherry progenies. Euphytica 93: 129-143

- BROOKS RJ, AM TOBIAS, MJ LAWRENCE 1997. A time series analysis of the population genetics of the self-incompatibility polymorphism. 1. Allele frequency distribution of a population with overlapping generations and variation in plant size. *Heredity* 79:350-360
- BROOKS RJ, AM TOBIAS, MJ LAWRENCE 1997. A time series analysis of the population genetics of the self-incompatibility polymorphism. 2. Frequency-equivalent population and the number of alleles that are be maintained in a population. *Heredity* 79: 361-364
- BOUCHER W 1993. A deterministic analysis of the self-incompatibility alleles. *Journal of Mathematical Biology* 31: 149-155
- CERTAL AC, AM SANCHEZ, H KOKKO, W BROOHTHAERTS, MM OLIVIERA, JA FEIJO 1999. *S*-RNases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path. *Sexual Plant Reproduction* 12: 94-98
- CHELIAK WM, JA PITEL 1984. Techniques for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species. Information Report PI-X-42, Petawawa National Forestry Institute, Canada: 1-49
- CLARK AG 1996. Population genetic aspects of gametophytic incompatibility. *Plant Species Biology* 11: 13-22
- CHUNG MG, JM CHUNG, MY CHUNG, BK EPPERSON 2000. Spatial distribution of allozyme polymorphisms following clonal and sexual reproduction in populations of *Rhus javanica* (Anacardiaceae). *Heredity* 84: 178-185
- CRANE MB, WJC LAWRENCE 1929. Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology and Horticultural Science* 7: 276-301
- CRANE MB, WJC LAWRENCE 1931. Sterility and incompatibility in diploid and polyploid fruits. *Journal of Genetics* 24: 97-107
- CRANE MB, A BROWN 1937. Incompatibility and sterility in sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Journal of Pomology* 15: 86
- CRANE MB, A BROWN 1955. Incompatibility and varietal confusion in cherries. *Science of Horticulture* 11: 53-55
- CROWE L 1955. The evolution of incompatibility in species of *Oenothera*. *Heredity* 9: 293-322
- CROWE L 1964. The evolution of outbreeding in plants. I. The angiosperms. *Heredity* 19: 435-457
- DEVLIN B, K ROEDER, NC ELLSTRAND 1988. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 369-380.
- DEVLIN B, NC ELLSTRAND 1990. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution* 44: 248-259.

- DUCCI F, F SANTI 1997. The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium* L.). Canadian Journal of Forest Research 27: 1998-2004
- EAST EM, AJ MANGELSDORF 1925. A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 11: 166-171
- ELLSTRAND NC 1984. Multiple paternity within the fruits of wild radish, (*Raphanus sativus* L.). The American Naturalist 123: 819-828.
- EMERSON S 1938. The genetics of self-incompatibility in *Oenothera organensis*. Genetics 23: 190-202
- EPPERSON BK, TQ LI 1997. Gene dispersal and spatial genetic structure. Evolution 51: 672-681
- FINESCHI S, ME MALVOLTI, F CANNATA, HH HATTEMER (eds.) 1991. Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees. The Hague: SBP Scientific Publishing, The Netherlands: 1-251
- FISHER RA 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford University Press, Oxford: 1-277
- FISHER RA 1963. The efficacy of self-sterility mechanisms among hermaphrodites in diminishing unions between near relations. In: FISHER RA. The Theory of Inbreeding, 2. ed. Oliver & Boyd, London, Appendix B: 139- 145
- FRASCARIA N, F SANTI, PH GUYON 1993. Genetic differentiation within and among populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and wild cherry (*Prunus avium* L.). Heredity 70: 634-641
- GADOW K VON 1999. Waldstruktur und Diversität. Allgemeine Forst- und Jagdzeit-schrift 170: 117-122
- GEHLE T 1999. Reproduktionssystem und genetische Differenzierung von Stieleichpop-ulationen (*Quercus robur* in Nordrhein-Westfalen. Göttingen Research Notes in Forest Genetics No. 24: 1-144
- GILLET E 1991. Genetic analysis using single tree progenies. In: FINESCHI S, ME MALVOLTI, F CANNATA, HH HATTEMER (eds.). Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees. The Hague: SPB Academic Publisher, The Netherlands: 41-48
- GILLET E 1994. GSED – Genetic Structures from Electrophoresis Data. User's Maual, Version 1.0, Göttingen: 1-49
- GILLET E 1996. Qualitative inheritance analysis of isoenzymes in haploid gametophytes: principles and a computerized method. Silvae Genetica 45: 8-16
- GILLET E 1997. Maximum likelihood estimators of the gametic contributions of single-plant progenies. Biometrics 53: 504-523

- GILLET E 1998. DIPLOGEN: Qualitative inheritance analysis of zymograms and DNA electropherograms in diploid individuals. Computer program and user's manual. <http://www.uni-forst.gwdg.de/forst/fg/software.htm>
- GILLET EM(ed.) 1999. Which Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project "Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees" in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- GILLET E, H-R GREGORIUS 2000. Qualified testing of single-locus codominant inheritance using single tree progenies. *Biometrics* 56: 73-79
- GILLET E, HH HATTEMER 1989. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. *Heredity* 63: 135-141
- GOODELL K, DR ELAM, JD NASON, NC ELLSTRAND 1997. Gene flow among several populations of a self-incompatible plant: An interaction between demography and genetics. *American Journal of Biology* 84: 1362-1371
- GRANGER AR, GR CLARKE, JF JACKSON 1993. Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 458-464
- GRANGER AR 1996a. Pollen gene flow in South Australian cherry (*Prunus avium* L.) orchard. *Journal of Experimental Agriculture*, 37: 583-589
- GRANGER AR 1996b. Inheritance and linkage of isozymes in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 96: 426-430
- GRANT V 1949. Pollination systems as isolating mechanisms in angiosperms. *Evolution* 3: 82-97
- GREGORIUS H-R 1974. Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica* 23: 22-27
- GREGORIUS H-R 1978. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math. Biosci.* 41: 253-271
- GREGORIUS H-R 1980. The probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics* 36: 632-652
- GREGORIUS H-R 1987. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 397-401
- GREGORIUS H-R 1989. Characterization and Analysis of Mating Systems. Ekopan Verlag, Witzenhausen: 1-158
- GREGORIUS H-R 1996. The contribution of the genetics of populations to ecosystem stability. *Silvae Genetica* 45: 267-271
- GREGORIUS H-R 1999. Genetische Ressourcen - Funktion und Behandlung. Vorlesungsskriptum (Selbstverlag), Göttingen: 1-61
- GREGORIUS H-R, JH ROBERDS 1986. Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 826-834

- HAMRICK JL, A SCHNABEL 1985. Understanding the genetic structure of plant populations. Some old problems and a new approach. In: GREGORIUS HR ed. Population Genetics in Forestry. Lecture Notes in Biomathematics No. 60. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 50-67
- HATTEMER HH, F BERGMANN, M ZIEHE 1993. Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main. Zweite, neuarbeitete und erweiterte Auflage: 1-492
- ISHIMIZU T, Y SATO, T SAITO, Y YOSHIMURA, S NORIOKA, T NAKANISHI, F SAKIYAMA 1996. Identification and partial amino acid sequences of seven *S*-RNases associated with self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nahai). Japanese Journal of Biochemistry 120: 326-334
- ISHIMIZU T, T SHINKAWA, F SAKIYAMA, S NORIOKA 1998. Primary structural features of rosaceous *S*-RNases associated with the gametophytic self-incompatibility. Plant Molecular Biology 37: 931-941
- ISHIMIZU T, K INOUE, M SHIMONAKA, T SAITO, O TERAJ, S NORIOKA 1999. PCR-based method for identifying the *S*-genotypes of Japanese pear cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98: 961-967
- KAURISCH P, W GRUPPE, W KÖHLER 1988. Enzympolymorphismen bei Kirschen (*Prunus spp.*) und Arthybriden (*P. x spp.*). Methode, ausgewählte Arten/Sorten und Unterlagen-Reis-Wechselwirkungen. Angewandte Botanik 62: 41-52
- KAURISCH P, M THROLL, W GRUPPE, W KÖHLER 1991. Enzympolymorphismen bei Süß- (*Prunus avium*) und Sauerkirschen (*P. cerasus*). Kultursortendifferenzierung. Angewandte Botanik 65: 35-43
- KAO TH, AG McCUBBIN 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 12059-12065
- KOBEL F, P STEINEGGER, J ANLIKER 1938. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Kirschensorten. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 52: 564-595
- KÜPPERS H 1979. Problematik der Veredelungsunterlagen für Sauer- und Süßkirschen im Spiegel von 250 Jahren. Deutsche Baumschule 31: 1-17
- LEACH CR 1988. Detection and estimation of linkage for a co-dominant structural gene locus linked to a gametophytic self-incompatibility locus. Theoretical and Applied Genetics 75: 882-888
- LEACH CR, O MAYO, MM MORIS 1996. Linkage disequilibrium and gametophytic self-incompatibility. Heredity 73: 102-112.
- LEWIS D 1944. Incompatibility in plants, its genetical and physiological synthesis. Nature 153, 575-578
- LEWIS D, LK CROWE 1954. Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutation in *Prunus avium* L. Heredity 8: 357-363

- LOON LC, VAN 1971. Tobacco polyphenoloxidases: A specific staining method indicating non-identity with peroxidases. *Phytochemistry* 10: 503-507
- MARIETTE S, M LEFRANC, P LEGRAND, D TANEYHILL, N FRASCARIA-LACOSTE, N MACHON 1997. Genetic variability in wild cherry populations in France. Effects of colonizing processes. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 904-908
- MATHER K 1944: Genetic control of incompatibility in angiosperms and fungi. *Nature* 153, 392-394
- MATTHEWS P, KP DOW 1969. Incompatibility groups: sweet cherry (*Prunus avium*). In: KNIGHT RL: Abstract Bibliography of Fruit Breeding and Genetics to 1965, *Prunus*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal: 540-544
- McCLURE BA, V HARING, MA ANDERSON, RJ SIMPSON, F SAKIYAMA, AE CLARKE 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342: 955-957
- MCCUBBIN AG, TH KAO 1999. The emerging complexity of self-incompatibility (S-) loci. *Sexual Plant Reproduction* 12: 1-5
- MEAGHER TR 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. *The American Naturalist* 128: 199-215.
- MENN C 1998. Isoenzymatisch-genetische Untersuchungen an der Elsbeere (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz.). Ein Beitrag zum besseren Verständnis der genetischen Strukturen einer seltenen, zerstreut vorkommenden Baumart. Diplomarbeit an der Professur für Waldbau (ETH), Zürich: 1-99
- MÜLLER-STARCK G, M ZIEHE (eds.) 1991. Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main: 1-271
- MULLER HJ 1932. Some genetic aspects of sex. *The American Naturalist* 66: 115-138
- NAGYLAKI T 1975. The deterministic behavior of self-incompatibility alleles. *Genetics* 79: 545-550
- NEI M 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323
- NETTANCOURT D DE 1977. Incompatibility in Angiosperms. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 3. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York: 1-230
- NETTANCOURT D DE 1997. Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction* 10: 185-199
- NEWBIGIN E 1996. The evolution of self-incompatibility: An molecular voyeur's perspective. *Sex Plant Reproduction* 9: 357-361
- PASCALE C DI, CM JACOBI 1998. Dynamics of pollination: A model of insect-mediated pollen transfer in self-incompatible plants. *Ecological Modelling* 109: 1, 25-34

- SAMPSON DR 1960. An hypothesis of gene interaction at the S Locus in self-incompatibility systems of angiosperms. *American Naturalist* 94: 283-292
- SANTI F 1988. Variabilité génétique inter et intrapopulations chez le merisier (*Prunus avium* L.). Thèse de Doctorat, INRA, Paris-Grignon: 1-94
- SANTI F, M LEMOINE 1990a. Genetic markers for *Prunus avium* L.: inheritance and linkage of isozyme loci. *Annales Sciences Forestiers* 47: 131-139
- SANTI F, M LEMOINE 1990b. Genetic markers for *Prunus avium* L. 2. Clonal identifications and discrimination from *P. cerasus* and *P. cerasus* x *P. avium*. *Annales Sciences Forestiers* 47: 219-227
- SASSA H, H HIRANO, T NISHIO, T KOB 1997. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNases of Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Plant Journal* 12: 223-227
- SCHIERUP MH 1998. The number of self-incompatibility alleles in a finite, subdivided population. *Genetics* 149: 1153-1162
- SCHMIDT H, EM TIMMANN 1997. On the genetics of incompatibility in sweet cherries. I. Identification of S alleles in self incompatible cultivars. *Gartenbauwissenschaft* 62: 102-105
- SCHMIDT H, B WOLFGRAM, R BOŠKOVIĆ 1999a. Befruchtungsverhältnisse bei Süßkirschen. *Erwerbsobstbau* 41: 42-45
- SCHMIDT H, M BURGHARDT, A WILLERS, M RADIES, EM TIMMANN, K KÖPCKE, M SCHULZE, C KETZEL 1999b. Züchtung von Süßkirschen in Ahrensburg. *Erwerbsobstbau* 41: 119-122
- SLATKIN M 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65
- STEINBACHS JE, KE HOLSINGER 1999. Pollen transfer dynamics and the evolution of gametophytic self-incompatibility. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 770-778
- STEINER W 1992. Inkompatibilitäts-Systeme bei Pflanzen und ihre populationsgenetische Bedeutung. *Göttingen Research Notes in Forest Genetics* No. 12: 1-129
- STEINER W, H-R GREGORIUS 1994. Single locus gametophytic incompatibility: the symmetric equilibrium is globally asymptotically stable. *Journal of Mathematical Biology* 32: 515-520
- STEINER W, H-R GREGORIUS 1995. A supplementary note on the dynamics of the model of gametophytic incompatibility. *Journal of Mathematical Biology* 33: 577-580
- STEINER W, H-R GREGORIUS 1999. Incompatibility and pollen competition in *Alnus glutinosa*: Evidence from pollination experiments. *Genetica* 105: 259-271
- STERN K, PMA TIGERSTEDT 1974. *Ökologische Genetik*. G. Fischer Verlag, Stuttgart: 1-211
- STIMM B, F BERGMANN 1994. Genetische Untersuchungen an Fichtenrotten der subalpinen Waldstufe mit Hilfe von Isoenzym polymorphismen. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen* 145: 401-411

- STÖSSER R 1966. Befruchtungsbiologische und embryologische Untersuchungen bei der Süßkirsche (*Prunus avium* L.). Arbeiten der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim 37: 1-112
- STÖSSER R 1980. Über das Wachstum von Pollenschläuchen bei *Prunus*, dargestellt anhand von Schnittpräparaten. Angewandte Botanik 54: 319-327
- STRASBURGER E, F NOLL, H SCHENCK, AFW SCHIMPER 1983. Lehrbuch der Botanik. Neubearbeitung: DENFFER D VON, H ZIEGLER, F EHRENDORFER, A BRESINSKY. 32. Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena: 1-1161
- TAO R, H YAMANE, A SUGIURA, H MUAYAMA, H SASSA, H MORI 1999. Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for *S*-RNases in sweet cherry. Journal of the American Society of Horticultural Science 124: 224-233
- TSUKAMOTO T, T ANDO, H KOKUBUN, H WATANABE, M MASADA, X ZHU, E MARCHESI, TH KAO 1999. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. Sexual Plant Reproduction 12: 6-13
- TURCEK FJ 1961. Ökologische Beziehungen der Vögel und Gehölze. Verlag der slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava: 1-329
- WALDSCHMIDT M 1992. Die Tell-Methode zur Werbung von Knospen an Alt-Buchen. Allgemeine Forstzeitschrift 47: 1008-1009
- WANG K 2001. Gene flow and mating system in European beech (*Fagus sylvatica* L.). Cuvillier Verlag, Göttingen. 1-160
- WHITEHOUSE HLK 1950. Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of angiosperms. Annals of Botany, Newsletter Series 54, 198-216
- WILSON CM 1971. Plant nucleases III. Polyacrylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. Plant Physiology 48:64-68
- WRIGHT S 1939. The distribution of self-sterility alleles in populations. Genetics 24: 538-552
- WRIGHT S 1960. On the number of self-incompatibility alleles maintained in equilibrium by a given mutation rate in a population of given size: a reexamination. Biometrics 16: 61-85
- WRIGHT S 1964. The distribution of self-sterility alleles in populations. Evolution 18: 609-619
- WRIGHT S 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago. 1-580

Anhang

Labormethodik

Für alle Laboruntersuchungen wurde grundsätzlich ionengetauschtes und destilliertes Wasser (H₂O) verwendet.

1. Stärkegelelektrophorese

Es wurde das Verfahren der horizontalen Stärkegelelektrophorese angewendet, das sich in drei Hauptarbeitsschritte Aufbereitung der Proben, Durchführung der Elektrophorese und Visualisierung der Isoenzyme durch histochemische Nachweise gliedern läßt.

(1) *Probenaufbereitung.* Als Untersuchungsmaterial lagen ruhende und angetriebene Knospen, frisch ausgetriebene Blätter und ruhende Samen vor. Die Unterschiedlichkeit der Gewebe hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe, wie Fette, Polysaccharide oder Phenole, machen im Regelfall unterschiedliche Extraktions- bzw. Homogenisierungspuffer erforderlich. Dieses Vorgehen würde jedoch bei einem direkten Vergleich zu methodischen Inkompatibilitäten führen, da der Homogenisierungspuffer die Wanderungsgeschwindigkeit der extrahierten Isoenzyme mitbestimmt. Um eine Vergleichbarkeit der Isoenzyme unterschiedlicher Gewebearten herzustellen, wurde ein für alle Gewebe einheitlicher Homogenisierungspuffer mit folgender Zusammensetzung benutzt. Einer Grundlösung, die aus 800 mg Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) auf 100 ml H₂O besteht und mit 1 n HCl auf pH 7.5 titriert wird, wird auf 100 ml 3 g lösliches Polyvinylpyrrolidon (PVP), 5 g Saccharose, 50 mg Äthylen-diamin-tetra-essigsäure (EDTA), 100 mg 1,4-Di-thio-erythritol (DTE) und 50 mg 1,4-Di-thio-threitol (DTT) zugesetzt. Wegen der Instabilität einiger Ingredienzien empfiehlt es sich den Puffer nicht länger als 14 Tage zu benutzen und bedarfsorientiert entsprechende Mengen der Puffers anzusetzen. Pro Probe werden etwa 80 µl Homogenisierungspuffer benötigt. Der Extrakt wird in 4 x 6 mm großen Filterpapieren aufgenommen, was die Untersuchungen von bis zu 35 Proben pro Gel zuläßt.

Knospen- und Blattmaterial wurde entweder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -60 °C aufbewahrt oder unmittelbar nach der Ernte untersucht. Bei den Knospen werden zunächst die Knospenschuppen entfernt und dann der Vegetationkegel, der bereits Blattvorstufen enthält, herauspräpariert. Je nach Größe und Entwicklungszustand der Knospe werden 2 bis 8 Vegetationskegel oder bei frischen Blättern ein bis zu daumennagelgroßes Stück für die Elektrophorese benötigt.

Soweit die Samen nicht als vollständig aufbereitete Samenprobe bezogen werden konnten, wurden von den Kirschen nach der Ernte das Fruchtfleisch entfernt und die Samen anschließend lufttrocknet. Alle getrockneten Samen wurden bei 4 °C bis zur Untersuchung eingelagert. Durch Aufbrechen der Samenschale mit Hilfe einer Gartenschere erhält man den Embryo einschließlich Speichergewebe. Etwa ein Viertel des vorhandenen Gewebes ist für die Extraktion der Isoenzyme ausreichend.

(2) *Angewandte Trennsysteme.* Im wesentlichen lassen sich die Trennsysteme durch die Eigenschaften der Gel- und Elektrodenpuffer unterscheiden. Bei der Verwendung

von mit H₂O diluтиerten Elektrodenpuffern als Gelpuffer spricht man von kontinuierlichen Trennsystemen, während die Verwendung hinsichtlich ihrer Ionenzusammensetzung eigenständiger Gel- und Elektrodenpuffer diskontinuierliche Systeme kennzeichnet.

Ein Stärkegel besteht aus flüssigen (Gelpuffer) und festen Komponenten (Stärke, Saccharose). Die im Folgenden mitgeteilten Konzentrations- und Mengenangaben gelten für ein etwa 6 mm dickes Stärkegel mit den Außenmaßen 263 x 115 mm. Da elektrische Widerstand des Gels im wesentlichen von dessen Dicke abhängt, sind die folgenden Angaben zu angelegter Stromstärke und Dauer des Trennvorgangs nur für die hier verwendeten Stärkegele gültig. Für andere Gelzusammensetzungen und -mengen müßten die entsprechenden Werte empirisch ermittelt werden.

Folgende kontinuierliche Trennsysteme wurden verwendet (Enzyme in Klammern):
TRIS-Citrat pH 7.0 (MDH, ACO, PGI)

163,5 g TRIS und 90,4 g Zitronensäure, in 10 l H₂O gelöst, ergeben den Elektrodenpuffer mit einem pH-Wert von 7.0. Ein Gel mit der Konzentration 12% setzt sich aus 225 ml Gelpuffer, der aus 45 ml Elektrodenpuffer und 180 ml H₂O gemischt wird, 27 g Stärke und 5,4 g Saccharose zusammen. Die Trenndauer beträgt bei 180 mA 6 Stunden.

TRIS-Maleat pH 7.5 (SKDH, 6PGDH, IDH, PGM)

Die Lösung aus 120 g TRIS und 50 g Maleinsäure erzeugt den Elektrodenpuffer mit einem pH-Wert von 7.5. Für den Gelpuffer wird eine konzentrierte Lösung aus TRIS (8,8 g/l), Maleinsäure (0,5 g/l), Histidin-HCl (10,5 g/l) und EDTA (0,4 g/l) mit H₂O im Verhältnis 1 : 1,3 verdünnt. Ein 12-%iges Gel setzt sich, wie bei TRIS-Citrat pH 7.0, aus 225 ml Gelpuffer, 27 g Stärke und 5,4 g Saccharose zusammen. Die Trenndauer beträgt bei 180 mA ebenfalls 6 Stunden.

Das folgende diskontinuierliche Trennsystem wurde benutzt (Enzyme in Klammern):
ASHTON pH 8.5 (AP, GOT, PPO)

Der Elektrodenpuffer setzt sich aus 118 g Borsäure und 12 g Lithiumhydroxid, die in 10 l H₂O gelöst werden, zusammen. 6,2 g/l TRIS und 1,1 g/l Zitronensäure ergeben den Gelpuffer, der durch Zugabe von 1,5% Elektrodenpuffer gebrauchsfertig wird. Ein Gel mit der Konzentration 12% besteht aus 225 ml Puffer (221,6 ml Gel- und 3,4 ml Elektrodenpuffer), 27 g Stärke und 5,9 g Saccharose. Die Trenndauer beträgt bei 80 mA, wie bereits für die beiden anderen Trennsysteme beschrieben, 6 Stunden, wobei die Stromstärke systembedingt bis zum Ende der Trennzeit um mindestens die Hälfte abfällt.

(3) *Histochemische Nachweise der Isoenzyme.* Nach der Trennung werden die einzelnen Gele in ca. 1,5 mm dicke Scheiben geschnitten und mittels allgemeiner Standardrezepturen für den enzymespezifischen, histochemischen Nachweis angefärbt, wie sie bei CHELIAK & PITEL 1984 für die hier verwendeten Enzymsysteme mit Ausnahme von PPO angegeben sind. Für PPO existieren mehrere unterschiedliche Färbvorschriften (BERGMANN pers. Mitteilung). In der vorliegenden Untersuchung wurden für die Anfärbung der Gelscheibe nach VAN LOON (1971) durchgeführt. 200 mg 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) werden in 40 ml TRIS-HCl-Puffer pH 7.5 gelöst. Die Gelscheibe wird in der Farblösung bei Raumtemperatur abgedunkelt für ca. eine Stunde mechanisch geschüttelt, bevor die Zymogramme sichtbar werden.

2. Isoelektrische Fokussierung

Für die RNase-Untersuchungen wurde ein spezielles Verfahren der Elektrophorese, die vertikale isoelektrische Fokussierung (IEF), angewendet. Die wesentlichen Arbeitsprozesse sind bei BOŠKOVIĆ und TOBUTT (1996) beschrieben, die im Folgenden kurz wiedergegeben werden.

(1) *Probenaufbereitung.* Griffel von Kirschenblüten mit den anhängenden Fruchtknoten stellen das Untersuchungsmaterial dar. Der für die Extraktion verwendete Homogenisierungspuffer besteht aus einer Mischung von 30 ml Di-methyl-sulfoxid (DMSO) und 70 ml H₂O, der 10 g Saccharose, 100 mg Natrium-meta-bisulfit, 200 µl Pharmalyte pH 3 - 10 und 500 µl Triton X-100 zugesetzt werden. Für jeden Griffel werden 100 µl Extraktionspuffer benötigt. Prinzipiell ist es möglich sowohl Frisch- als auch Tiefkühlmaterial zu extrahieren. Die Zwischenlagerung der Griffel in der Tiefkühlung dient jedoch lediglich dem Brechen von Arbeitsspitzen, da die Materialgewinnung im Frühjahr nur in einem, auf das Jahr gesehen, relativ kurzen Zeitraum möglich ist. Nach dem Mörsern wird das Homogenat in EPPENDORF-Cups dekantiert und für eine Stunde mit 14.500 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und bei -60 °C bis zur Untersuchung gelagert.

(2) *Durchführung der Elektrophorese.* Die Trennung der Extrakte erfolgte in 0,75 mm dicken Polyacrylamidgelen, deren Außenmaße 160 x 180 mm betragen. Ein Polycarylamidgel setzt sich aus 25 ml H₂O, 3,7g Saccharose, 6,5 ml einer 7,5%igen Acrylamidlösung mit 10%igem Saccharose-Anteil, 1,4 ml Pharmalyte pH 3 - 10 für IEF, 130 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung und 50 µl Tetra-methyl-äthylen-diamin (TEMED) zusammen. Die Kathodenlösung besteht aus einer 0,1 M Natronlauge (4 g/l) und der Anodenpuffer aus 0,04 M DL-Glutaminsäure (5,42 g/l).

Bevor 10 - 20 µl Extrakt pro Probenplatz eingefüllt werden kann, muß das Gel für 30 min mit 100 V in der IEF-Apparatur vorfokussiert werden. Nach dem Einfüllen sämtlicher Proben in die taschenförmige Aussparungen auf der anodalen Seite des Gels wird die IEF mit 150 V für 1 Stunde begonnen, dann für 2 Stunden mit 300 V fortgesetzt, um nach weiteren 3 Stunden auf 450 V beendet zu werden.

(3) *Histochemischer Nachweis der S-RNasen.* Die Anfärbung der Gele folgt den Vorschriften von WILSON (1971), der nach einer 10-minütigen Vorpufferung bei pH 5.8 eine Inkubationszeit der RNA-Lösung für 20 - 30 min vorsieht. Nach einem Waschvorgang mit dem Vorpuffer für 6 - 10 min wird das Gel in 7%iger Essigsäure für nicht mehr als eine Minute fixiert und anschließend für ebenfalls eine Minute in Toluidinblau-Lösung belassen. Nach dem Abgießen der Farblösung wird das Gel in viel Leitungswasser gelagert und nach weiteren 30 min sollten die Zymogramme, die hier als Entfärbung eines blauen Hintergrundes zu erkennen sind, erscheinen.

Der Vor- und Waschpuffer besteht aus 0,1 M Natriumacetat- und 0,1 M Kaliumchlorid-Lösung, die mit Essigsäure auf pH 5.8 titriert wird. 100 ml des Vorpuffers und 100 mg RNA ergeben die RNA-Lösung. Für die Toluidinblau-Lösung werden 200 mg Toluidinblau O in 100 ml H₂O unter Zugabe von 1 ml Eisessig gelöst.