

# Autochthon oder allochthon? Ein molekulargenetischer Ansatz am Beispiel der Eichen (*Quercus* spp.) in der Schweiz

GÁBOR MÁTYÁS, PATRICK BONFILS und CHRISTOPH SPERISEN

Keywords: Autochthonous; allochthonous; chloroplast DNA; oak; Switzerland. FDK 165 : 176.1 *Quercus* (494)

**Abstract:** Autochthonous forests are considered to be valuable genetic resources, and their conservation is incorporated into many national forest programmes. The methods applied so far often do not allow to distinguish between autochthonous and allochthonous stands. Therefore, alternative methods are needed. In this study, we analyse spatial patterns of variation of chloroplast DNA to estimate the extent of the human influence on oak stands in Switzerland.

**Abstract:** Autochthone Wälder werden als wertvolle genetische Ressourcen betrachtet, und ihre Erhaltung ist Bestandteil vieler nationaler Forstprogramme. Die Unterscheidung von autochthonen und allochthonen Beständen ist mit den bisher angewandten Methoden oft nicht möglich. Alternative Ansätze sind deshalb notwendig. In dieser Studie analysieren wir räumliche Variationsmuster von DNA aus Chloroplasten, um das Ausmass des menschlichen Einflusses auf die Eichen in der Schweiz abzuschätzen.

MÁTYÁS, G.; BONFILS, P.; SPERISEN, C.: Autochthon oder allochthon? Ein molekulargenetischer Ansatz am Beispiel der Eichen (*Quercus* spp.) in der Schweiz (reviewed paper)

## Einleitung

Die Wälder Mitteleuropas sind von menschlichen Einflüssen geprägt. Die ersten Wirkungen sind auf die Besiedelung sesshafter, neolithischer Bauernkulturen vor etwa 7000 Jahren zurückzuführen (KÜSTER, 1996). Seitdem, vor allem aber während der letzten 2000 Jahre, hat die Intensität der Einwirkung menschlicher Tätigkeiten auf die Wälder durch Übernutzung, Rodung und Umwandlung stetig zugenommen. Als Folge davon gib es in Mitteleuropa nur noch wenige Urwälder. Weit mehr Wälder können hingegen als autochthon betrachtet werden. Autochthone Waldbaumpopulationen gelten wegen ihrer Angepasstheit als wertvolle genetische Ressourcen und haben heute im Waldbau und Naturschutz eine grosse Bedeutung. Ihre Erhaltung ist Bestandteil vieler nationaler Forstprogramme und ist in der Schweiz in der Strategie des Bundes zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung genetischer Ressourcen im Wald integriert (BONFILS & FINKELDEY, 1998; BONFILS & BOLLIGER, 2002).

Eine Waldbaumpopulation wird als autochthon bezeichnet, wenn sie sich seit der Besiedelung ihres Habitats kontinuierlich natürlich verjüngt hat oder künstlich mit reproduktivem Material aus der Population selbst oder aus einem nahen autochthonen Bestand erneuert wurde (KOSKI *et al.*, 1997). Populationen, welche anthropogen in ein neues Habitat verfrachtet wurden, gelten als nicht-autochthon bzw. allochthon. Von autochthonen Populationen wird angenommen, dass sie sich während ihres Evolutionsprozesses an die Umweltbedingungen ihres Standortes angepasst haben. Je nach Zeitpunkt ihrer Besiedelung erfolgte dies über viele Generationen hinweg. Entsprechend kann erwartet werden, dass allochthone Bestände weniger angepasst sind, besonders dann, wenn die Umweltbedingungen von denjenigen ihres Ursprungsorts deutlich verschieden sind (HATTEMER *et al.*, 2000).

Die Unterscheidung von autochthonen und allochthonen Beständen ist für Generhaltungsprogramme von zentraler Bedeutung (z.B. FINKELDEY *et al.*, 2000). Bisher erfolgte diese grösstenteils auf Grund forsthistorischer Recherchen (z.B. BÜRGI, 1997, 1998), Pollenanalysen (z.B. KRÁL, 1991), standortkundlicher (z.B. KELLER, 2001) oder isoenzymatischer Untersuchungen (vgl. GREGORIUS *et al.*, 1984; SCHOPPA, 2000). In vielen Fällen ist aber eine Unterscheidung mit diesen Methoden nicht möglich. Eine neue, vielversprechende Möglich-

keit eröffnet die Anwendung molekulargenetischer Techniken. Dabei wird die genetische Variation fraglicher Bestände mit dem geographischen Variationsmuster autochthoner Bestände verglichen (FERRIS *et al.*, 1997). Stimmt die Variation der überprüften Bestände mit dem Referenzmuster nicht überein, so kann von Pflanzungen mit fremdem Saatgut ausgegangen werden. Andernfalls wird angenommen, dass die überprüften Bestände autochthon sind, oder zumindest von autochthonen Beständen derselben Region stammen. Dieser Ansatz ermöglichte die Identifizierung allochthoner Eichen (FERRIS *et al.*, 1997) und Fichtenbestände (SPERISEN *et al.*, 2000). Bei der Eiche wurde dazu DNA aus Chloroplasten analysiert.

Chloroplasten-DNA (cpDNA) der Eiche wird einzig von der Mutter weitervererbt (DUMOLIN *et al.*, 1995; DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1998). Als Folge dieser Vererbungsart wird die cpDNA der Eiche im Gegensatz zu ihrer Zellkern-DNA einzig durch Samen (Eicheln) verbreitet. Da Eicheln schwer sind und natürlicherweise nur durch Tiere über grössere Distanzen transportiert werden, können sich cpDNA-Varianten (Haplotypen) nur limitiert ausbreiten und zeigen deshalb oft ein räumlich strukturiertes Vorkommen (LE CORRE *et al.*, 1997; PETIT *et al.*, 1997). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für das Erkennen allochthoner Bäume oder Bestände.

Da das Chloroplastengenom keiner sexuellen Rekombination unterliegt und eine relativ geringe Mutationsrate aufweist (FRASCARIA *et al.*, 1993), bleiben cpDNA-Linien über viele Generationen erhalten. Anhand der verwandtschaftlichen (phylogenetischen) Beziehung und der geographischen Verteilung von Haplotypen können somit die Geschichte von Populationen rekonstruiert und nacheiszeitliche Wanderungswege identifiziert werden. Untersuchungen von cpDNA bei acht Eichenarten in Europa zeigten insgesamt 26 verschiedene Haplotypen, die mittels phylogenetischer Analysen drei cpDNA-Linien zugeordnet werden können (DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1997, 1998; PETIT *et al.*, 2002). Jede Linie ist jeweils mit einem der drei vermuteten würmeiszeitlichen Refugialgebiete der Eichen in Spanien, in Italien und auf der Balkanhalbinsel assoziiert (vgl. BENNETT *et al.*, 1991). Die Eichen der Schweiz zeigen hauptsächlich zwei Haplotypen (FINESCHI *et al.*, 1997; MÁTYÁS, 1999): Haplotyp 1 mit Ursprung in Italien und Haplotyp 7 mit einem vermuteten Ursprung auf dem Balkan. Folglich haben Eichenpopulationen aus zwei unterschiedlichen Eiszeitrefugien zur postglazialen Wiederbesiedelung des Gebiets der heutigen Schweiz beigetragen.

Die Eichen aus Italien dürften dabei die Alpen überquert haben (MÁTYÁS & SPERISEN, 2001).

Die Eichen spielten in der Geschichte des Menschen eine wichtige Rolle. Man rechnet mit einer erheblichen Beeinflussung der schweizerischen Eichenwälder durch den Menschen seit dem Mittelalter: Damals wurde die Eiche als Grundlage für die Schweinemast sehr stark gefördert (MEYER, 1931). Ab Mitte des 18. Jahrhunderts verloren die Eichenwälder an Bedeutung und wurden während des 19. Jahrhunderts vielerorts in Nadelholzhochwälder umgewandelt (MEYER, 1931, 1937). Der Eichenanteil in der Schweiz wurde dadurch stark reduziert. Lokal wurde die Eiche aber wegen ihres Holzes weiterhin gefördert (BÜRGI, 1998). Es ist dabei anzunehmen, dass neben örtlichem Saatgut auch Saatgut aus entfernten Orten verwendet wurde.

In dieser Studie analysieren wir das räumliche Variationsmuster von cpDNA der Eichen in der Schweiz. Wir vergleichen die beobachteten cpDNA-Varianten von Beständen unbekannter Herkunft mit dem cpDNA-Variationsmuster autochthoner Bestände mit dem Ziel, das Ausmass von menschlichem Saatguttransport abzuschätzen und den möglichen Ursprung gepflanzter Eichen zu bestimmen.

## Material und Methoden

### Versuchsmaterial

Unsere Studie basiert auf der Untersuchung von MÁTYÁS & SPERISEN (2001), in der das räumliche cpDNA-Variationsmuster von Eichen aus der Schweiz und angrenzenden Regionen in Frankreich und Italien beschrieben wurde. Aus der Schweiz wurden dabei insgesamt 875 Eichen aus 148 Probeflächen untersucht. Analysiert wurden Stiel- (*Quercus robur* L.), Trauben- (*Q. petraea* [Matt.] Liebl. s.l.) und Flaumeichen (*Q. pubescens* Willd. s.l.). Die drei Arten sind nahe verwandt und weisen oft dieselben cpDNA-Varianten auf. Sie wurden deshalb zusammen betrachtet.

Die für die untersuchten Bestände zuständigen Forstämter wurden in einem Rundschreiben über unsere Studie informiert und eingeladen, Angaben über die Autochthonie bzw. Allochthonie der Bestände zu machen. 67 Bestände wurden dabei vom Forstdienst als autochthon bezeichnet. Diese Bestände dienten uns zum Erstellen eines Referenzmusters. 36 Bestände wurden als möglicherweise autochthon angegeben, von fünf Beständen war die Herkunft unbekannt, und von 33 Beständen lagen keine Angaben vor. Diese 74 Bestände wurden in unserer Studie zusammengefasst und als Bestände unbekannter Herkunft bezeichnet. Sieben Bestände wurden als allochthon angegeben.

Pro Probefläche wurde eine Zufallsstichprobe von fünf Eichen untersucht, mit Ausnahme von 16 Probeflächen, bei welchen weniger Bäume analysiert wurden. Diese Stichprobengrösse erlaubt, den dominierenden Haplotyp eines Bestandes zu erfassen. In einer Zufallsstichprobe der Grösse  $N=5$  ist nämlich ein Haplotyp, welcher in einem Bestand eine relative Häufigkeit ( $P$ ) von  $>0,5$  aufweist, mit einer Wahrscheinlichkeit ( $E$ ) von  $>97\%$  mindestens einmal vertreten ( $E=1-(1-P)^N$ , vgl. CROSSA, 1989). Aus vier Beständen wurden jeweils 50 Bäume analysiert (CH145–CH148, *Abbildung 1D*), um die Repräsentativität von fünf Bäumen für die in diesen Beständen vorkommenden Haplotypen zu überprüfen. Eine detaillierte Zusammenstellung der Angaben zu den untersuchten Beständen findet sich bei MÁTYÁS (1999).

Zusätzlich wurden 25 Bäume bekannter Herkunft aus einem Eichen-Provenienzversuch in Chavornay (Waadt) untersucht (*Tabelle 1*). Bei diesen Proben überprüften wir die angegebenen Herkunftste mit molekularen Methoden.

## Molekulargenetische Methoden

Die Extraktion von DNA aus Blatt- bzw. Knospenproben und die Identifizierung von cpDNA-Varianten erfolgten nach MÁTYÁS & SPERISEN (2001). Untersucht wurden das trnL-Intron und die DNA-Abschnitte (intergenic spacer) zwischen den Genen trnD-trnT, trnC-trnD, psaA-trnS und trnT-trnF. Diese cpDNA-Abschnitte wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt, anschliessend mit Restriktionsenzymen geschnitten und zur Identifizierung von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

### Datenauswertung

Die Auswertung des durch Gelelektrophorese ermittelten PCR-RFLP-Musters und die Bestimmung der verschiedenen Haplotypen erfolgte mit Hilfe von Referenz-DNAs, deren PCR-RFLP-Muster bekannt waren. Die Referenz-DNAs wurden von Rémy Petit (INRA, Pierroton, Frankreich) und Ulrike Csaikl (ARCS, Seibersdorf, Österreich) zur Verfügung gestellt.

Die räumliche Verbreitung der verschiedenen Haplotypen sowie ihre relativen Häufigkeiten in den Probeflächen wurden mit Hilfe eines geographischen Informationssystems (ArcView Version 3.0a, Environmental Systems Research Institute) dargestellt. Für die Schätzung der relativen Häufigkeiten der Haplotypen in einer Probefläche wurden jeweils untere und obere Konfidenzgrenzen ( $p$ ) gemäss der bei WILSON (1927) beschriebenen Formel berechnet:

$$p = \frac{P + \frac{z_k^2}{2N} \pm z_k \sqrt{\frac{P(1-P)}{N} + \frac{z_k^2}{4N^2}}}{1 + \frac{z_k^2}{N}}$$

wobei  $P$  den beobachteten Anteil eines Haplotyps in einer Stichprobe vom Umfang  $N$  bezeichnet und  $z_k$  das Konfidenzniveau bestimmt (bei einem 95% Niveau ist  $z_k=1,96$ ). Diese Formel ermöglicht, Konfidenzgrenzen für eine beliebig grosse oder kleine Stichprobe zu ermitteln (AGRESTI & COULL, 1998; NEWCOMBE, 1998).

## Ergebnisse

In den 67 autochthonen Beständen kamen drei Haplotypen vor: Haplotyp 1, 7 und 10. Haplotyp 10, der in Spanien und Westfrankreich verbreitet ist (DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1997), wurde in der Schweiz in einem einzigen Baum nachgewiesen (CH147, Büren a.A.; *Abbildung 1A*). In einer Mehrzahl der Bestände kam ausschliesslich Haplotyp 1 (22 Bestände) oder ausschliesslich Haplotyp 7 (38 Bestände) vor. Beide Haplotypen zeigten ein räumlich strukturiertes Vorkommen (*Abbildung 1A*). Haplotyp 7 kommt in der Westschweiz und östlich der Saane in der Zentral- und Ostschweiz vor. Haplotyp 1 ist auf der Alpensüdseite und im Wallis (östlich von Sion) verbreitet sowie auf der Alpennordseite in einem Gebiet, welches die Freiburger Alpen, das Gebiet der Saane, das Seeland und den östlichen Jura umfasst. Vereinzelt wurde Haplotyp 1 auch in drei Beständen in den Zentralalpen und ausschliesslich in einem Bestand am Walensee (CH40) gefunden (*Abbildung 1A*).

In den 74 Beständen unbekannter Herkunft identifizierten wir neben Haplotyp 1, 7 und 10 drei weitere Haplotypen: je eine Variante von Haplotyp 1 (1a) und 7 (7a) sowie Haplotyp 5, welcher in Südosteuropa verbreitet ist (DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1997). Die Haplotypen 1a, 5, 7a und 10 wurden jeweils in einem einzigen Baum nachgewiesen (*Abbildung 1B*): 1a in

**Tabelle 1:** Haplotypen der Eichen des Provenienzversuches in Chavornay (Waadt). Pro Provenienz wurden fünf Bäume analysiert. Die Angaben zu den Provenienzen wurden von Andreas Zingg (Eidg. Forschungsanstalt WSL, Birmensdorf) zur Verfügung gestellt.

*Table 1: Haplotypes of the oaks in the provenance trial of Chavornay (Waadt). Five trees from each provenance were analysed. Details of the provenances were provided by Andreas Zingg (Eidg. Forschungsanstalt WSL, Birmensdorf).*

Bezeichnung	Provenienz	Haplotyp pro Baum				
Chavornay 104	Herblingen (Schaffhausen, CH)	7	7	7	7	7
Chavornay 107	Jugoslawien	7	5	5	5	5
Chavornay 108	Murten (Freiburg, CH)	1	1	1	1	1
Chavornay 204	Büren a.A. (Bern, CH)	7	7	7	7	7

CH10 (Wiedlisbach), 5 in CH17 (Winterthur), 7a in CH42 (La Tour-de-Trême) und 10 in CH8 (Bern). Die räumliche Verteilung der Haplotypen 1 und 7 entsprach weitgehend dem Referenzmuster autochthoner Bestände. Eine Ausnahme bildete ein Bestand am Bodensee (CH56, Thal). Hier fanden wir Haplotyp 1 in einem Gebiet mit Haplotyp 7 (Abbildung 1B).

Die sieben allochthonen Bestände zeigten einzig Haplotyp 1 und 7 (Abbildung 1C). Alle Bestände entsprachen dem Referenzmuster autochthoner Bestände (Abbildung 1A).

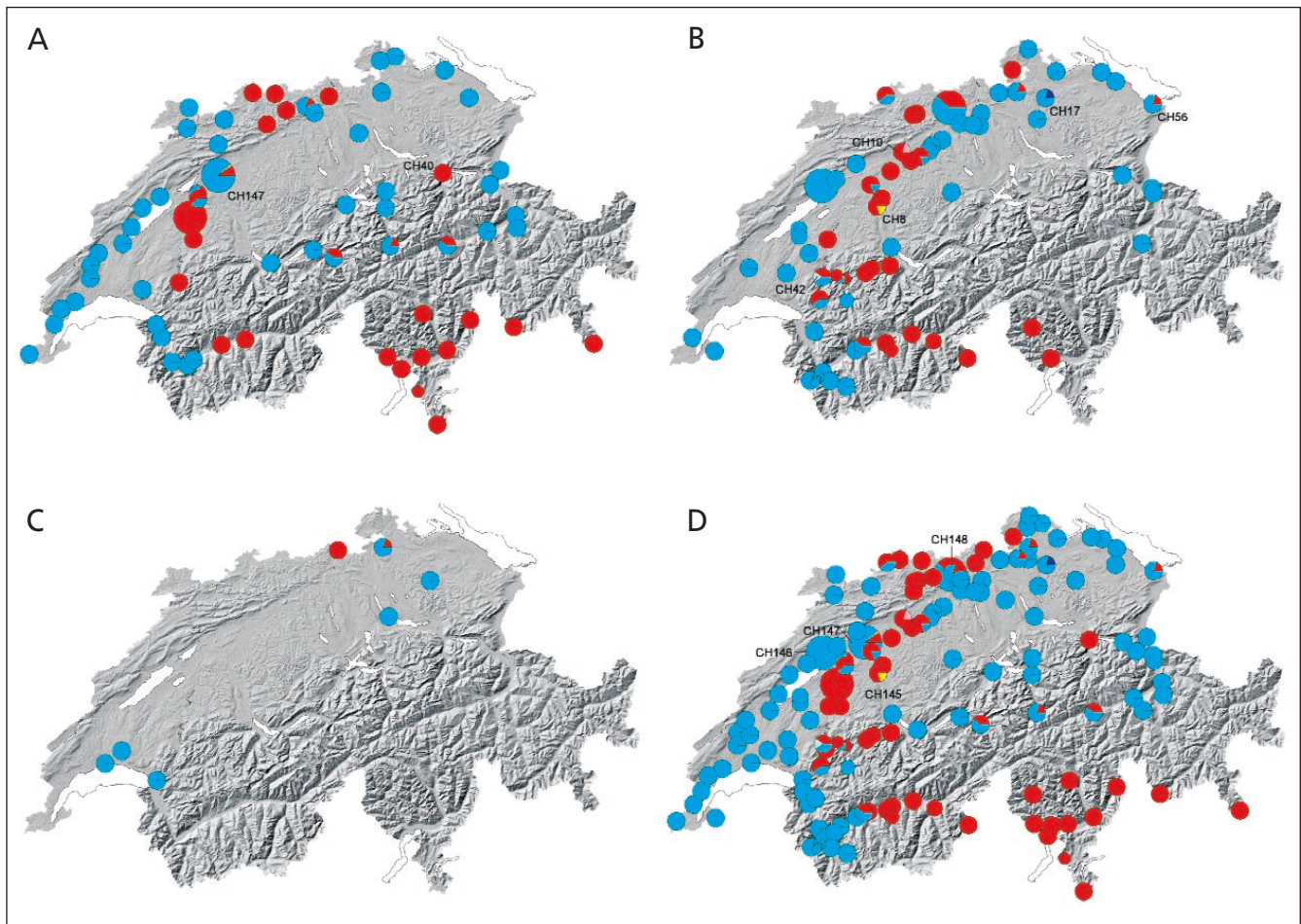
In den schweizerischen Herkunftsorten des Provenienzversuchs in Chavornay wurden ebenfalls ausschliesslich Haplotyp 1 und 7 gefunden (Tabelle 1). Ihr Vorkommen stimmt mit demjenigen

ihres Ursprungsortes überein. Die jugoslawische Provenienz zeigte in vier Eichen den südosteuropäischen Haplotyp 5 und in einer Eiche Haplotyp 7 (Tabelle 1). Da Haplotyp 7 auch in den autochthonen Beständen von Südosteuropa vorkommt (DUMOLIN-LAPÈGUE et al., 1997), kann eine jugoslawische Herkunft dieser Proben angenommen werden.

Die 95% Konfidenzintervalle der beobachteten relativen Häufigkeiten (Tabelle 2) zeigen, dass bei einem Stichprobenumfang von fünf Bäumen nur die relativen Häufigkeitswerte von 0 und 1 statistisch signifikant verschieden sind (P=0,05). Andere relative Häufigkeiten informieren hier einzig über das Vorhandensein der jeweiligen Haplotypen. Bei einem Stichprobenumfang von 50 sind hingegen die beobachteten Anteile der Haplotypen vorwiegend signifikant (Tabelle 2).

## Diskussion

Die Resultate unserer Studie zeigen, dass die in der Schweiz am häufigsten gefundenen Haplotypen 1 und 7 geographisch strukturiert vorkommen. Eine räumliche Vermischung der beiden Haplotypen war mit der Ausnahme eines Bestandes (CH56) auf Gebiete beschränkt, in welchen sich reine Vorkommen der beiden Haplotypen treffen (Abbildung 1). Die Ausdehnung



**Abbildung 1:** Räumliche Verteilung von cpDNA Haplotypen bei den Eichen in der Schweiz: Autochthone Eichenbestände (A); Bestände unbekannter Herkunft (B); allochthone Bestände (C); Gesamtheit der untersuchten Bestände (D). Die Grösse und Schattierung der Kreisdiagramme ist proportional zur Anzahl untersuchter Bäume bzw. zur Häufigkeit der Haplotypen (rot = Haplotyp 1; rosarot = Haplotyp 1a; dunkelblau = Haplotyp 5; blau = Haplotyp 7; hellblau = Haplotyp 7a; gelb = Haplotyp 10). Kartengrundlagen: BFS GEOSTAT, Bundesamt für Landestopographie.

*Figure 1: Spatial distribution of cpDNA haplotypes of oaks in Switzerland: Autochthonous stands (A); stands of unknown origin (B); allochthonous stands (C); all stands analysed (D). Symbol size and shading is proportional to sample size and frequency of haplotypes, respectively (red = haplotype 1; pink = haplotype 1a; dark blue = haplotype 5; blue = haplotype 7; light blue = haplotype 7a; yellow = haplotype 10). Map: BFS GEOSTAT, Bundesamt für Landestopographie.*

**Tabelle 2:** Relative Häufigkeiten eines beobachteten Haplotyps in den untersuchten Stichproben unterschiedlicher Grösse. Die Konfidenzgrenzen der Häufigkeitswerte sind nach WILSON (1927) berechnet und in Klammern angegeben.

Table 2: Relative frequencies of an observed haplotype in the investigated sample sizes. Confidence limits of the relative frequencies (in brackets) are calculated according to WILSON (1927).

Stichprobengrösse	Beobachteter Haplotyp	
	Anzahl	Relative Häufigkeit
1	0	0,00 (0,00–0,79)
	1	1,00 (0,21–1,00)
2	0	0,00 (0,00–0,66)
	2	1,00 (0,34–1,00)
3	0	0,00 (0,00–0,56)
	3	1,00 (0,44–1,00)
4	0	0,00 (0,00–0,49)
	4	1,00 (0,51–1,00)
5	0	0,00 (0,00–0,43)
	1	0,20 (0,03–0,62)
	2	0,40 (0,12–0,77)
	3	0,60 (0,23–0,88)
	4	0,80 (0,38–0,96)
	5	1,00 (0,57–1,00)
50	0	0,00 (0,00–0,07)
	1	0,02 (0,01–0,11)
	5	0,10 (0,04–0,21)
	19	0,38 (0,26–0,52)
	31	0,62 (0,48–0,74)
	44	0,88 (0,76–0,94)
	50	1,00 (0,93–1,00)

dieser Kontaktzonen war relativ gering, mit einer besonders schmalen Zone im Wallis. Das Verteilungsmuster der Haplotypen 1 und 7 von allochthonen Beständen (Abbildung 1C) sowie von Beständen unbekannter Herkunft (Abbildung 1B) waren weitgehend deckungsgleich mit demjenigen autochthoner Bestände (Abbildung 1A). Daraus schliessen wir, dass die menschliche Verfrachtung von Saatgut in der Schweiz gering war. Bei einer umfangreichen Verfrachtung kann davon ausgegangen werden, dass natürlich entstandene Strukturen aufgelöst werden. In verschiedenen Regionen Europas, in welchen nachweislich Saatgut verfrachtet wurde, konnten tatsächlich unstrukturierte Verteilungsmuster von Haplotypen identifiziert werden (FERRIS *et al.*, 1997; PETIT *et al.*, 2002).

Die Entstehung des beobachteten Musters durch menschliche Aktivitäten erscheint unwahrscheinlich (MATYÁS & SPERISEN, 2001). Die Besiedelung der Eichen in der Schweiz war bereits vor rund 8000 Jahren abgeschlossen, lange bevor der Mensch die Eichenwälder nachweislich zu beeinflussen begann (BURGA & PERRET, 1998). Die Menschen waren somit nicht darauf angewiesen, Eichen aus weiten Entfernungen zu ihren Siedlungen zu transportieren. Zudem konnten wir keinen plausiblen Zusammenhang zwischen dem Verbreitungsmuster der Haplotypen und Aktivitäten der Menschen seit der Römerzeit erkennen.

Auf Grund der identifizierten Haplotypen fanden wir jedoch Hinweise auf Saatguttransport über grössere Distanzen. Im Bestand CH17 (Winterthur) wurde Haplotyp 5 und in den Beständen CH8 (Bern) und CH147 (Büren a.A.) Haplotyp 10 nachgewiesen (Abbildung 1A, 1B). Diese Haplotypen sind in Südosteuropa (Haplotyp 5) bzw. Westeuropa (Haplotyp 10) verbreitet (DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1997). Nach Angabe des Forstdienstes wurden in den Beständen CH8 (Bern) und CH17 (Winterthur) tatsächlich Pflanzungen mit Eichen unbekannter Herkunft durchgeführt. Im Falle des Bestandes CH147 (Büren a.A.) wurde Haplotyp 10 bei einer am Waldrand stehenden Eiche gefunden.

Eine Pflanzung mit Saatgut allochthoner Herkunft muss also in geringem Ausmass auch für diesen als autochthon geltenden Bestand angenommen werden. Eine direkte natürliche Verfrachtung von Eichensaat durch Vögel kann bei allen drei Beständen (CH8, CH17 und CH147) wegen der grossen Distanzen (>50 km) zu den Ursprungsgebieten der Haplotypen 5 und 10 in Südost- und Westeuropa ausgeschlossen werden (vgl. STIMM & BÖSWALD, 1994; KOLLMANN & SCHILL, 1996). Möglich wäre aber ein natürlicher Transport von einem gepflanzten Bestand in der Nähe dieser Bestände.

Wir fanden auch Hinweise auf Saatguttransport auf Grund des Verteilungsmusters der Haplotypen 1 und 7. So kann die Autochthonie des Bestandes CH40 am Walensee in Frage gestellt werden, da wir in diesem Bestand einzig Haplotyp 1 fanden, in allen umliegenden Beständen aber Haplotyp 7 (Abbildung 1A). Allenfalls muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die Eichen mit Haplotyp 1 früher, beispielsweise während des Atlantikums vor etwa 5000 bis 7500 Jahren, weiter nach Norden verbreitet waren (BURGA & PERRET, 1998). Somit kann auch bei einem Baum des Bestandes CH56 (Thal) am Bodensee die Autochthonie nicht ausgeschlossen werden, auch wenn auf Grund der räumlichen Verteilung der Haplotypen 1 und 7 ein Saatguttransport in neuerer Zeit aus dem Gebiet des Haplotyps 1 wahrscheinlicher erscheint (Abbildung 1B).

Die Tatsache, dass die Autochthonie der Bestände CH40 und CH147 (Abbildung 1) in Frage gestellt werden kann, dürfte daran liegen, dass den Forstämtern Informationen über die Bewirtschaftung von Beständen vermutlich nur für die letzten 100 bis 200 Jahre zur Verfügung standen. Samentransport durch den Menschen dürfte hingegen viel früher erfolgt sein, auch wenn in einem geringen Ausmass (vgl. MEYER, 1931).

Unsere Resultate erlaubten, den möglichen Ursprung nicht-autochthoner Eichen zu bestimmen. Da alle als allochthon bezeichneten Bestände (Abbildung 1C) dem Referenzmuster autochthoner Bestände (Abbildung 1A) entsprachen, kann vermutet werden, dass das Saatgut aus der Region des jeweiligen Bestandes stammt. Hinweise auf die Herkunft des Saatguts konnten wir auch für den Eichen-Altbestand des Galm-Waldes (CH145, Abbildung 1D) finden. Dieser Bestand wird als autochthon betrachtet (BONFILS, 1995). Aus geschichtlichen Quellen ist bekannt, dass 1713 im Galm auf zwei Parzellen von 70 bzw. 100 ha Eichen gesät oder gepflanzt worden sind (MEYER, 1931; JAQUET, 1986). Ungefähr 15 ha des heutigen Eichenwaldes stammen aus jener Zeit und bilden heute einen wichtigen Teil des 1993 eingerichteten Eichen-Genreservates (BONFILS, 1995). Die Untersuchung von 50 Alteichen ergab nun für alle Bäume den Haplotyp 1, welcher auf Grund der Haplotypenverbreitung typisch für diese Region ist. Die Eicheln zur Begründung des 170 ha grossen Eichenbestandes müssen damit 1713 in unmittelbarer Umgebung des heutigen Standortes gesammelt worden sein. Wäre das Saatgut weiter westlich oder nördlich gesammelt worden, so müssten im Altbestand auch Eichen mit Haplotyp 7 gefunden werden (vgl. Abbildung 1D).

In unserer Studie analysierten wir vorwiegend fünf Bäume pro Bestand. Mit dieser Stichprobengrösse konnten wir nur die jeweils dominierenden Haplotypen nachweisen. Es ist deshalb nicht auszuschliessen, dass weitere nicht erfasste Haplotypen in einzelnen Beständen mit einer maximalen relativen Häufigkeit von bis zu 43% vorkommen (vgl. 95% Konfidenzgrenzen in Tabelle 2 sowie HANLEY & LIPPMAN-HAND, 1983). Allerdings wurde bei der Analyse von jeweils 50 Bäumen nur in einem einzigen (CH147) der vier intensiv untersuchten Bestände ein zusätzlicher Haplotyp identifiziert (Haplotyp 10; Abbildung 1D). Die intensive Analyse von Beständen lässt zudem vermuten, dass ein ganzer Eichenbestand denselben Haplotyp aufweisen kann (vgl. CH145 und CH146 in Abbildung 1D). Zusätzlich zeigt die intensive Analyse, dass mit der

verwendeten Stichprobengröße der in den Beständen dominierende cpDNA-Typ, zumindest in den vier intensiv untersuchten Beständen, nachgewiesen werden konnte.

Die Resultate unserer Studie ermöglichten, die Autochthone einzelner Bäume bzw. Bestände zu überprüfen und Angaben über die Herkunft gepflanzter Eichen zu machen. Die Verteilung von Haplotypen in der Schweiz und in Europa liess zudem die Herkunft der im Provenienzversuch von Chavornay untersuchten Eichen bestätigen. In unserer Studie identifizierten wir insgesamt sechs Haplotypen (1, 1a, 5, 7, 7a, 10), wovon zwei (5 und 10) ihr Verbreitungsgebiet zweifelsfrei ausserhalb der Schweiz haben. Zwei Haplotypen (1a und 7a) konnten dagegen bislang ausschliesslich in der Schweiz bei jeweils einem Probestand in den Beständen CH10 (Wiedlisbach) und CH42 (La Tour-de-Trême) gefunden werden. Das Vorhandensein dieser seltenen Haplotypen erlaubt es, lokalen Saatguttransport im Gebiet der Probestellen CH10 und CH42 zu identifizieren. Sollte es das Ziel sein, kleinräumigen Samentransport innerhalb der Schweiz nachzuweisen, so sind zusätzliche cpDNA-Varianten notwendig.

In unserer Studie haben wir nur einen kleinen Teil des Chloroplastengenoms untersucht und somit nur einen Teil der mutmasslich vorhandenen Variation erfasst. Mit der Analyse weiterer cpDNA-Fragmente könnten zusätzliche Varianten identifiziert werden. Da bei Eichen auch die DNA aus Mitochondrien (Zellorganelle zur Bereitstellung von Energie in Zellen) maternal vererbt wird (DUMOLIN *et al.*, 1995), könnten Marker von diesem Genom verwendet werden. Je detaillierter das räumliche Variationsmuster der Chloroplasten- bzw. Mitochondrien-DNA bekannt ist, desto effizienter könnte kleinräumiger Samentransport nachgewiesen werden.

Mit dem hier präsentierten Forschungsansatz leiteten wir Information über Autochthone bzw. Allochthone auf Grund von Haplotypen-Verbreitungsmustern heutiger Eichen ab. Direktere Information könnte durch den Vergleich des Variationsmusters von DNA aus fossilem Material mit DNA heutiger Eichen gewonnen werden. Molekulargenetische Untersuchungen von datierten Makrofossilien von Eichen (vgl. DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1999) sollen dies in Zukunft ermöglichen.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit untersuchten wir, ob und in welchem Ausmass der Mensch Saatgut von Stiel-, Trauben- und Flaumeiche über grössere Distanzen in die Schweiz und innerhalb der Schweiz transportiert hatte. Information über Saatguttransport leiteten wir vom geographischen Verteilungsmuster der Variation von Chloroplasten-DNA (cpDNA) ab. Das Untersuchungsmaterial umfasste 875 Eichen aus 148 Probestellen in der Schweiz. CpDNA-Variation wurde durch Restriktionsenzym-Verdauung von mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifizierten cpDNA-Fragmenten nachgewiesen. Die Analyse der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) liess sechs verschiedene cpDNA-Typen (Haplotypen) erkennen. Zwei davon (Haplotyp 1 und 7) waren sehr häufig und kamen geographisch strukturiert vor. Die restlichen vier Haplotypen waren sehr selten (1 Baum pro Haplotyp). Das räumlich strukturierte Verteilungsmuster der zwei häufigsten Haplotypen, die mit unterschiedlichen nacheiszeitlichen Rückwanderungswegen assoziiert sind, weist darauf hin, dass der anthropogene Samentransport in der Schweiz gering gewesen ist. Bei einigen wenigen Probestellen fanden wir Hinweise dafür, dass Eichensaatgut über grössere Distanzen in die Schweiz transportiert wurde. Wir zeigen hier die Nützlichkeit molekularer Methoden zur Überprüfung der Autochthone einzelner Baumindividuen bzw. Bestände und diskutieren die statistische Signifikanz der Untersuchungsergebnisse.

## Summary

### Autochthon or allochthon? A molecular genetic method of determination using oak (*Quercus* spp.) in Switzerland as an example

In this study we examined whether and to what extent seeds of pedunculate, sessile, and pubescent oaks have been translocated by humans over long distances into and within Switzerland. Information on seed transfer was inferred from the geographic pattern of chloroplast DNA (cpDNA) variation. We analysed a total of 875 oaks from 148 collection sites in Switzerland. The variation of cpDNA was characterised by amplification of cpDNA fragments using polymerase chain reaction (PCR) followed by digestion with restriction enzymes. The analysis of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) allowed the identification of six different cpDNA types (haplotypes). Two of them (haplotype 1 and 7) were very frequent and occurred geographically structured. The remaining four haplotypes were very rare (one tree per haplotype). The spatially structured distribution of the two most frequent haplotypes, which are associated with different postglacial recolonisation pathways, reveals that seed transfer by humans has been low in Switzerland. In some few collection sites, we found evidence that acorns were transported over longer distances into Switzerland. We show here the usefulness of molecular methods for the verification of the autochthony of single trees or whole forests and discuss the statistical significance of the results presented.

## Résumé

### Autochtone ou allochtone? Une étude de la génétique moléculaire à l'exemple des chênes (*Quercus* spp.) en Suisse

Pour trois chênes indigènes (pédunculé, sessile et pubescent), nous avons étudié l'importance des transports de semences par l'homme jusqu'en Suisse ainsi qu'à l'intérieur du pays. Nos résultats sont déduits de la distribution géographique de la variation de l'ADN des chloroplastes (ADNcp) identifiés dans 875 chênes provenant de 148 placettes. La variation de l'ADNcp a été détectée par amplification de fragments d'ADNcp en chaîne par polymérase (PCR) et leur digestion par des enzymes de restriction. L'analyse de polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) a permis d'identifier six variantes de l'ADNcp (haplotypes). Deux d'entre eux (haplotypes 1 et 7) étaient très fréquents et présentaient une distribution géographique structurée. Les quatre autres étaient rares (1 à 5 arbres par haplotype). La distribution spatiale des haplotypes 1 et 7, qui sont associés à deux voies de recolonisation postglaciaire distinctes, indique que le transport de semences par l'homme n'était pas très important en Suisse. Dans quelques placettes, nous avons constaté les traces d'une importation dans notre pays de semences qui avaient été transportées sur de longues distances. Nous démontrons ainsi l'utilité des techniques moléculaires pour la vérification de l'autochthone d'arbres ou de peuplements forestiers et discutons de la signification statistique des résultats de la recherche.

Traduction: MONIQUE DOUSSE

## Literatur

- AGRESTI, A. and COULL, B.A. (1998): Approximate is better than «exact» for interval estimation of binomial proportions. *Am. Statistician* 52: 119–126.
- BENNETT, K.D., TZEDAKIS, P.C., WILLIS, K.J. (1991): Quaternary refugia of north European trees. *J. Biogeography* 18: 103–115.
- BONFILS, P. (1995): Erhaltung genetischer Ressourcen im Wald, Genreservat Galm. Schweiz. Z. Forstwes. 146: 295–303.

- BONFILS, P. und BOLLIGER, M. (2002): Wälder von besonderem genetischen Interesse (BGI-Wälder). Grundlagen, Ziele und Einrichtung. Buwal, Bern, im Druck.
- BONFILS, P. und FINKELDEY, R. (1998): Das schweizerische Programm zur Erhaltung forstgenetischer Ressourcen. In: Geburek, T., Heinze, B. (Hrsg.): Erhaltung genetischer Ressourcen im Wald: Normen, Programme, Massnahmen. Ecomed Verlag, Landsberg: 136–150.
- BURGA, C.A. und PERRET, R. (1998): Vegetation und Klima der Schweiz seit dem jüngeren Eiszeitalter. Ott Verlag, Thun, 805 S.
- BÜRGI, M. (1997): Zum Eichenhochwald in der Schweiz. Beitr. Forstwirtschaft. Landsch.ökol. 31: 145–150.
- BÜRGI, M. (1998): Waldentwicklung im 19. und 20. Jahrhundert. Veränderungen in der Nutzung und Bewirtschaftung des Waldes und seiner Eigenschaften als Habitat am Beispiel der öffentlichen Waldungen im Zürcher Unter- und Weinland. Beih. Schweiz. Z. Forstwes. Nr. 84 (= Diss. Nr. 12152 ETH Zürich), 234 S.
- CROSSA, J. (1989): Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops. Theor. Appl. Genet. 77: 153–161.
- DUMOLIN, S., DEMESURE, B., PETIT, R.J. (1995): Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. Theor. Appl. Genet. 91: 1253–1256.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S., DEMESURE, B., FINESCHI, S., LE CORRE, V., PETIT, R.J. (1997): Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. Genetics 146: 1475–1487.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S., PEMONGE, M.-H., PETIT, R.J. (1998): Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. Mol. Biol. Evol. 15: 1321–1331.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S., GIELLY, L., PEMONGE, M.-H., TABERLET, P., PETIT, R.J. (1999): Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. Mol. Ecol. 8: 2137–2140.
- FERRIS, C., DAVY, A.J., HEWITT, G.M. (1997): A strategy for identifying introduced provenances and translocations. Forestry 70: 211–222.
- FINESCHI, S., BALIJA, A., DIARRA, A., SCUDERI, G., TAURICHINI, D. (1997): Chloroplast DNA polymorphism in oak populations (*Quercus* L. sect. *Robur* Reichenb.) from Switzerland. Inf. Bot. Ital. 29: 318–319.
- FINKELDEY, R., MÁTYÁS, G., SPERISEN, C., BONFILS, P. (2000): Strategien zur Auswahl forstlicher Genreservate in der Schweiz. For. Snow Landsc. Res. 75: 137–152.
- FRASCARIA, N., MAGGIA, L., MICHAUD, M., BOUSQUET, J. (1993): The rbcL gene sequence from chestnut indicates a slow rate of evolution in the *Fagaceae*. Genome 36: 668–671.
- GREGORIUS, H.-R., HATTEMER, H.H., BERGMANN, F. (1984): Über Erreichtes und kaum Erreichbares bei der «Identifikation» forstlichen Vermehrungsguts. Allg. Forst- Jagdztg. 155: 201–214.
- HANLEY, J.A. and LIPPMAN-HAND, A. (1983): If nothing goes wrong, is everything all right? J. Am. Med. Assoc. 249: 1743–1745.
- HATTEMER, H.H., ZIEHE, M., GEHLE, T., FROMM, M. (2000): Genetische Aspekte der Erhaltungsbilogie von Holzpflanzen. For. Snow Landsc. Res. 75: 9–28.
- JAQUET, C. (1986): Recherches sur le degré d'hybridation des chênes dans la forêt cantonale du Galm en relation avec la station et la gestion antérieure. Diplomarbeit Nr. 336 ETH Zürich, Professur Waldbau, 73 S.
- KELLER, W. (2001): Zur soziologischen Bindung des Speierlings (*Sorbus domestica* L.). Mitt. Nat.forsch. Ges. Schaffhausen 46: 101–125.
- KOLLMANN, J. and SCHILL, H.-P. (1996): Spatial patterns of dispersal, seed predation and germination during colonisation of abandoned grassland by *Quercus petraea* and *Corylus avellana*. Vegetatio 125: 193–205.
- KOSKI, V., SKRØPPA, T., PAULE, L., WOLF, H., TUROK, J. (1997): Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). International Plant Genetic Resources Insitute, Rome, 42 S.
- KRAL, F. (1991): Die Anwendung der Pollenanalyse im Rahmen forstlicher Fragestellungen. Veröffentlichung des Institutes für Waldbau an der Universität für Bodenkultur in Wien, 78 S.
- KÜSTER, H. (1996): Auswirkungen von Klimaschwankungen und menschlicher Landschaftsnutzung auf die Arealverschiebung von Pflanzen und die Ausbildung mitteleuropäischer Wälder. Forstwiss. Cent.bl. 115: 301–320.
- LE CORRE, V., MACHON, N., PETIT, R.J., KREMER, A. (1997): Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study. Genet. Res. Camb. 69: 117–125.
- MÁTYÁS, G. (1999): Rekonstruktion der nacheiszeitlichen Einwanderung der Eichen in der Schweiz anhand ihrer Chloroplasten-DNA. Diss. Nr. 13386 ETH Zürich, <http://e-collection.ethbib.ethz.ch/show?type=diss&nr=13386>, 144 S.
- MÁTYÁS, G. and SPERISEN, C. (2001): Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial re-colonisation of oaks (*Quercus* spp.) across the Swiss Alps. Theor. Appl. Genet. 102: 12–20.
- MEYER, K.A. (1931): Geschichtliches von den Eichen in der Schweiz. Mitt. Eidgenöss. Forsch.anst. Wald Schnee Landsch. 16: 231–481.
- MEYER, K.A. (1937): Holzartenwechsel und frühere Verbreitung der Eiche in der Westschweiz. 1. Kanton Neuenburg. Mitt. Eidgenöss. Forsch.anst. Wald Schnee Landsch. 20: 115–242.
- NEWCOMBE, R.G. (1998): Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. Statistics in Medicine 17: 857–872.
- PETIT, R.J., PINEAU, E., DEMESURE, B., BACILIERI, R., DUCOUSSO, A., KREMER, A. (1997): Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9996–10001.
- PETIT, R.J., BREWER, S., BORDÁCS, S., BURG, K., CHEDDADI, R., COART, E., COTTRELL, J., CSAIKL, U.M., VAN DAM, B.C., DEANS, J.D., ESPINEL, S., FINESCHI, S., FINKELDEY, R., GLAZ, I., GOICOECHEA, P.G., JENSEN, J.S., KÖNIG, A.O., LOWE, A.J., MADSEN, S.F., MÁTYÁS, G., MUNRO, R.C., POPESCU, F., SLADE, D., TABBENER, H., DE VRIES, S.G.M., ZIEGENHAGEN, B., DE BEAULIEU, J.-L., KREMER, A. (2002): Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. For. Ecol. Manage. 156: 49–74.
- SCHOPPA, F.N. (2000): Konsequenzen wald- und forstgeschichtlicher Entwicklungen für die aktuelle genetische Zusammensetzung von Waldbaumpopulationen in Mitteleuropa. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2000/schoppa/inhalt.htm>, 162 S.
- SPERISEN, C., BÜCHLER, U., MÁTYÁS, G., ACKZELL, L. (2000): Mitochondrial DNA variation provides a tool for identifying introduced provenances: A case study in Norway spruce. Mitt. Bundesforsch.anst. Forst- Holzwirtschaft. 198: 83–86.
- STIMM, B. und BÖSWALD, K. (1994): Die Häher im Visier: zur Ökologie und waldbaulichen Bedeutung der Samenausbreitung durch Vögel. Forstwiss. Cent.bl. 113: 204–223.
- WILSON, E.B. (1927): Probable inference, the law of succession, and statistical inference. J. Am. Stat. Assoc. 22: 209–212.

#### Dank

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1996 bis 1999 an der Eidgenössischen Forschungsanstalt WSL. Sie ist ein Teil des Buwal-Projektes «Erhaltung genetischer Ressourcen im Wald» sowie eines Projektes der Europäischen Union. Ohne die Infrastruktur der WSL sowie Unterstützung von zahlreichen Personen und Institutionen wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien hier genannt: Reiner Finkeldey, Silvia Fineschi, Ottmar Holdenrieder, Gerhard Müller-Starck, Rémy Petit, Ulrike Csakl, Beat Müller, Martin Hägeli, Urs Büchler, Esther Jung, Nicole Specht, Urs Lauber, Marcus Ulber, Beat Sperisen und Felix Gugerli. Ihnen allen sei für Ihre Hilfe herzlich gedankt. Wir möchten uns zudem auch bei allen Forstämtern bedanken, die mit ihrer Unterstützung zu dieser Studie beigetragen haben. Finanziert wurde sie durch das Buwal und das BBW für die EU-Projekte «Synthetic maps of gene diversity and provenance performance for utilization and conservation of oak genetic resources in Europe» (FAIR1 PL95-0297) und «Dynamics of forest tree biodiversity: linking genetic, palaeogenetic and plant historical approaches» (EVK2-CT-1999-00036 FOSSILVA). Die Farbbildungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Eidgenössischen Forschungsanstalt WSL gedruckt.

#### Autoren

Dr. GÁBOR MÁTYÁS, Eidg. Forschungsanstalt WSL, Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf;  
Gegenwärtige Adresse: Universitäts-Kinderspital Zürich, Abteilung für Stoffwechsel und Molekulare Pädiatrie, Steinwiesstrasse 75, CH-8032 Zürich, E-Mail: gabor.matyas@kispi.unizh.ch;  
PATRICK BONFILS, dipl. Forsting. ETH, Wirtschaftsring. STV, Eidg. Forschungsanstalt WSL, Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf, E-Mail: bonfils@wsl.ch;  
Dr. CHRISTOPH SPERISEN\*, Eidg. Forschungsanstalt WSL, Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf, E-Mail: sperisen@wsl.ch.  
\*Korrespondenz an Christoph Sperisen.