

Untersuchung zur möglichen Introgression von Hybridpappelgenen in die Schwarzpappelpopulation des Nationalparks Donau-Auen

Masterarbeit

von

Melanie Micek, B.Sc.

Zur Erlangung des akademischen Grades
DiplomingenieurIn der Forstwirtschaft (Dipl.-Ing.)



Betreuer/Beurteiler: Ao. Univ. Prof. DI Dr. Eduard Hochbichler, BOKU

Mitbetreuer: DI Dr. Berthold Heinze, BFW

Eingereicht am: 01.06.2017

Institut für Waldbau
Department für Wald- und Bodenwissenschaften
der Universität für Bodenkultur Wien

Kurzfassung

Die Schwarzpappel (*Populus nigra*) ist eine Charakterbaumart des Ökosystems Auwald. Die Pflanzung von Hybridpappeln und damit einhergehend die Gefahr der Introgression von Hybridpappelgenen in die Schwarzpappelpopulationen stellt neben dem Verlust des Lebensraumes die größte Gefährdung der Schwarzpappel dar. Durch den Beitritt zur EU hat sich Österreich verpflichtet, die genetische Diversität in den heimischen Wäldern zu erhalten und den Wald als solches zu schützen.

Ziel dieser Masterarbeit ist es, die Schwarzpappelpopulation des Nationalparks Donau-Auen hinsichtlich ihrer genetischen Zusammensetzung zu analysieren, um eine mögliche Introgression von Hybridpappelgenen festzustellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung dienen in erster Linie zur genetischen Erhaltung der Schwarzpappel sowohl *in-situ* als auch *ex-situ*.

Das gewonnene genetische Material von 317 Jungwuchspflanzen und 122 Altbäumen ist Grundlage dieser Untersuchung, im Zuge derer auch Vaterschaftsanalysen vorgenommen und Verbreitungstendenzen dargestellt werden. Im ersten Schritt der Auswertung wird der Genort WIN3 betrachtet, in weiterer Folge werden 17 Genorte im Zellkern durch Mikrosatellitenanalysen auf das Vorhandensein von Hybridpappelgenen unter Verwendung der Programme R 3.3.2, RStudio 1.0.44 Package PoppR 2.3.0, Cervus 3.0.7, GenAlEx 6.502 und Structure 2.3.4 analysiert.

Eine Introgression von Hybridpappelgenen in den Jungwuchs der Schwarzpappelpopulation des Nationalparks Donau-Auen im Ausmaß von rund 9,8 % konnte im Zuge dieser Masterarbeit nachgewiesen werden.

Schlüsselworte: Introgression, *Populus nigra*, Schwarzpappel, Nationalpark Donau-Auen

Abstract

The black poplar (*Populus nigra*) is one of the characteristic species of riparian forests. Plantation of hybrid poplars associated with the risk of hybrid poplar gene introgression in the populations of black poplars and the loss of habitat endanger the distribution of the black poplar.

By the accession to the EU, Austria committed among others to protect the genetic diversity of indigenous species and woodlands.

The ambition of this master thesis is to analyse the genetic composition of the black poplar population located in the Danube National Park to determine if hybrid poplar gene introgression in the black poplar population is taking place. The findings of this thesis are the basis for *in-situ* and *ex-situ* conservation of black poplars.

The genetic material of 317 offspring and 122 adult black poplars is investigated, paternity analysis is made and distribution-tendencies are shown.

First of all the gene locus WIN3 is analysed, in further consequence 17 nuclear gene loci are investigated for the presence of hybrid poplar genes through microsatellite analysis. The programs R 3.3.2, RStudio 1.0.44 Package PoppR 2.3.0, Cervus 3.0.7, GenAlEx 6.502 and Structure 2.3.4 are used for this examination.

The results show that introgression is taking place and about 9.8 % of the offspring contain hybrid poplar genes.

Keywords: Introgression, *Populus nigra*, Schwarzpappel, Danube National Park

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Verbreitung der Schwarzpappel (<i>Populus nigra</i>)	1
1.2.	Aktuelle Situation der Schwarzpappel in Österreich	2
1.3.	Rahmenbedingungen zur Erhaltung der Schwarzpappel in Österreich.....	2
1.3.1.	Vogelschutzrichtlinie und FFH-Richtlinie der EU	2
1.3.2.	Ministerkonferenz zum Schutz der Wälder in Europa	3
1.3.3.	Erhaltung der Schwarzpappel nach EUFORGEN	4
1.3.3.1.	Ex-situ	4
1.3.3.2.	In-situ	4
1.4.	Motivation.....	5
1.5.	Fragestellung	5
2.	Biologie der Schwarzpappel	6
2.1.	Beschreibung	6
2.1.1.	Fortpflanzung und Vermehrung.....	6
2.1.2.	Standortansprüche.....	7
2.2.	Ursachen der Gefährdung der heimischen Schwarzpappel.....	8
2.2.1.	Hybridisierung	8
2.2.1.1.	Introgression.....	9
2.2.1.2.	Gemischterbige Pflanze höherer Generation	10
2.2.2.	Verlust von Lebensraum	10
2.3.	Nutzung.....	11
3.	Der Nationalpark Donau-Auen.....	12
3.1.	Untersuchungsgebiet	13
3.1.1.	Lage.....	13
3.1.2.	Klima.....	13
3.1.3.	Hydrologie.....	13
3.1.4.	Harte und weiche Au	14
3.1.4.1.	Weichholz-Auwälder	14
3.1.4.2.	Hartholz-Auwälder	14
3.1.5.	Geologie und Boden	14
3.1.5.1.	Grauer Auboden	15
3.1.5.2.	Brauner Auboden	15
3.1.5.3.	Restboden	15
3.2.	Hybridpappelbestände im Untersuchungsgebiet	16

4.	Material und Methoden	16
4.1.	Erläuterung genetischer Grundbegriffe	17
4.2.	Auswahl der Probeflächen.....	21
4.3.	Aufnahmeverfahren.....	22
4.3.1.	Nummerierung der Proben	22
4.3.2.	GPS-Daten.....	23
4.3.3.	Probenmaterial.....	23
4.3.4.	Weitere Daten	24
4.3.5.	Tabellarische Übersicht über alle Proben	25
4.4.	Aufbereitung der Proben	29
4.4.1.	Extraktion der DNA	29
4.4.2.	WIN3 Analyse	30
4.4.3.	Mikrosatellitenanalyse im Zellkern.....	32
4.4.3.1.	Vorgehensweise	34
4.4.3.2.	Durchführung der PCR	34
4.4.3.3.	Auswertung am Kapillarelektrophorese-Gerät.....	34
4.5.	Auswertung der Mikrosatelliten	37
4.5.1.	Auswertung der CEQ-Daten.....	37
4.5.2.	Rechnerische Auswertung der Abweichungen	38
4.5.3.	R 3.3.2, RStudio 1.0.44 und PoppR 2.3.0.....	39
4.5.3.1.	Dateneingabe	39
4.5.4.	Cervus 3.0.7.....	40
4.5.4.1.	Berechnungsgrundlagen der Vaterschaftsanalyse	40
4.5.4.2.	Akzeptanz von Fehlern in der Auswertung.....	42
4.5.4.3.	Simulation der Vaterschaft.....	42
4.5.4.4.	GenAIEx 6.502 – Genetic Analysis in Excel	44
4.5.4.5.	Genetische Distanz.....	44
4.5.4.6.	PCoA (Principal Coordinate Analysis).....	45
4.5.4.7.	AMOVA (Analysis of Molecular Variance).....	45
4.5.5.	Structure 2.3.4.....	47
4.5.5.1.	Bayes'sches Modell und Markov Chain Monte Carlo	48
4.5.5.2.	Q-Matrix.....	50
4.5.5.3.	Auswertung Structure Harvester	50
4.5.5.4.	Auswertung CLUMPAK	51
4.5.6.	Tabellarische Zusammenfassung der Analysemethoden	51

5.	Ergebnisse	52
5.1.	WIN3 Analyse	52
5.1.1.	Individuen mit Hybrideinfluss.....	53
5.1.2.	Conclusio WIN3-Analyse.....	53
5.2.	Rechnerische Auswertung der Abweichungen	54
5.2.1.	Individuen mit Hybrideinfluss.....	54
5.3.	R 3.3.2, RStudio 1.0.44 und PoppR 2.3.0.....	54
5.3.1.	Conclusio der Analyse mit R, RStudio und PoppR	56
5.4.	Cervus 3.0.7.....	57
5.4.1.	Jungwuchsproben mit Hybrideltern	57
5.4.1.1.	Genetisch idente Proben	58
5.4.1.2.	Graphische Darstellung der übereinstimmenden Genorte.....	59
5.4.1.3.	Geographische Verteilung Eltern-Nachkommen	59
5.4.2.	Conclusio der Auswertung in Cervus.....	60
5.5.	GenAlEx 6.502.....	61
5.5.1.	PCoA	61
5.5.1.1.	Mit Hybriden	61
5.5.1.2.	Ohne Hybriden	61
5.5.1.3.	Conclusio der PCoA Analyse.....	62
5.5.2.	AMOVA.....	62
5.5.2.1.	Mit Hybriden	62
5.5.2.2.	Ohne Hybriden	63
5.5.2.3.	Conclusio der AMOVA Analysen	64
5.6.	Structure 2.3.4.....	64
5.6.1.	Ergebnis Structure Harvester	65
5.6.2.	Ergebnis Clumpak.....	65
5.6.3.	Analyse der Populationsanzahl	66
5.6.4.	Ergebnis mit Hybriden K = 2.....	66
5.6.4.1.	Individuen mit Hybridanteilen, reine Hybriden	67
5.6.5.	Ergebnis ohne Hybriden K = 3	68
5.6.6.	Conclusio der Structure-Auswertungen	68
5.7.	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller Analysemethoden	68
6.	Diskussion.....	73
6.1.	Analysemethoden und Vergleich der Ergebnisse	73
6.1.1.	WIN3.....	73
6.1.2.	R, RStudio und PoppR	73
6.1.3.	Cervus	74
6.1.3.1.	Vergleich der Ergebnisse R und Cervus	74

6.1.4. GenAlEx.....	76
6.1.4.1. PCoA.....	76
6.1.4.2. AMOVA	76
6.1.5. Structure	76
6.2. Forschungsfragen	77
6.3. Introgression und Folgerungen.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbreitung der Schwarzpappel (<i>Populus nigra</i>).....	1
Abbildung 2: <i>Populus nigra</i> , <i>P. deltoides</i> , <i>P. x canadensis</i> , <i>P. nigra</i> „Italica“	10
Abbildung 3: Entwicklung der Gewässer in der Lobau östlich von Wien	11
Abbildung 4: Nationalpark Donau-Auen.....	12
Abbildung 5: Mütterlich und väterlich vererbten Allele zur Abstammungsbestimmung	20
Abbildung 6: Ablauf der PCR.....	21
Abbildung 7: Orte der Probenentnahmen	22
Abbildung 9: Altbaum Nr. 002327	23
Abbildung 10: Ergebnis der DNA-Messung der Probe 002500	29
Abbildung 11: Elektrophoresekammer	31
Abbildung 12: Schritte der Gel-Elektrophorese	32
Abbildung 13: Direct Control CEQ8000	36
Abbildung 14: Bereich C der Abbildung 13	36
Abbildung 15: Auswertung der Probe 999035-01	37
Abbildung 16: Formel Berechnung LOD	41
Abbildung 17: Darstellung „best K“	51
Abbildung 18: Ergebnis der WIN3-Auswertung.....	53
Abbildung 19: Ergebnis der WIN3-Auswertung.....	53
Abbildung 20: Distribution of frequencies, Hamming distance in R	54
Abbildung 21: graphische Darstellung der übereinstimmenden Genorte	59
Abbildung 22: räumliche Verteilung der Eltern-Nachkommen Beziehung	60
Abbildung 23: PCoA mit Hybriden	61
Abbildung 24: PCoA ohne Hybriden	62
Abbildung 25: AMOVA Analyse mit Hybriden	63
Abbildung 26: AMOVA Analyse ohne Hybriden	64
Abbildung 27: Structure Harvester, „Best K“ mit Hybriden	65
Abbildung 28: Structure Harvester, „Best K“ ohne Hybriden	65
Abbildung 29: Clumpak, „Best K“ mit Hybriden	66
Abbildung 30: Clumpak, „Best K“ ohne Hybriden.....	66
Abbildung 31: Run 13, K = 2, Ergebnis Sort by Q, single line	67
Abbildung 32: Gemischterbige Individuen Sort by Q, multiple lines	67
Abbildung 33: Populationsanalyse K = 3 ohne Hybrid, sort by Q, single line	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufgenommene Merkmale der Altbäume	24
Tabelle 2: Orte der Probennahmen	26
Tabelle 3: Untersuchung Mikrosatelliten Loci	33
Tabelle 4: Multi55 PCR.....	34
Tabelle 5: Erläuterung zu Abbildung 13.....	36
Tabelle 6: theoretisch wahre Werte und Gruppenzuordnung nach Fragmentlängen.....	38
Tabelle 7: Eingangsparameter in die Simulation der Vaterschaft.....	43
Tabelle 8: Eingangsparameter Structure	49
Tabelle 9: Zusammenfassung der Analysemethoden	51
Tabelle 10: Cluster in R.....	55
Tabelle 11: Hybridelternteile laut Cervus	57
Tabelle 12: Nachkommen mit mehreren beprobten Elternteilen laut Cervus.....	58
Tabelle 13: Ergebnis Identity Analysis Cervus	59
Tabelle 14: Eltern-Nachkommen mit 7 Orten Differenz.....	60
Tabelle 15: Sammelorte und Individuenanzahl mit Hybriden	62
Tabelle 16: Sammelorte und Individuenanzahl ohne Hybriden	63
Tabelle 17: Anzahl und Prozentanteile der Hybridindividuen (Altbäume, Jungwuchs)	69
Tabelle 18: alle Hybridindividuen samt Auswerteverfahren.....	70

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten, welche mich im Zuge der Erstellung dieser Masterarbeit unterstützt haben, bedanken.

Mein Dank gebührt meinem Betreuer und Beurteiler, Herrn A. o. Univ. Prof. DI Dr. Eduard Hochbichler (BOKU), den Mitarbeiterinnen der Nationalpark Donau-Auen GmbH Mag.^a Karoline Zsak und Teresa Knoll, M.Sc. und insbesondere dem Team des Bundesforschungs- und Ausbildungszentrums für Wald, Naturgefahren und Landschaft (BFW). DI Dr. Berthold Heinze, Renate Slunsky (beide BFW) und Daniela Jahn M.Sc. standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Weiters bedanke ich mich bei meinem Lebensgefährten Peter Vevera und meinen Eltern, die mich mein ganzes Studium und begleitet und unterstützt haben.

1. Einleitung

1.1. Verbreitung der Schwarzpappel (*Populus nigra*)

Die Schwarzpappel (*Populus nigra*) kommt als Flussbegleiter in den sommerwarmen Niederungen großer Ströme – insbesondere an Loire, Rhone, Po, Donau, Rhein, Elbe, Oder und Weichsel – vor (WEISGERBER, 2010).

Das natürliche Verbreitungsgebiet der Schwarzpappel (Abbildung 1) erstreckt sich von Nordafrika über Süd-, West-, Mittel- und Osteuropa bis zum Jenissei in Mittelsibirien. Sie erreicht im südlichen Westasien das Südufer des Kaspischen Meeres, den Irak und die Mittelmeerküste der Türkei (AAS, 2006). In den zentralen Westalpen liegen die höchstgelegenen Vorkommen bei 1600 m, in den Rätischen Alpen bei 1800 m (WEISGERBER, 2010).

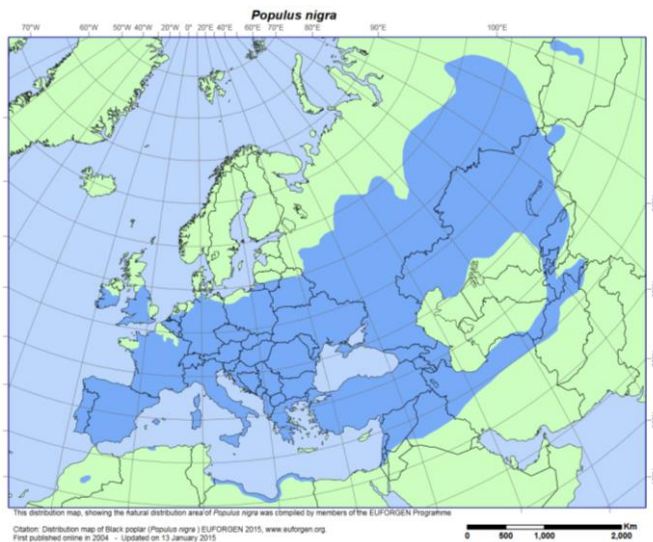


Abbildung 1: Verbreitung der Schwarzpappel (*Populus nigra*).

Distribution map of Black poplar (*Populus nigra*) EUFORGEN 2015, www.euforgen.org. First published online in 2004 - Updated on 13 January 2015

Das Donautal mit den Unterläufen der Nebenflüsse von Salzach und Inn bis Traisen, Donau und Nebenflüsse östlich der Traisen, die südliche und östliche Steiermark inklusive angrenzendem Burgenland zählen zu den Verbreitungsregionen der Schwarzpappel in Österreich (HEINZE, 1998a).

In Österreich scheint die Schwarzpappel nördlich der Alpen ab einer Seehöhe von 400 – 500 m selten aufzutreten, in klimatisch günstigeren Gebieten wie beispielsweise an der Mur wurde der höchste Schwarzpappelstandort auf ca. 745 m festgestellt. Die schweren Böden an March und Thaya erweisen sich für die Schwarzpappel als ungünstig. Zu den bevorzugten Standorten gehören die Schotterfelder des Alpenvorlandes (HEINZE, 1998a).

1.2. Aktuelle Situation der Schwarzpappel in Österreich

In Österreich kommt die Schwarzpappel in allen Bundesländern vor, gilt jedoch als gefährdet. Generell gilt die Schwarzpappel in Mitteleuropa als gefährdet und wird auf der Roten Liste Pflanzen 1999 als eine von der Ausrottung bedrohten Baumart geführt (NIKL FELD, H. & SCHRATT-EHRENDORFER, L. 1999). Eine aktuelle Abfrage der Datenbank OASIS 2.0 (Österreichisches Artenschutz Informationssystem 2.0) des Umweltbundesamtes liefert zu *Populus nigra* keine Ergebnisse, da die Datenbank noch nicht vollständig implementiert wurde (UMWELTBUNDESAMT, 2017).

Laut der IUCN (International Union for Conservation of Nature) Red List of Threatened Species liegt aktuell international keine Gefährdung vor. Die internationale Populationsgröße kann zwar nicht verifiziert werden, jedoch erscheinen die Voraussetzungen für die Aufnahme in die Rote Liste des IUCN (weniger als 10.000 Altbäume in Verbindung mit dazugehörigen Rückgangsraten und Subpopulationen) nicht gegeben. Gemäß den Angaben der IUCN hat es nicht den Anschein, als dass die Population in den letzten 10 Jahren einen Rückgang um mehr als 30 % verzeichnet hat. Aus diesen Gründen wird diese Baumart international als „Nicht gefährdet“ eingestuft (IUCN, 2017).

Laut den Daten der Österreichischen Waldinventur (Inventurzeitraum 2007 – 2009) beträgt die bundesweite Stammzahl der Schwarzpappel im Ertragswald 268.000 +/- 12.000 Stämme, wobei eine Reduktion der Stammzahl im Vergleich zur Vorperiode (2000 – 2002) um 209.000 +/- 94.000 Stämme erfolgt ist (BFW, 2017).

Gemäß den Unterlagen der Österreichischen Bundesforste AG wurden bei den im Zuge der Wiedererhebung im Winter 2008 / 2009 durchgeführten Winkelzählproben (Zählbreite 4) in den Waldgebieten des Nationalparks Donau-Auen auf insgesamt 171 Stichprobenpunkten (von ursprünglich 1998/1999 1.532 eingerichteten Stichprobenpunkten im Raster 400 m x 100 m) 548 adulte Schwarzpappeln festgestellt (ÖBF, 2009; ECKMÜLLNER et al., 2008).

1.3. Rahmenbedingungen zur Erhaltung der Schwarzpappel in Österreich

1.3.1. Vogelschutzrichtlinie und FFH-Richtlinie der EU

Eine der wichtigsten Umweltschutzrichtlinien der EU ist die Richtlinie des Rates vom 2. April 1979 über die Erhaltung der wildlebenden Vogelarten („Vogelschutzrichtlinie“). Unter Artikel 3 der sogenannten „Vogelschutzrichtlinie“ werden die erforderlichen Maßnahmen zur Erhaltung sämtlicher wildlebender Vogelarten, die im europäischen Gebiet der Mitgliedstaaten [...] heimisch sind, aufgelistet. Hierzu zählen vor allem die Erhaltung und Wiederherstellung der Lebensstätten und Lebensräume. Die Umsetzung der Richtlinie erfolgt vor allem über die Errichtung von Schutzgebieten und die Pflege und ökologisch richtige

Gestaltung der Lebensräume in und außerhalb von Schutzgebieten (RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFT, 1979).

Zusätzlich vor „Vogelschutzrichtlinie“ ist die Richtlinie des Rates vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen (Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie bzw. „FFH-Richtlinie“) zu nennen. In dieser Richtlinie wird festgelegt, dass

„die Einleitung von Maßnahmen zugunsten der Erhaltung prioritär natürlicher Lebensräume und prioritärer Arten von gemeinschaftlichem Interesse eine gemeinsame Verantwortung aller Mitgliedstaaten ist“ (RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFT, 1992, S. 2).

Im Anhang II der FFH-Richtlinie finden sich unter Code 91E0: „Auenwälder mit *Alnus glutinosa* und *Fraxinus excelsior* (*Alno-Padion*, *Alnion incanae*, *Salicion albae*)“ als prioritärer Lebensraum. In der Erläuterung der Lebensraumtypen gemäß Anhang I der FFH-Richtlinie (ELLMAUER, 2005) wird die Pappelau mit der Schwarzpappel als dominierende oder subdominante Baumart (je nach Standort) explizit angeführt. Somit sind Maßnahmen zugunsten der Erhaltung dieses Lebensraumes vom Mitgliedsland zu treffen.

In Artikel 3 der FFH-Richtlinie wird die Etablierung eines kohärenten europäischen ökologischen Netzes besonderer Schutzgebiete mit der Bezeichnung „Natura 2000“ beschlossen. Jeder Mitgliedstaat muss somit durch die Ausweisung von Schutzgebieten in einem bestimmten Ausmaß zur Erfüllung der Richtlinie beitragen (RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFT, 1992).

Mit dem Beitritt zur EU hat sich Österreich zur Umsetzung dieser Richtlinien (Vogelschutzrichtlinie und FFH-Richtlinie) und somit zur Ausweisung von Natura 2000 Schutzgebieten verpflichtet.

1.3.2. Ministerkonferenz zum Schutz der Wälder in Europa

Die seit 1990 bestehende Ministerkonferenz zum Schutz der Wälder in Europa (MCPFE) ist eine Kooperation von über 40 europäischen Staaten. Erklärtes Ziel dieser Kooperation ist der Schutz und die nachhaltige Bewirtschaftung des Waldes in Europa.

Bei der Ministerkonferenz am 18. Dezember 1990 in Straßburg wurde die Resolution S2 „Conservation of Forest Genetic Resources“ verabschiedet. Diese Resolution stellt die Grundlage für die Kooperation zur Erhaltung der genetischen Diversität in Europas Wäldern dar. Als freiwilliges Instrument für die internationale Kooperation wurde 1994 „The European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN)“ etabliert (TUROK & BORELLI, 2000). Im Zuge des EUFORGEN-Programms finden Treffen und Workshops mit den Experten der

Mitgliedstaaten statt, um Informationen, Erfahrungen und wissenschaftliche Methoden für die Erhaltung (*in-situ* / *ex-situ*) und Verwaltung von forstgenetischen Ressourcen auszutauschen.

Das EUFORGEN-Programm wurde in 4 Phasen und 5 Netzwerke für bestimmte Baumarten bzw. Baumartengruppen unterteilt, wobei in Phase 2 mittels eigenem *Populus nigra* Netzwerk unter anderem ein Hauptaugenmerk auf die Schwarzpappel gelegt wurde (EUFORGEN, 2017).

Sowohl die genannten Richtlinien des Rates der Europäischen Gemeinschaft, als auch die Ministerkonferenz zum Schutz der Wälder in Europa zielen darauf ab, Lebensräume ökologisch richtig zu gestalten, (autochthone) wildlebende Tier- und Pflanzenarten bzw. den Wald als solches zu schützen und diesen nachhaltig zu bewirtschaften. Durch den Beitritt zur EU hat sich Österreich verpflichtet, diesen Richtlinien zu folgen. Aufgrund der Resolution S2 von Straßburg hat sich Österreich Weiters dazu bekannt, am EUFORGEN Programm der EU teilzunehmen und somit eine Kooperation zur Erhaltung der genetischen Diversität in Europas Wäldern einzugehen.

1.3.3. Erhaltung der Schwarzpappel nach EUFORGEN

1.3.3.1. *Ex-situ*

Individuen aus Relikt-Beständen lassen sich durch die einfache vegetative Vermehrbarkeit auch von alten Schwarzpappeln leichter in Erhaltungsbestände zusammenführen. Eine kontinuierliche Versorgung mit ziehendem Grundwasser der Bäume ist bei der Standortwahl zu berücksichtigen. Für Erhaltungsbestände soll eine Mindestanzahl von 20 Individuen deutlich überschritten, und eine Vermischung mit regionsfremden Genotypen vermieden werden. Es sollen nur Individuen eines Flusssystemes (bei großen Flüssen nur eines Flussabschnittes) in Erhaltungsbeständen zusammengeführt werden (ROLOFF, 2006).

1.3.3.2. *In-situ*

Es ist eine *in-situ* Generhaltung am natürlichen Standort der Schwarzpappel anzustreben. Da die natürliche Voraussetzung eines unregulierten Flusses, an denen sich die Schwarzpappel kontinuierlich verjüngen kann, selten anzutreffen ist, können auch künstliche *in-situ* Erhaltungsbestände angelegt werden (LEFERE et al., 2001 zitiert nach ROLOFF, 2006). Es lässt sich eine Besiedlung mit autochthonen Vorkommen der Schwarzpappel mit Aurenaturierungsmaßnahmen verbinden (ROLOFF, 2006).

1.4. Motivation

Neben den unter Punkt 1.3. genannten Verpflichtungen sprechen für die Erhaltung der genetischen Vielfalt der Schwarzpappel im Wesentlichen 2 Gründe:

Forstwirtschaft

Für die Züchtung neuer Hybridpappelsorten ist eine Erhaltung der genetischen Eigenschaften der Schwarzpappel wichtig (HEINZE 1998a). Die Kreuzung von *Populus nigra* mit *Populus deltoides* (*Populus x canadensis*) und aus dieser Kreuzung hervorgehend vor allem die Sorte „Robusta“ wird weltweit in Pappelplantagen angebaut. Ebenfalls wichtige wirtschaftliche Hybridsorten sind die Kreuzungen von *Populus nigra* mit der amerikanischen Balsampappel *Populus trichocarpa* und der asiatischen Balsampappel *Populus maximowiczii* (WÜHLISCH, 2006).

Auwälder

Die Schwarzpappel stellt in (autochthonen) Flussauen ein dominierendes Element dar und dient vielen Arten als Wirt oder Habitat (WÜHLISCH, 2006). Zu den Insekten, die speziell auf der Schwarzpappel leben gehören u. a. Pappel-Bock, -Blattkäfer, -Blattroller, -Schwärmer, -Spinner und -Wickler. Auch für viele Pilzarten (beispielsweise Lackporlinge und Schüpplinge) stellt die Schwarzpappel einen attraktiven Lebensraum dar, die Krone wird von vielen Vogelarten als Nistplatz genutzt (ROLOFF, 2006).

1.5. Fragestellung

Im Zuge dieser Masterarbeit sollen in Kooperation der Universität für Bodenkultur, der Nationalpark Donau-Auen GmbH, der Österreichischen Bundesforste AG und dem Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald, Naturgefahren und Landschaft folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Anzahl an Schwarzpappelpopulationen lässt sich im Nationalpark Donau-Auen feststellen?
2. Findet eine Introgression von Hybridpappelgenen in die Schwarzpappelpopulation des Nationalparks Donau-Auen bereits statt? Wenn ja, in welchem Ausmaß?
3. Kann die Elternschaft speziell von adulten Hybriden anhand der Sämlinge / Jungpflanzen nachgewiesen werden („Vaterschaftsanalyse“)?
4. Können Verbreitungsmuster (Verbreitungsdistanzen) festgestellt werden?
5. Wie wirkt sich die Kombination verschiedener Analysemethoden auf das Ergebnis im Vergleich zur einzelnen Betrachtung je Analysemethode aus?

Durch die Beantwortung der oben angeführten Fragen soll eine Grundlage für die Gewinnung von Stecklingen und somit eine Grundlage für die Genkonservierung im Nationalpark Donau-Auen geschaffen werden.

2. Biologie der Schwarzpappel

2.1. Beschreibung

Die Gattung Pappel (*Populus*) gehört zur Familie der Weidengewächse (*Salicaceen*) und besteht laut ECKENWALDER (1996) (zitiert nach AAS, 2006) aus etwa 30 Arten; anderen Autoren zufolge aus bis zu 40 Arten (AAS, 2006). Neben der Schwarzpappel (*Populus nigra*) kommen in Mitteleuropa die Silberpappel (*Populus alba*), die Zitterpappel oder Aspe (*Populus tremula*) sowie eine natürliche Hybridform, die Graupappel (*Populus x canescens* = *Populus alba x Populus tremula*) vor (AAS, 2006).

Die Gattung *Populus* kann in verschiedene Sektionen unterteilt werden. Zur Sektion *Aigerios* (Schwarzpappeln) zählen die Arten *Populus nigra* und *Populus deltoides* (HEINZE, 1998a). Weitere Sektionen sind beispielsweise die Sektion *Tacamahaca* (Balsampappeln) und *Leuce* (Zitter- und Weißpappeln).

Die Schwarzpappel erreicht unter günstigen Bedingungen eine Höhe von etwa 30 m, einen Stammdurchmesser von 2 m und ein Alter von 100 bis maximal 300 Jahren (WEISGERBER, 2010).

Im Freiland entwickeln alte Schwarzpappeln eine tief angesetzte Krone, die annähernd so breit wie hoch ist. Es entstehen netzartige Borkenrippen und meist deutliche Knollen mit Wasserreißern. Die Blätter stehen schraubig am Spross mit dreieckigem oder rautenförmigem Umriss (ROLOFF, 2006). Die Blattform und -größe ist jedoch stark von Alter und Art der Triebe abhängig (HEINZE, 1998c).

2.1.1. Fortpflanzung und Vermehrung

Als Pionierbaumart ist die Schwarzpappel besonders in der zweiten Jugendphase raschwüchsig und erreicht unter günstigen Bedingungen das reproduktive Alter bereits mit etwa 10 Jahren (AAS, 2006).

Auch ZSUFFA (1974) berichtet, dass frühestens im Alter von 6 – 10 Jahren eine Reproduktion der Schwarzpappel beginnt (ZSUFFA, 1974 zitiert nach IMBERT & LEFEVRE, 2003). Gemäß ALDINGER (2006) ist (zumindest bei einer Untersuchung in Baden-Württemberg) eine Schätzung des Alters der Schwarzpappel über den Brusthöhendurchmesser jedoch nicht möglich, da die Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit

kleinörtlich stark schwankt. Versuche mit Aspen und deren Hybriden (LIESBACH et al., 2011) haben gezeigt, dass im Alter von 10 Jahren mittlere BHD-Stärken von in etwa 9 cm erreicht werden können.

Aufgrund der soeben genannten Fakten wurden in der gegenständlichen Untersuchung alle Schwarzpappeln mit einem BHD > 10 cm als reproduktionsfähige „Altbäume“ aufgenommen, da davon ausgegangen wurde, dass diese ein Alter von etwa 10 Jahren aufweisen.

Die Schwarzpappel ist – wie alle *Populus* Arten – diözisch und windblütig. Kurz vor Laubaustrieb, welcher im April / Mai stattfindet, entwickeln sich aus den kurz gestielten, hängenden Kätzchen die nackten Blüten (WEISGERBER, 2010). Die im Mai oder Juni ausgereiften und nur wenige Tage lebensfähigen Samen werden hauptsächlich durch Wind, aber auch durch Wasser verbreitet. Die Keimung beginnt unter optimalen Bedingungen auf feuchten alluvialen Schwemmböden bereits nach 48 Stunden. Keimprozente von in etwa 90 % werden erreicht (WEISGERBER, 2010).

Während der ersten Wochen der Entwicklung sind die Keimlinge in ihrer Entwicklung durch Witterungseinflüsse (Trockenheit, hohe Sonneneinstrahlung aber auch Starkniederschläge und Pilzbefall) stark gefährdet (WEISGERBER, 2010).

In den ersten 4 – 6 Wochen zeigen die Keimlinge ein zunächst schwaches Wachstum. Nach dieser kritischen Phase wird bei genügend Licht- und Feuchtigkeit zuzufuhr das Wachstum beschleunigt. Die Sämlinge erreichen bereits nach einer Vegetationsperiode Wuchshöhen von bis zu 50 cm (WEISGERBER, 2010).

Um eine erfolgreiche Etablierung der Schwarzpappel-Samen zu gewährleisten, sind weitgehend konkurrenzfreie Rohböden notwendig (AAS, 2006).

Die Vermehrung der Schwarzpappel erfolgt sowohl generativ, als auch vegetativ. Die vegetative Vermehrung erfolgt hauptsächlich über Stockausschläge. Astabbrüche können vor allem auf Rohböden ebenfalls Wurzeln ausbilden.

Große Stückzahlen von *P. nigra* können durch Steckholzbewurzelung mit einer Vermehrungsrate von in etwa 80 % produziert werden (WEISGERBER, 2010).

2.1.2. Standortansprüche

Gemäß MARGL (1973) zählt neben der Silberweide (*Salix alba*) die Schwarzpappel (*Populus nigra*) zu der Anfangsgesellschaft der Au. Durch eine Schotterschicht vom mittleren Grundwasserspiegel getrennt, nimmt die Schwarzpappel einen höher liegenden Bereich als den der frischen Weidenau ein. In den Folgegesellschaften lassen sich 3 standortgebundene Vegetationsgesellschaften, nämlich die feuchte, die frische und die trockene Pappelau voneinander trennen (MARGL, 1973). Die feuchte Pappelau wird im Sommerhalbjahr zirka

75 Tage überflutet; die frische und die trockene Pappelau werden im Mittel alle 2 – 5 Jahre 4 bis 8 Tage überflutet. Während in der frischen Pappelau die Bäume das Grundwasser gut erreichen können, wird in der trockenen Pappelau das Grundwasser nur selten erreicht (MARGL, 1973).

In der Jugend ist die Schwarzpappel ausgesprochen lichtbedürftig. Eine Etablierung erfolgt ausschließlich in frühen Phasen der primären Auen-Sukzessionsreihe sowie nach massiven Störungen (WALENTOWSKI & KARRER, 2006). Je nach Überschwemmungsverhältnissen können an einer Stelle mehrere Jahrgangsklassen von Schwarzpappeln neben- oder hintereinander bzw. truppweise gemischt vorkommen (HEINZE, 1997a).

Die Schwarzpappel erträgt mehrere Wochen andauernde Überschwemmungen und (als Adulte) Überschlickungen. Besonders gut etabliert sich die Schwarzpappel an sandig-kiesigen Böden und Schotterbänken (WALENTOWSKI & KARRER, 2006).

Der Temperaturanspruch in der Vegetationszeit (Mai bis September) liegt bei mindestens 14 °C, die Dauer der Vegetationszeit beträgt mindestens 150 Tage (WEISGERBER, 2010).

2.2. Ursachen der Gefährdung der heimischen Schwarzpappel

2.2.1. Hybridisierung

Durch die Entdeckung Amerikas wurden die bis dahin bestehenden geografischen Grenzen zur Verbreitung von Pflanzenarten aufgehoben. Die Nachkommen einiger Individuen der im gesamten Osten und Kanada verbreiteten „Kanadapappel“ (*Populus deltoides*) erwiesen sich rasch als sehr wuchskräftig und durch Steckholz leicht vermehrbar (HEINZE, 1998a).

Bereits Ende des 17. Jahrhunderts wurden durch den Austausch von Stecklingsmaterial Arthybriden zwischen der nordamerikanischen Schwarzpappel / Kanadapappel (*Populus deltoides*) und der europäischen Schwarzpappel (*Populus nigra*) gezüchtet. Die so entstandene Hybridart *Populus x canadensis* ist besonders raschwüchsig und weist vorteilhafte Holz- und Wuchseigenschaften auf (WEISGERBER 2010). Eine geringere Krankheitsanfälligkeit der Hybridpappel konnte beobachtet werden (HEINZE 1998c). Auf geeigneten Standorten werden „echte“ Schwarzpappeln im Gegensatz zu Hybridpappeln meist nicht von Misteln befallen (HEINZE, 1997a).

Nach Jahrzehnten der unkontrollierten Weitervermehrung erfolgte ab der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts ein organisierter Handel mit besonders wuchskräftigen Sorten wie beispielsweise mit der Sorte *Populus x canadensis* „Robusta“ (HEINZE 1998a).

Die für Pappeln typische Fähigkeit zur interspezifischen Hybridisierung (sowohl die Schwarzpappel *Populus nigra* als auch die nordamerikanische Schwarzpappel *Populus deltoides* gehören zur Sektion *Aigerios*) ließ die Pappel zu einem Schwerpunkt in der

Pflanzenzüchtung werden. Viele Hybridklone und Hybridsorten (zB. *Populus x canadensis* „Robusta“) dominieren seit langem weltweit den Pappelanbau (AAS, 2006); die heimische Schwarzpappel wurde in den Flußniederungen mehr und mehr verdrängt (WEISGERBER 2010). Bei der Hybridisierung zwischen der europäischen und amerikanischen Schwarzpappel dient die europäische Schwarzpappel (*Populus nigra*) als Pollenspender (Vater) und die amerikanische Schwarzpappel (*Populus deltoides*) als Mutter. Es kann jedoch keinesfalls generell ausgeschlossen werden, dass eine Bestäubung von weiblichen *Populus nigra* durch männliche *Populus deltoides* möglich ist (HEINZE; 1998b). VANDEN BROECK (2004) konnte nach eigenen Angaben erstmals und entgegen aller vorherigen Studien beweisen, dass eine spontane Hybridisierung unter Freilandbedingungen auch dann funktioniert, wenn *Populus nigra* als Mutter und *Populus x canadensis* als Vater fungieren. Dieser Umstand tritt jedoch offenbar nur auf, wenn kaum Pollen von *Populus nigra* (als möglicher Bestäuber) verfügbar sind (VANDEN BROECK, 2004).

Durch den Anbau von Hybridsorten im Lebensraum der europäischen Schwarzpappel und der Fähigkeit zur interspezifischen Hybridisierung entstanden und entstehen Kreuzungen und Rückkreuzungen zwischen den heimischen Schwarz- und künstlich eingebrachten Hybridpappeln (AAS, 2006).

Ein Mutant der Schwarzpappel (und kein Hybrid) ist der unter dem Namen „Pyramiden-“, „Säulen-“ oder „Spitzpappel“ bekannte Klon *Populus nigra* „Italica“. Schon unter Napoleon wurde diese Mutante entlang von Heeresstraßen als Schattenspender gepflanzt. Nördlich der Alpen findet sich meist die männliche Form dieses Klons, im Mittelmeerraum lässt sich auch die weibliche Form der Pyramidenpappel feststellen (HEINZE, 1998a)

Der männliche Pyramidenpappel-Klon *Populus nigra* „Italica“ ist weit verbreitet und es liegt die Vermutung nahe, dass dieser als Bestäuber einen nicht unerheblichen Einfluss auf die genetische Zusammensetzung der Schwarzpappel als Art hat (HEINZE, 1998a).

Es ist zu unterscheiden, ob es sich in den Folgegenerationen der Hybridisierung um „gemischterbige“ Pflanzen höherer Generationen, oder um Schwarzpappeln mit einem gewissen Anteil von Hybridpappel-Genen (eigentliche Introgression handelt) (HEINZE, 1998a).

2.2.1.1. Introgression

Bestäubt eine männliche Hybridpappel (*P. x canadensis*), welche eine typische Hybridpappel der 1. Generation darstellt, eine weibliche Schwarzpappel, entsteht eine „gemischterbige“ Pflanze. Wenn in diesem Fall eine Weitervermehrung des Sämlings mit reinen Schwarzpappeln (*P. nigra*) erfolgt, ist das Ergebnis in der nächsten Generation eine Schwarzpappel mit einem gewissen Anteil von Hybridpappel-Genen (HEINZE, 1998a).

2.2.1.2. Gemischterbige Pflanze höherer Generation

Wird eine weibliche Hybridpappel (*P. x canadensis*) entweder durch eine Hybrid- oder Schwarzpappel bestäubt, handelt es sich in der Folgegeneration ebenfalls um eine gemischterbige Pflanze. Wird in diesem Fall dieser Sämling in weiterer Folge durch Hybridpappeln oder „untereinander“ bestäubt, so ist das Ergebnis eine gemischterbige Pflanze höherer Generation (HEINZE, 1998a).

Diese Hybridisierung führt zu einer Aufhebung von distinkten Artgrenzen. Dieser Umstand kann zu einem Verlust der genetischen Identität der Schwarzpappel führen (AAS, 2006).

In nachstehender Abbildung 2 erfolgt ein Vergleich der Wuchsformen von a) der europäischen Schwarzpappel (*Populus nigra*), b) der kanadischen Schwarzpappel (*Populus deltoides*), c) der Hybridpappel (*Populus x canadensis*) und d) der Pyramidenpappel (*Populus nigra* „Italica“).



Abbildung 2:

a) *Populus nigra*. Quelle: http://www.schwarzpappel-sachsen.de/index.php?article_id=20 09.03.2017

b) *Populus deltoides*. Quelle: <http://www.malag.aes.oregonstate.edu/wildflowers/images.php/id-434/fullsize-1> 09.03.2017

c) *Populus x canadensis* „Robusta“. Quelle: <http://web03.brunns.de/bruns/de/EUR//Pflanzen/POPULUS-x-canadensis-'Robusta',-Holz-Pappel,-Robusta-Pappel/p/1495> 09.03.2017

d) *Populus nigra* „Italica“. Quelle: <http://web03.brunns.de/bruns/de/EUR//Pflanzen/POPULUS-nigra-'Italica',-Pyramiden-Pappel,-S%C3%A4ulen-Pappel/p/1494> 09.03.2017

2.2.2. Verlust von Lebensraum

Auf durchlüfteten Rohauböden, sandig-kiesigen Böden und Schotterbänken etabliert sich die Schwarzpappel besonders gut (WALENTOWSKI & KARRER, 2006). Die Unterbindung des natürlichen Störungsregimes in Auwäldern durch Flussbegradigungen und feste Uferverbauungen führt zu einem Verlust dieser Böden. Durch die gestörte

Überflutungsdynamik kommt es zu einem Reifen der Böden in der Au, die Verjüngung der Schwarzpappel wird aufgrund der fehlenden Keimungsfläche immer schwieriger.

In Abbildung 3 ist die Entwicklung der Gewässer in der Lobau östlich von Wien vor, während und nach der Regulierung der Donau ersichtlich (JUNGWIRTH, 2014). Eine Reduktion der Gewässeranteile um mehr als 50 % ist deutlich erkennbar. Durchströmte Nebenarme sind nach der Regulierung nicht mehr vorhanden.

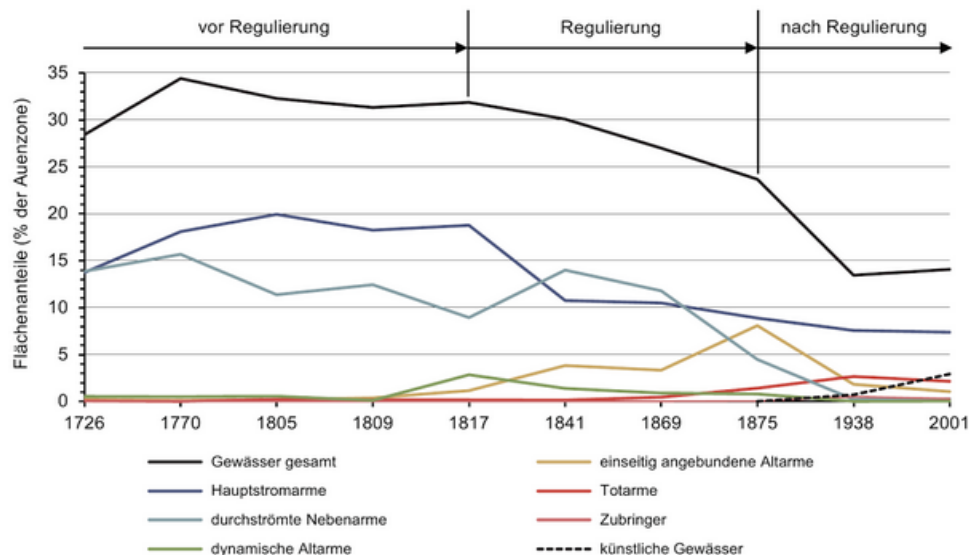


Abbildung 3: Entwicklung der Gewässer in der Lobau östlich von Wien. Quelle: JUNGWIRTH et al, 2014, S 137.

2.3. Nutzung

Die Schwarzpappel weist aufgrund mehrerer Faktoren (wie beispielsweise Schaftkrümmungen und Wasserreiserbildung) geringe Nutzholztauglichkeit auf. Diese nachteiligen Eigenschaften sind u. a. eine Ursache für die Verdrängung der Schwarzpappel durch Hybridpappelsorten, welche durch Züchtung deutlich bessere Holz- und Wuchseigenschaften aufweisen (WEISGERBER, 2010).

Für den Betrieb von Energieholzplantagen eignen sich besonders Lichtbaumarten mit raschem Jugendwachstum. Da Schwarzpappeln empfindlich auf Dichtstand reagieren, kommt dieser Art lediglich eine hohe Bedeutung als Kreuzungspartner zu (NABU 2008).

Für viele Auwaldbereiche stellt die Hybridpappel-Forstwirtschaft eine unverzichtbare Wirtschaftsform dar (HEINZE, 1998a). Auch im Nationalpark Donau-Auen erfolgte ab 1860 eine großflächige Hybridpappelanpflanzung (JELEM, 1974 zitiert nach KNOLL, 2015). In den Nachkriegsjahren des zweiten Weltkrieges wurden aufgrund des großen Holzbedarfs der Anbau von Hybridpappeln in Auwäldern aktiv unterstützt (HEINZE, 1998c).

3. Der Nationalpark Donau-Auen

Der Nationalpark Donau-Auen (IUCN-Kategorie II) wurde 1996 gegründet und umfasst die Bundesländer Wien (obere und untere Lobau) und Niederösterreich (siehe Abbildung 4). Die Fläche beträgt in etwa 9.300 ha. Mehr als 800 Arten höherer Pflanzen, über 30 Säugetier- und 100 Brutvogelarten sowie 8 Reptilien- und 13 Amphibienarten leben in den Donau-Auen (DORN et al., 2010).

Die Gesamtfläche des Nationalparks setzt sich aus 65 % Auwald, 15 % Wiesen- und ca. 20 % Wasserflächen zusammen (Nationalpark Donauauen GmbH, 2017). Laut der Vereinbarung gemäß Artikel 15a B-VG zwischen dem Bund und den Ländern Niederösterreich und Wien zur Errichtung und Erhaltung eines Nationalparks Donau-Auen StF: LGBI. 5506-0 (Artikel III (1) 3.) ist die

„Bewahrung der für dieses Gebiet repräsentativen Landschaftstypen sowie die Tier- und Pflanzenwelt einschließlich ihrer Lebensräume“

eines der Hauptziele des Nationalparks (BUNDESKANZLERAMT, 2017).

Der Wiener Teil des Nationalparks und auch die Donau-Auen östlich von Wien sind Natura 2000 Gebiet sowohl nach der Vogelschutz-Richtlinie als auch nach der Fauna-Flora-Habitat (FFH)-Richtlinie und Europaschutzgebiet (NATIONALPARK DONAU-AUEN GMBH, 2017).



Abbildung 4: Nationalpark Donau-Auen. Quelle: <https://www.wien.gv.at/stadtentwicklung/projekte/landschaft-freiraum/landschaft/wachsende-stadt/umland/nationalpark.html> 09.03.2017

Für die langfristige ökologische Qualität, die Naturnähe der Donau und deren angrenzende Flussauen sind die flussmorphologischen und hydrologischen Verhältnisse die wichtigsten Parameter. Im Zuge von LIFE-Projekten wurden besonders im Zeitraum 1999 – 2008 Gewässervernetzungen und Uferrückbauten durchgeführt, um diese Rahmenbedingungen

zu verbessern. 400.000 m³ Wasserbausteine sollen in Summe aus dem System entfernt und 40 % der Uferlänge rückgebaut werden (NATIONALPARK DONAU-AUEN GMBH, 2009). Durch diese Veränderungen sollen – besonders unter Erhaltung des Hochwasserschutzes und der Funktion der Donau als internationale Wasserstraße – zu einem gewissen Anteil Verhältnisse wie vor der Donauregulierung hergestellt werden. „Junge“ Sukzessionsflächen wie beispielsweise Schotter- und Sandbänke und Standorte der Weichen Au mit regelmäßigen Überschwemmungen sowie eine ausgeprägte Geschiebe und Abflussdynamik sollen das Spektrum an Habitaten entlang der Donau wieder erweitern (NATIONALPARK DONAU-AUEN GMBH, 2009).

3.1. Untersuchungsgebiet

3.1.1. Lage

Die Donau ist mit einer Länge von 2.857 km nach der Wolga der zweitlängste Fluss Europas. Das Einzugsgebiet umfasst in etwa 817.000 km².

Laut der „Gesamtwegekarte Nationalpark Donau-Auen“ erstreckt sich der Nationalpark von der Oberen Lobau in Wien bis zur Marcheinmündung an der Staatsgrenze zur Slowakei. Die Nationalparkgrenze liegt in etwa bei Stromkilometer 1923 im Bereich der Oberen Lobau und in etwa bei Stromkilometer 1880 am linken Ufer bei der Marcheinmündung. Der Nationalpark liegt somit zur Gänze im Bereich der „Oberen Donau“, welche sich von Stromkilometer 2783 - 1791 erstreckt (DONAUKOMMISSION, 2017).

3.1.2. Klima

Wien liegt an einer markanten europäischen Klimascheide zwischen subatlantisch-feuchtmildem und dem pannonisch-warm-trockenen Klima. Atlantisch geprägte Westwetterlagen sind vor allem im Herbst und im Winter häufig. Pannonische Klimatelemente mit hohen Temperaturen und geringen Niederschlägen kennzeichnen im Spätsommer diesen Raum (BERGER & EHRENDORFER, 2011).

Die Jahresmitteltemperatur für Wien lag im Jahr 2015 bei 12,1 °C, die Niederschlagssumme betrug 512 mm (MA 23, 2017).

3.1.3. Hydrologie

Die Speisung der oberen Donau erfolgt sowohl durch atmosphärische Niederschläge als auch durch die Schneeschmelze der Alpen (DONAUKOMMISSION, 2017). Abrupte Änderungen im Abflussgeschehen sind typisch, Höchststände treten meist im Sommer und Tiefststände im Herbst und im Winter auf (JUNGWIRTH et al., 2014).

Die Donau ist aufgrund des Stromtals und der Wasserführung ein typischer Gebirgsfluss. Die wichtigsten wasserreichen Zuflüsse sind Iller, Lech, Isar, Traun und Enns (DONAUKOMMISSION, 2017).

Die freie Fließstrecke der Donau im Nationalpark beträgt ca. 36 km bei einer durchschnittlichen Flussbreite von 350 m. Pegelschwankungen von bis zu 7 m sind möglich. Das durchschnittliche Gefälle beträgt 40 cm je Kilometer (NATIONALPARK DONAU-AUEN GMBH, 2017).

Die Flusslänge in Bayern und Österreich wurde durch die Regulierung der Donau um ca. 15 % reduziert. Durch die Einstauung der Donau, welche im Bereich der Oberen Donau in Deutschland und Österreich 72 % des Donaulaufes beträgt, wird der Eintrag grober Kies- und Schotterfraktionen aus dem Einzugsgebiet beinahe völlig unterbunden. Die Reduktion des Kieseintrages aus den Zubringern beträgt ca. 90 – 95 %. Es erfolgt eine Sohleneintiefung unterhalb Wiens von etwa 2 – 3 cm pro Jahr im Nationalpark Donau-Auen (JUNGWIRTH et al, 2014).

Bei mittleren Wasserständen schwankt die Strömungsgeschwindigkeit zwischen 3,0 und 10,0 km / h (DONAUKOMMISSION, 2017).

Die Wasserführung bei Niederwasser liegt bei 600 – 900 m³ / sec., bei Mittelwasser zwischen 1.500 und 1.900 m³ / sec und bei hundertjährigem Hochwasser bei 8.500 – 11.000 m³ / sec (NATIONALPARK DONAU-AUEN GMBH, 2017).

3.1.4. Harte und weiche Au

3.1.4.1. Weichholz-Auwälder

Weichholz-Auwälder tragen ihren Namen aufgrund der stockenden Gehölze (Weichhölzer). Hierzu zählen insbesondere Weiden und Pappeln. Die weiche Au grenzt an Gewässer an und ist Wasserstandsschwankungen und Überschwemmungen unterworfen.

3.1.4.2. Hartholz-Auwälder

In den trockeneren Bereichen der Au, welche nur im Abstand mehrerer Jahre überschwemmt werden, stocken beispielsweise Ulmen, Esche, Linden und Eichen. Die Eigenschaften des Holzes („hartes Holz“) geben der Hartholz-Au ihren Namen.

3.1.5. Geologie und Boden

Der Nationalpark Donau-Auen liegt im Wiener Becken, welches vom Süden Niederösterreichs (Gloggnitz) bis Göding (Hodonin) im Südosten von Tschechien reicht. Durch die Donau wird das Wiener Becken in einen nördlichen (östliches Weinviertel, Marchfeld) und einen südlichen Teil (trockene Ebene / Steinfeld und feuchte Ebene)

getrennt. Das Wiener Becken entstand durch die Einsenkung der Landschaft zwischen Alpen und Karpaten (BENVENUTTI et al., o. J).

Die Grundgesteine des Wiener Beckens sind in ehemals landfernen Bereichen (als das Wiener Becken noch durch ein Meer befüllt war) feine, tonige Sedimente (Schluffe, Tone) und an den Rändern des Wiener Beckens der sogenannte Leithakalk. Zu den wichtigsten Erdölspeichergesteinen zählen Sande und Sandsteine, wie beispielsweise die „Matzener Sande“. Begründet von Flüssen, die in das Wiener Becken münden, sind die zum Teil mächtigen Schotterablagerungen. Die Ablagerungen der Urdonau sind als Hollabrunner-Mistelbacher Schotter bekannt (HOFMANN, et al, 2011).

Der Donaustrom wird im Bereich des Nationalparks von Auböden begleitet. Gemäß der „Erläuterungen zur Niederösterreichischen Bodenkarte“ sind Rohauböden und typische Auböden meist dem Fluvisol zuzuordnen (WENZEL et al., 2012). Auböden entstehen aus (jungem) Schwemmmaterial und zeigen oft einen schichtigen Aufbau. Das Alter der Böden ist gering und sie verfügen über große Reserven im Mineralbestand (BFW, o. J).

Betrachtet man die Bodenkarte der Österreichischen Bodenkartierung so ist ersichtlich, dass die Böden im Untersuchungsgebiet vor allem dem grauen und dem braunen Auböden und dem sogenannten „Restboden“ zugeordnet werden (BMLFUW & BFW, 2009).

3.1.5.1. Grauer Auboden

Der Humushorizont ist deutlich ausgebildet, feines Schwemmmaterial liegt meist darunter. Das Schwemmmaterial ist vorwiegend hell- bis dunkelgrau gefärbt und zeigt keine oder wenig Anzeichen von Verbraunung. Der Boden besitzt keine ausgeprägte Struktur und ist von beträchtlicher Gründigkeit.

3.1.5.2. Brauner Auboden

Ein braun oder rostbraun gefärbter Verwitterungshorizont ist unter einem gut ausgebildeten Humushorizont zu finden. Der gesamte Boden zeigt eine größere Reife als der Graue Auboden.

3.1.5.3. Restboden

Der Restboden zählt zu den untypischen Böden, welcher durch Abtragung im Erscheinungsbild von den in der „Erläuterung zur Niederösterreichischen Bodenkarte“ beschriebenen Bodentypen deutlich abweicht.

3.2. Hybridpappelbestände im Untersuchungsgebiet

Gemäß KNOLL (2015) finden sich folgende Sorten der Hybridpappel *Populus x canadensis* im Nationalpark Donau-Auen:

Populus x canadensis „Gelrica“ Houtzagers 1937, *Populus x canadensis* „Marilandica“ Bosc ex Poiret 1816, *Populus x canadensis* „Regenerata“ Henry 1913, *Populus x canadensis* „Robusta“ C. K. Schneider 1904.

Weiters wurde ebenfalls die Arten *Populus deltoides* Bartram ex Marshall und *Populus balsamifera* L. 1753 im Nationalpark Donau-Auen festgestellt. Der Mutant *Populus nigra* „Italica“ und die Hybridsorte *Populus maximowiczii* x *Populus nigra* var. *Plantierensis* „Rochester“ komplementieren die laut KNOLL (2015) im Nationalpark vorhandenen Pappelarten und –sorten.

HEINZE (1998b) berichtet, dass viele Flächen im Nationalpark Donau-Auen aus den beiden Hybridpappelklonen „Harff-Regenerata“ (weiblich) und „Robusta“ (männlich) bestehen.

Laut der Österreichischen Waldinventur (ÖWI) für den Erhebungszeitraum 2007 – 2009 beträgt die bundesweite Stammzahl der Hybridpappel (ohne weitere Differenzierung) 3,628.000 +/- 1,292.000 Stämme. Im Erhebungszeitraum 2000 – 2002 betrug die Stammzahl 3,264.000 +/- 1,035.000 (BFW, 2017). Vergleicht man dies mit der bundesweiten Stammzahl der Schwarzpappel (siehe Punkt 1.2.), so beträgt der Anteil an Hybridpappeln bundesweit in etwa das 13fache des Schwarzpappelanteils.

Betrachtet man die im Winter 2008 / 2009 durch die Österreichischen Bundesforste AG erneut erhobenen Stichprobenpunkte im Nationalpark Donau-Auen (siehe Punkt 1.2.), so lässt sich feststellen, dass an 24 von gesamt 171 Stichprobenpunkten, an denen die Schwarzpappel erhoben wurde, ebenfalls Hybridpappeln erhoben wurden. An insgesamt 171 Stichprobenpunkten wurden in Summe 548 Schwarzpappeln vermerkt. An 24 Stichprobenpunkten mit Hybridpappelbeteiligung wurden in Summe 101 Hybridpappeln aufgenommen. Die Hybridpappel tritt somit an 14% der Stichprobenpunkte, an denen die Schwarzpappel erhoben wurde, in Augenschein.

4. Material und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungsschritte erfolgten in Kooperation mit dem Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald und Naturgefahren (BFW), Institut für Waldgenetik, Abteilung Genomforschung unter der Leitung und Betreuung von DI Dr. Berthold Heinze, der Nationalpark Donau-Auen GmbH, der Österreichischen Bundesforste

AG und der Universität für Bodenkultur, Department für Wald- und Bodenwissenschaften, Institut für Waldbau.

Die Extraktion der DNA und alle weiteren Analysen erfolgten am Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald und Naturgefahren (BFW) unter der Betreuung von DI Dr. Berthold Heinze, Daniela Jahn, M.Sc. und Renate Slunsky.

In Summe wurden 439 Individuen (317 Jungwuchspflanzen und 122 Altbäume) durch die Verfasserin dieser Diplomarbeit mittels 18 nuklearer genetischer Marker an verschiedensten Loci im Zellkern hinsichtlich ihrer genetischen Zusammensetzung in Bezug auf die unter Punkt 1.4. angeführte Fragestellung untersucht.

316 Jungwuchsproben wurden selbstständig gewonnen, 2 wurden seitens des Nationalparks zur Verfügung gestellt (999018-01 und 999022-01). Bei den Jungwuchsproben war 1 Ausfall im Zuge der DNA Extraktion zu verzeichnen. Somit wurden gesamt 317 Jungwuchsproben ausgewertet.

99 Altbäume wurden von der Verfasserin beprobt, 6 untersuchte Proben (2279, 2281, 2443, 2561, SP09 und 573) wurden vom Nationalpark bereitgestellt.

Bei jeder Analyse wurden folgende Referenzproben mituntersucht: *Populus nigra* „Italica“ (Pyramidenpappel), *Populus x deltoides* „Robusta“ (eine männliche Hybridpappelsorte) und 2 Proben aus dem Gebiet der Familie Abensperg-Traun (Hybridpappeln) bezeichnet als AT4 und AT6.

Die Referenzproben „Italica“ und „Robusta“ wurden je 5x, die Referenzproben Abensperg-Traun 4 (AT4) und Abensperg-Traun 6 (AT6) wurden 4x analysiert. Von den 123 zur Verfügung stehenden Altbaumproben konnten 122 Proben ausgewertet werden (1 Ausfall). Im Zuge der Aufnahme erfolgte keine Differenzierung in männliche und weibliche Individuen.

8 Probenorte wurden innerhalb des Nationalparks aufgesucht (siehe Punkt 4.3.5.); den Referenzproben „Italica“, „Robusta“, AT4 und AT6 wurde der Probenort 9, den Proben, welche vom Nationalpark zur Verfügung gestellt wurden, der Probenort 10 zugewiesen.

4.1. Erläuterung genetischer Grundbegriffe

Ein internationales Konsortium aus Wissenschaftlern gab im September 2004 bekannt, dass das Genom (die Gesamtheit aller Gene) der Amerikanischen Balsampappel (*Populus trichocarpa*) vollständig entschlüsselt wurde. In einer mehr als 2 Jahre andauernden Forschungsarbeit wurde die Reihenfolge der in etwa 520 Mio. Basenpaare bestimmt, welche sich auf 19 Chromosomen verteilen (FLADUNG, M., 2005).

Nachstehend werden kurz die genetischen Grundbegriffe, die für das Verständnis dieser Arbeit unerlässlich sind, erläutert.

Allel

An einem bestimmten Genort (Locus) eines Chromosoms können verschiedene „Zustandsformen“ auftreten (PURVES et al., 2006). Bei diploiden Lebensformen tritt jedes Chromosom (außer den Geschlechtschromosomen) doppelt auf. Es kann beispielsweise vorkommen, dass der Genort für die Blühfarbe einer Pflanze auf dem Chromosom väterlicherseits auf „rot“ programmiert ist, auf mütterlicher Seite auf weiß. Somit enthält der gleiche Genort auf einem Chromosomensatz (2 Chromosomen, je 1 Chromosom von Vater und Mutter) unterschiedliche Informationen. Dies wird als Allel bezeichnet.

Chromosom

Ein Chromosom ist ein fadenartiger Strang aus DNA (ROBINSON, 2010). Pappeln sind diploid (sie erhalten je einen Chromosomensatz der Mutter und des Vaters) und beinhalten $2n = 38$ Chromosomen (AAS, 2006).

Co-Dominanz

Die Festlegung der Blutgruppe bei einem Nachkommen kann beispielsweise co-dominant erfolgen. Gibt es 2 Allele (Information am Genort: Blutgruppe A des Vaters und Blutgruppe B der Mutter) und der Nachkomme trägt Blutgruppe AB, so spricht man von co-dominanter Vererbung (PURVES et al., 2006).

DNA

Die DNA ist das Speichermedium der genetischen Information, welche (größtenteils oder komplett) an die nachkommende Generation weitervererbt wird (ROBINSON, 2010).

Die DNA (oder DNS) besteht aus 4 stickstoffhaltigen Basen und somit aus 4 Nukleotiden: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Ist die DNA doppelsträngig, so kommt Adenin (A) immer mit Thymin (T) und Cytosin (C) immer mit Guanin (G) in Basenpaaren vor (PURVES et al., 2006).

Gen

Ein bestimmter Abschnitt (DNA-Bereich) auf einem Chromosom. Das Gen ist die grundlegende Einheit der Vererbung. Der Mensch besitzt 23 Chromosomenpaare (in Summe 46 Chromosomen) auf denen in Summe etwa 22.158 Gene lokalisiert sind. Diese Gene beinhalten 3 Mrd. Basenpaare (A-T und C-G) (ROBINSON, 2010).

Genom

Die Gesamtheit aller Gene eines Organismus.

Genort = Locus

Eine bestimmte Stelle auf einem Chromosom (PURVES et al., 2006)

Genetischer Marker (molekularer Marker)

Als Marker werden einerseits leicht zu identifizierbare Gene, andererseits kurze, charakteristische DNA-Abschnitte, dessen Basenabfolge und Genort bekannt sind, bezeichnet (DocCheckFlexikon, 2017).

Eine Abgrenzung von Schwarz- und Hybridpappel ist über eine DNA-Analyse eindeutig möglich (CREMER & KONNERT, 2010). Der Zellkern (Nukleus) enthält den Großteil der DNA, aber auch in der Mitochondrienmatrix und im Chloroplastenstroma ist (bei Pflanzen) DNA vorhanden (PURVES et al., 2006). Bei der Pappel wird sowohl die Chloroplasten-DNA (CREMER & KONNERT, 2010) als auch die mitochondriale DNA (HEINZE 1997b) über die Mutter vererbt. Zusätzlich zu „Zellkern-DNA-Markern“ sind mitochondriale und Chloroplasten Marker nützliche Hilfsmittel um die „Richtung“ der Introgression zu untersuchen (HEINZE, 1997b). In der gegenständlichen Untersuchung wurde ausschließlich mit „Zellkern-DNA-Markern“ (nukleare DNA Marker) gearbeitet.

Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Unter Voraussetzung bestimmter Bedingungen kann die Situation eintreten, dass sich die genetische Struktur einer Population im Laufe der Zeit nicht verändert. Für Organismen mit sexueller Fortpflanzung gilt unter folgenden Bedingungen das Hardy-Weinberg Gleichgewicht: Es muss eine sehr große Populationsgröße gegeben sein, in welcher sich Individuen rein zufällig paaren und Mutationen nicht auftreten. Es darf keine Migration zwischen Populationen stattfinden und die betreffenden Allele werden nicht durch die natürliche Selektion beeinflusst. Durch das Hardy-Weinberg Gleichgewicht wird eine nicht evolvierende Population beschrieben. Die Frequenzen von Allelen an einem Locus bleiben über die Generationen hinweg konstant (PURVES et al., 2006).

Heterozygotie / Homozygotie

Ein mischerbiges Individuum ist heterozygot und enthält zwei Allele des fraglichen Gens. Ein reinerbiges Individuum (nur ein Allel am Genort) ist homozygot (PURVES et al., 2006).

Mikrosatelliten

Bestehen aus 2 – 5 bp (Basenpaaren) langen Wiederholungen, die in ca. 10 – 50 Kopien vorkommen. Mikrosatelliten sind über das ganze Chromosom verstreut und können für den genetischen Fingerabdruck (DNA-Fingerprint) verwendet werden (PURVES et al., 2006). Mikrosatelliten werden für Vaterschaftsanalysen (siehe Abbildung 5) herangezogen, da diese hoch polymorph sind und sich von Individuum zu Individuum stark unterscheiden.

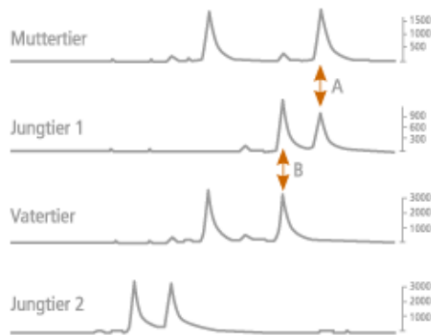


Abbildung: DNA-Marker in einem Abstammungsfall mit zwei Jungtieren. Jungtier 1 hat ein Allel von der Mutter (Pfeil A) und ein Allel vom Vater (Pfeil B) geerbt. Das Jungtier 2 ist zu beiden Elterntieren ausgeschlossen.

Abbildung 5: Darstellung der mütterlich und väterlich vererbten Allele zur Abstammungsbestimmung. Quelle: Labor für Abstammungsbegutachtungen Prof. Dr. Klaus Olek. <http://www.abstammungsbegutachtung.de/ARTENSCHUTZ/technologie-mikrosat.html> 17.03.2017

Nukleotid

Nukleinsäuren (DNS = Desoxyribonukleinsäure, RNS = Ribonukleinsäure) bestehen aus Nukleotiden. In der DNA kommen 4 Nukleotide (Bausteine der DNA) vor: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Adenin ist in der DNA immer mit Thymin (A-T) und Cytosin immer mit Guanin (C-G) gepaart (PURVES et al., 2006).

Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um Teile der DNA für weitere Analysen künstlich zu vervielfältigen.

1. Der Doppelstrang der DNA muss – um diesen erfolgreich replizieren zu können – im ersten Schritt der PCR aufgetrennt werden (= Denaturierung). Um diese Trennung zu erreichen, wird die DNA bis knapp unter den Siedepunkt erhitzt.
2. Nach der erfolgten Denaturierung erfolgt eine Abkühlung der DNA auf ca. 55 – 65°C. Durch diesen Abkühlungsvorgang können sich die Primer an die gewünschte Stelle der DNA binden (= Primer Annealing). Die in der PCR verwendeten Primer sind mit Spezialfarben markiert, damit die Primer später unter dem Licht einer bestimmten Wellenlänge sichtbar gemacht werden können.
3. Hat sich der Primer erfolgreich an das gewünschte DNA Stück gebunden, dirigiert dieser die „Tag-Polymerase“ (ein Enzym aus Bakterien) an die gewünschte Stelle der DNA, welche kopiert werden soll. Am 3'-Ende des Primers beginnt die Polymerase die passenden, neuen Nukleotide (welche zuvor hinzugefügt werden müssen) einzubauen. Am Ende des Vorgangs (der Elongation) liegen zwei neue DNA Doppelstränge vor. Durch die Polymerase wird ein neues DNA Molekül geschaffen. (ROBINSON, 2010).

Die Bezeichnung „WIN3“ (als Beispiel) benennt den Genort, für welchen der Primer entwickelt wurde.

In Abbildung 6 wird der Ablauf der PCR dargestellt.

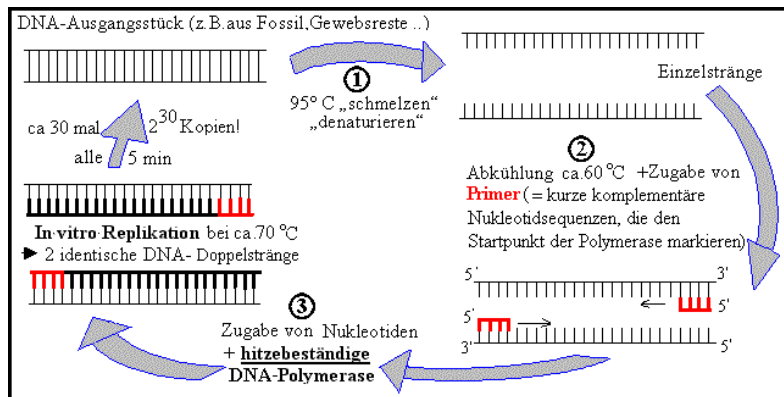


Abbildung 6: Ablauf der PCR. Quelle: Scheffel-Gymnasium.

<http://www.scheffel-og.bw.schule.de/faecher/science/biologie/molangewandt/3fingerprint/fingerprint.htm> 16.03.2017

Primer

Primer sind Starterfragmente aus DNA oder RNA (PURVES et al., 2006). Sie werden benötigt, um bestimmte DNA Sequenzen mittels einer Polymerase-Chain-Reaction (PCR) für weitere Analysen zu vervielfältigen.

Sequenced Tagged Sites (STS)

STS sind 100 – 300 Basenpaar lange (Spektrum Akademischer Verlag, 1999), überall auf dem Chromosom verteilte, einzigartige Basenkombinationen. STS dienen der eindeutigen Orientierung am Chromosom, da kein STS dem anderen gleicht (ROBINSON, 2010). Marker, welche auf STS basieren sind co-dominant und dienen der Entdeckung von Variationen in Allelen. Ein Nachteil der Verwendung von STS als Marker liegt darin, dass für jeden Genort spezielle Primer-Paare entwickelt werden müssen (IPGRI AND CORNELL UNIVERSITY, 2003).

4.2. Auswahl der Probeflächen

Als ersten Schritt der Untersuchung war es notwendig, die Orte der Probenentnahmen festzulegen. Da es primär galt, Jungwuchspflanzen hinsichtlich einer Introgression von Hybridpappelgenen und der „Vaterschaft“ zu untersuchen, wurden die Probeflächen anhand des vorhandenen Jungwuchses ausgewählt. Als Jungwuchs wurden alle Individuen unabhängig ihrer Höhe mit einem BHD von < 10cm angesprochen.

Um als geeignete Probefläche ausgewiesen zu werden, mussten nach einer okular erfolgten Schätzung mindestens 50 Jungwuchspflanzen vorhanden sein.

Mit Hilfe von „Google Maps“-Satellitenbildern wurden Schotterflächen im Nationalpark auskundig gemacht, die als Ort einer möglichen Verjüngung der Schwarzpappel in Frage kamen. Weiters wurde der Nationalpark Donau-Auen mit dem Fahrrad und zu Fuß erkundet, immer Ausschau nach potentiellen Verjüngungsflächen haltend. Wie unter Punkt 2.2.2. bereits angesprochen, bestand die Schwierigkeit bei der Auswahl der Probeflächen darin, dass kaum Verjüngungsflächen der Schwarzpappel in geeigneter Größe im Nationalpark auffindbar waren. Aufgrund des niedrigen Wasserstandes der Donau ab Juli 2015 war es möglich, zu Inseln in der Donau vorzudringen, die bei Mittelwasser nicht erreichbar gewesen wären.

Im Endeffekt konnten – wie in Abbildung 7 dargestellt – 8 geeignete Probeflächen, welche sich auf die gesamte Fließlänge der Donau im Bereich des Nationalparks erstrecken, ausfindig gemacht werden:

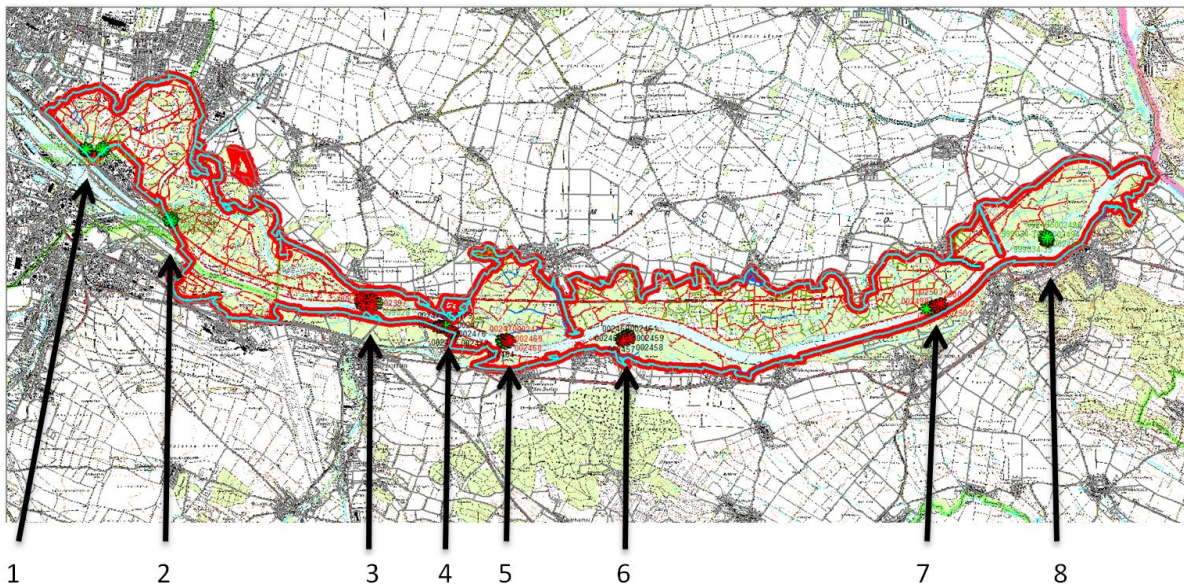


Abbildung 7: Orte der Probenentnahmen. Rote Umrandung = Nationalparkgrenze

4.3. Aufnahmeverfahren

4.3.1. Nummerierung der Proben

Nach erfolgter Bestimmung einer geeigneten Probefläche wurden im Durchschnitt etwa 50 % der Jungwuchspflanzen (okulare Schätzung) pro Probefläche beprobt. Die Nummerierung sämtlicher Jungwuchspflanzen beginnt mit 999. Die Nummerierung 999023-01 bedeutet beispielsweise: Jungwuchs aufgrund der Nummerierung beginnend mit 999, Probefläche 023, Probe -01. Jungwuchspflanzen wurden bei entsprechender Größe mittels Markierungsbändern aus Papier, welche nach 1 – 2 Jahren verwittern, gekennzeichnet (siehe Abbildung 8). Eine Kennzeichnung mittels Plastikmarke erfolgte nicht. Altbäume (BHD

> 10 cm) wurden – wie in Abbildung 9 dargestellt – mittels Plastikmarke gekennzeichnet und tragen 6 stellige, mit 002 beginnende Nummern (beispielsweise 002327).

Adulte Schwarzpappeln im Umkreis von ca. 100 m zur Jungwuchs-Probefläche wurden aufgenommen und fotografisch dokumentiert. Als potentielle Eltern in Frage kommende adulte Hybridpappeln wurden ebenfalls beprobt und fotografiert.



Abbildung 8: Jungwuchspflanze 999024-04, aufgenommen am 17.07.2015, Heißlände Panozzalacke, Obere Lobau

Abbildung 9: Altbaum Nr. 002327, aufgenommen am 17.07.2015, Heißlände Panozzalacke, Obere Lobau

Die Referenzproben, welche von der Familie Abensperg-Traun zur Verfügung gestellt wurden (Hybridpappelklone) wurden mit der Kurzbezeichnung „AT“ versehen. Es wurden 2 unterschiedliche Proben, AT4 und AT6 verwendet. Da jede der AT4 und AT6 Probe mehrmals verwendet wurde, wurden diese je nach Wiederholungszahl mit AT41 (für Wiederholung 1) AT42 (für Wiederholung 2 usw.) gekennzeichnet. Es handelt sich bei den Bezeichnungen AT41, AT42, AT43 und AT44 immer um ein und dieselbe Probe. Ebenso bei AT61, AT62, AT63 und AT64.

4.3.2. GPS-Daten

Die aufgesuchten Schwarzpappeln (sowohl Altbäume als auch Jungwuchspflanzen) wurden per GPS mit der jeweiligen Probennummer vermarkert und sowohl in das Programm ArcGIS 10.3.1 als auch in die Access Datenbank zur Dokumentation der Schwarzpappelvorkommen des Nationalparks Donau-Auen übertragen. Jedes beprobte Individuum kann über die bekannten GPS Koordinaten rückverfolgt werden.

4.3.3. Probenmaterial

Die genommenen Proben bestanden ausschließlich aus Blattmaterial, welches mittels Baumschleuder aus dem Kronenraum gewonnen wurde. War eine Beprobung im Kronenraum nicht möglich, so wurden Proben von Wasserreisern genommen. Nach erfolgter Beprobung wurde das Blattmaterial einzeln in Tee-Filter verpackt und mittels Silikagel getrocknet.

4.3.4. Weitere Daten

Zusätzlich zu den allgemeinen Daten wie laufende Nummer, Ort, Beschreibung des Ortes usw. wurden die in Tabelle 1 ersichtlichen Daten für sämtliche Altbäume mittels Aufnahmeformular und Aufnahmeschlüssel (siehe Anhang A) erhoben und in der Schwarzpappel Datenbank des Nationalparks Donau-Auen erfasst:

Tabelle 1: Aufgenommene Merkmale der Altbäume. Die Erläuterungen zu allen mit * gekennzeichneten Merkmale finden sich im Aufnahmeschlüssel, Anhang A

Aufgenommenes Merkmal	Erläuterung
BHD (cm)	Messung mittels Umfangmaßbandes (eine Messung mit Kluppe wäre aufgrund der BHDs der aufgesuchten Individuen nicht möglich gewesen)
Höhe (m)	Messung mittels Blume Leiss Höhenmesser
Vitalität*	In Stufen 1 – 5
Rindenzustand*	In Stufen 1 - 5
Kronendurchmesser	Nord- Süd und Ost- West-Richtung
Astfreier Schaft (m)	Messung / okulare Schätzung
Maserknollen	In % des Stammes
Position des Individuums	Freistehend / im Bestand / Bestandesrand / Ufer / Hangmitte
Totastmaterial (m ³)	Okulare Schätzung
Anzahl der Hauptstämme	
Entfernung zur nächsten Straße (m)	Im Bestand okulare Schätzung, stichprobenweise Nachmessung über ArcGIS 10.3.1
Gefahr durch Baumsturz / herabfallende Äste*	
Wurzelfreilegung*	
Wichtigkeit als Mutterbaum*	
Baumarten des Nebenbestandes	
Baum(teile) vermodert*	
Wunden*	

4.3.5. Tabellarische Übersicht über alle Proben

Nachstehende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Lage der Probenpunkte, Anzahl und Art der genommenen Proben (JW = Jungwuchs BHD < 10 cm, Alt = Altbaum, BHD > 10 cm) und Distanz zum nächsten Aufnahmepunkt. Die zwei zu Beginn der Altbaumnummer stehenden Nullstellen werden in der Tabelle nicht angeführt.

Tabelle 2: Orte der Probennahmen

Nummer	Ort der Probennahme	Probennummern	X Koordinate	Y Koordinate	Probenanzahl	Distanz (Luftlinie) zum nächsten Probenpunkt
1	Bahnübergang Panozzalacke (Obere Lobau) Heißlände Panozzalacke	999023-01 – 999023-13 2434, 2441, 2444, 2445 999024-01 – 999024-13 2327, 2361, 2362, 2363, 2364, 2435	762194 762248	338050 338038	36 JW 26 Alt 10	3,5 km Probenpunkt 2
2	Marchfeldschutzdamm zwischen Lausgrundwasser und Kreuzgrund (Untere Lobau)	999025-01 – 999025-25 2436 - 2440	764546	335652	30 JW 25 Alt 5	7,3 km Probenpunkt 3
3	Schönauer Traverse1	999026-01 – 999026-20 2384 - 2394	771033	332830	31 JW 20 Alt 11	

3	Schönauer Traverse2	999027-01 – 999027-34 999028-01 – 999028-06 2375 – 2383 2395 – 2399 2446 - 2449	771389	332794	58 JW 40 Alt 18	2,7 km Probenpunkt 4
4	Hirschsprung (Fischamend), Insel in der Donau	999033-01 – 999033-40 2472 – 2479	773664	332067	48 JW 40 Alt 8	2,3 km Probenpunkt 5
5	Mühlschüttel (Orth a. d. Donau), Insel in der Donau	999031-01 – 999031-40 2462 - 2471	775799	331599	50 JW 40 Alt 10	4,0 km Probenpunkt 6
6	Mitterhaufen Flusskilometer 1900	999029-01 – 999029-30 999030-01 – 999030-30 2400 2450 - 2461	779905	331637	73 JW 60 Alt 13	10,6 km Probenpunkt 7

7	Rosskopfarm Stopfenreuth, Insel in der Donau	999032-01- 999032-15 999035-01 – 999035-15 2481- 2485 2497 - 2503	790554	332732	42 JW 30 Alt 12	4,4 km Probenpunkt 8
8	Turnhaufen (Engelhartstetten)	999034-01 – 999034-35 2480 2486 - 2496	794334	335087	47 JW 35 Alt 12	

4.4. Aufbereitung der Proben

4.4.1. Extraktion der DNA

Die DNA wurde mittels Invisorb® Spin Plant Mini Kit aus dem getrockneten Blattmaterial gewonnen. Das Extraktionsprotokoll ist im Anhang B ersichtlich.

Nach erfolgter Extraktion wurde die Konzentration der DNA (ng DNA pro μl Flüssigkeit) mittels Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer gemessen. Ein Gehalt von 30 ng DNA pro μl Flüssigkeit sollte im Optimalfall für weitere Analysen erreicht oder überschritten werden.

Messungen NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer

Nach erfolgter Kalibrierung des Gerätes mit 1 μl Laborwasser (Wasseraufbereitungssystem Merck Millipore) erfolgte die Messung des Absorbierungsgrades (siehe Abbildung 10) von 1 μl Flüssigkeit, in welcher die extrahierte DNA gelagert wurde, bei einer Wellenlänge von 260 nm (Thermo Fisher Scientific Inc, o. J.a).

Relevant waren bei der Messung das Verhältnis der 260 / 280 und der 260 / 230 Werte.

Das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm wird zur Feststellung der Reinheit der DNA verwendet. Liegt das Verhältnis bei $\sim 1,8$ wird die DNA als „rein“ erachtet. Liegt das Verhältnis bei ~ 2 handelt es sich um „reine“ RNA. Ein 260 / 280 Verhältnis außerhalb der Norm kann auf eine Verunreinigung der DNA durch Proteine oder ein Reaktionsmittel (beispielsweise Phenol) hindeuten (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC, o. J. b). Eine vermutete geringfügige Proteinverunreinigung der DNA bei einem erhöhten 260 / 280 Verhältnis ist für die im Analyseverfahren folgende PCR-Fragmentanalyse (in diesem Fall) jedoch nicht störend.

Das Verhältnis von 260 nm zu 230 nm ist der zweite Wert, der die Reinheit einer Nukleinsäure angibt. Das Verhältnis 260 / 230 wird im Bereich 2.0 – 2.2 erwartet. Ist der Wert < 2 , so liegen eventuelle Verunreinigungen der DNA vor, welche die Wellenlänge im Bereich 230 nm absorbieren (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC, o. J.a).

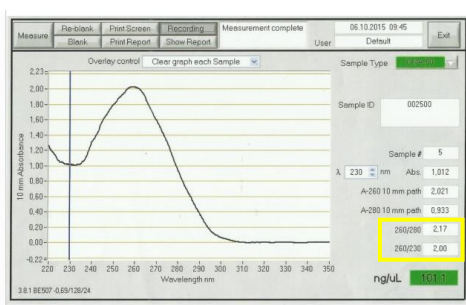


Abbildung 10: Ergebnis der DNA-Messung der Probe 002500

4.4.2. WIN3 Analyse

Nach erfolgter Extraktion und Messung der DNA-Gehalte am Spectrophotometer erfolgte die erste Auswertung im Hinblick auf die Frage, welcher Pappelart (beispielsweise *Populus nigra*, *Populus x canadensis*, *Populus deltoides*) die jeweilige Probe zuzuordnen ist.

Vorgehensweise:

1. Im ersten Schritt wurde die DNA von allen Proben gemäß dem Wert ng / μ l, den die Messung am Spectrophotometer ergeben hat, auf einen konstanten Wert von 10 ng / μ l mittels Laborwasser (Wasseraufbereitungssystem Merck Millipore) verdünnt. Die auf einen Gehalt von 10 ng / μ l verdünnten Proben dienen ab sofort als Basis für alle weiteren Analysen.

Der für die WIN3-Analyse notwendige Primer wurde von BRADSHAW, et al. (1994) entwickelt. BRADSHAW, et al. (1994) gelang es, durch einen genetischen Marker in einer F2 Generation von *Populus deltoides* x *Populus trichocarpa* eine Art der Analyse zu entwickeln, wodurch spezifische Allele von *Populus deltoides* in Hybriden zwischen *Populus nigra* und *Populus deltoides* entdeckt und dargestellt werden können (HEINZE, 1997b).

Der Primer für den Genort WIN3 weist folgende Basenabfolge auf:

Forward Primer: 5'-CCCGAAGTGTCCAGAGC-3'

Reverse Primer: 5'-CCCACTCAAATAGTCTAC-3'

(BRADSHAW et al., 1994).

Der WIN3 Marker (genauer gesagt: die Markersequenz für den Genort WIN3) ist ein artspezifischer, co-dominanter nuklearer STS-Marker. Die Verwendung von dominanten Markern hätte im Vergleich zu co-dominanten Markern den Nachteil, dass die Information von dominanten Markern im Zuge einer Hybridisierung verloren gehen können (KHASA et al., 2005). Der WIN3 Marker, molekulare Marker welche auf Isoenzymen basieren und auch nukleare Mikrosatelliten Marker (SSRs) können – jeder für sich – F1 Hybriden zwischen *Populus nigra* und *Populus deltoides* ersichtlich machen. Um die Fehlerquote bei der Untersuchung weiterer (beispielsweise F2) Generationen und Rückkreuzungen zu senken, ist es ratsam, die Informationen von mehreren molekularen Markern zu kombinieren (VANDEN BROECK et al., 2004). Der Primer für den Genort WIN3 wurde für die weitere Anwendung auf eine Konzentration von 4 μ M verdünnt.

2. Nach erfolgter Verdünnung a) Proben auf eine Konzentration von 10 ng / μ l und b) des Primers auf eine Konzentration von 4 μ M wurde die PCR gemäß Protokoll Anhang C durchgeführt.

Als letzter Schritt wurde das Ergebnis der PCR mit Hilfe der Agarose Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht. Im Regelfall wurde ein 1 % iges Agarose-Gel verwendet; somit wurde 1 g Agarose je 100 ml Wasser zugefügt. Das Agarose Gel wurde mit dem Farbstoff peqGREEN versetzt. PeqGREEN diente dazu, die DNA Fragmente im Agarose-Gel unter UV Licht sichtbar zu machen.

Die in Abbildung 11 dargestellte Elektrophoresekammer wurde mit einer TBE-Elektrophorese-Pufferlösung gefüllt und das Elektrophorese-Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt.

5 μ l des „WIN3“ PCR-Ergebnisses wurden mit 4 μ l Ladebuffer gemischt. Anschließend wurde die Mischung in die Geltaschen des Agarose-Gels, welche im Zuge der Herstellung des Gels mittels einem 26er Gelkamm offen gehalten wurden, mittels Pipette eingebracht (Abbildung 12). Der Ladebuffer erhöhte die Dichte der DNA-Lösung, damit diese in die Geltasche sank und nicht herausgespült wurde. Der Ladebuffer war – um den Fortschritt der Gel-Elektrophorese zu dokumentieren – blau gefärbt (siehe Abbildung 12).

Sowohl die erste als auch die letzte Geltasche wurde mit einem 100 Basenpaar-Referenzmarker befüllt, um einen Referenzwert für die zu untersuchenden Proben darzustellen. Die oberste Markierung stellt 1500 Basenpaare dar, die unterste Markierung 100 Basenpaare. Die Markierung erfolgt in 100 Basenpaar-Schritten

Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 – 130 Volt für die Dauer von zirka 60 min. Da DNA negativ geladen ist, wanderte diese in Richtung Kathode. Kleinere DNA-Teile wandern schneller in Richtung Kathode und sind somit am unteren Ende des Agarose-Gels lokalisiert.

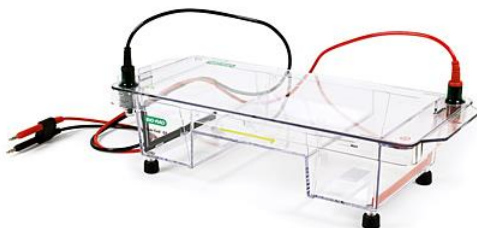


Abbildung 11: Elektrophoresekammer mit Anode (schwarz) und Kathode (rot). Die Laufrichtung der DNA Richtung Kathode ist mittels gelben Pfeils in der Bildmitte dargestellt. Auf der Brücke in der Mitte der Kammer wird das Agarose-Gel platziert. Quelle: http://www.bio-rad.com/de-at/product/sub-cell-gt-cell?pcp_loc=catprod 20.03.2017

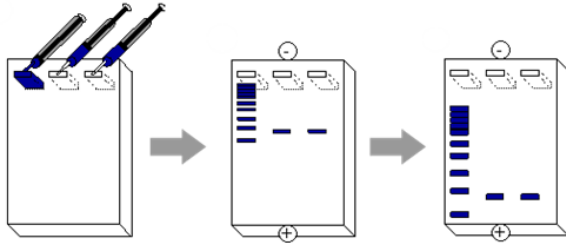


Abbildung 12: Schritte der Gel-Elektrophorese:

Bild 1: Laden des PCR-Ergebnisses mit blauem Ladepuffer versetzt in die Geltasche des Agarose-Gels

Bild 2: Beginn der Gel-Elektrophorese, DNA ist negativ geladen, wandert zur Kathode

Bild 3: fertige Gel-Elektrophorese, kurze DNA-Teile wandern schneller zur Kathode

Quelle: [http://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Online_Open_Genetics_\(Nickle_and_Barrette-Ng\)/08%3A_Techniques_of_Molecular_Genetics/8.5%3A_DNA_Analysis%3A_Gel_Electrophoresis](http://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Online_Open_Genetics_(Nickle_and_Barrette-Ng)/08%3A_Techniques_of_Molecular_Genetics/8.5%3A_DNA_Analysis%3A_Gel_Electrophoresis) 20.03.2017

Eine Untersuchung aller Proben wurde mit der soeben beschriebenen Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Sichtbarmachung der DNA-Fragmente das Agarose-Gel unter UV Licht fotografiert.

Um genaue Aussagen über eine mögliche Introgression treffen zu können war eine ausschließliche Analyse mittels WIN3 nicht ausreichend. Weitere Analysen, welche nachfolgend beschrieben werden, wurden durchgeführt.

4.4.3. Mikrosatellitenanalyse im Zellkern

Im Zuge der Analyse der Introgression von Hybridpappelgenen wurden (exklusive der WIN3-Analyse) 17 Genorte im Zellkern einer jeden genommenen Probe untersucht.

Mikrosatelliten-Orte im Zellkern werden co-dominant vererbt, somit sind Vater und Mutterallele erkennbar. Es lässt sich bei gleichzeitiger Betrachtung mehrerer Genorte für jedes untersuchte Individuum ein eindeutiger genetischer Fingerabdruck erstellen (RATHMACHER et al., 2008).

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die untersuchten Genorte, die Wiederholungssequenz des Mikrosatellits je Genort und die PCR-Gruppe, da mehrere Primer in eine PCR-Gruppe zusammengefasst wurden:

Tabelle 3: Untersuchte Mikrosatelliten Loci samt Wiederholungssequenz und PCR-Gruppe. Quellen:

A: Tuksan et al., 2004. B: Van der Schooth et al., 2000. C: SMULDERS et al., 2001. D: RAHMAN et al., 2000. E: DAYANANDAN et al., 1998. F: Poplar Molecular Genetics Cooperative (<http://www.ornl.gov/sci/ipgc>) zitiert nach VANDEN BROECK et al., 2006. G: zitiert nach POLITOV et al., 2015. H: zitiert nach MADRITCH et al., 2009. I: zitiert nach FUSSI, 2010
 * Das repeat motif des Genortes ORNL214 konnte weder in der Literatur, noch durch Nachfrage beim BFW ausfindig gemacht werden. Der in der Literatur oftmals zitierte Link des Oak Ridge National Laboratory ist nicht mehr verfügbar.

Genort	Wiederholungssequenz des Mikrosatellits	Farbmarkierung des Primers	PCR-Gruppe
wpms14 ^C	(CGT) ₂₈₋₃	grün	1
wpms17 ^C	(CAC) ₁₅₋₁	blau	
wpms20 ^C	(TTCTGG) ₈	schwarz	
wpms09 ^B	(GT) ₂₁ (GA) ₂₄	blau	2
wpms15 ^C	(CCT) ₁₄₋₃	schwarz	
PMGC14 ^F	(CTT)	blau	
ORNL214*		grün	
wpms16 ^C	(GTC) ₈ (ATCCTC) ₅	blau	3
PTR8 ^D	(A) ₁₁ (CT) ₈	grün	
ORPM86 ^G	(CTT) ₅	schwarz	
Yin2 ^I	(AAC)	blau	
ORPM344 ^H	(TC) ₈	schwarz	4
GCPM1894 ^I	(TAT)	blau	
ORPM29 ^A	(AC) ₁₁	blau	
ASP112322 ^I	(AG)	grün	5
GCPM1719 ^I	(AAG)	schwarz	
PTR4 ^E	(TC) ₁₇	blau	

Die in Tabelle 3 genannten Mikrosatelliten wurden für unterschiedliche Pappelarten entwickelt. Die WPMS-Marker wurden beispielsweise durch Untersuchungen an *Populus nigra* durch VAN DER SCHOOTH et al. (2000) und SMULDERS et al. (2001) entwickelt.

ORPM steht für Oak ridge Populus microsatellites und wurden für *Populus trichocarpa* entwickelt (TUKSAN et al., 2004). Der Primer PMGC14 (Poplar Molecular Genetics

Cooperative) wurde ebenfalls für *Populus trichocarpa* entwickelt (TABBENER & COTTRELL, 2001).

Die Primer PTR4 (DAYANANDAN et. al., 1998) und PTR8 (RAHMAN et. al, 2000) wurden für *Populus tremuloides* entwickelt.

4.4.3.1. Vorgehensweise

Wie bereits unter 4.4.2. beschrieben, wurde auch bei der Mikrosatellitenanalyse die auf 10 ng / µl verdünnte DNA als Basis für die nachfolgende PCR genommen.

4.4.3.2. Durchführung der PCR

Die Vorbereitung der extrahierten und verdünnten DNA erfolgte mittels Quiagen Multiplex PCR Kit (100) Cat No./ID: 206143 (www.quiagen.com). Es wurden – wie in Tabelle 3 dargestellt – pro PCR mehrere Primer zur Auswertung zusammengefasst. Für die Gruppen 1, 3, 4 und 5 erfolgte die „Multi55 PCR“ wie in Tabelle 4 nachfolgend beschrieben:

Tabelle 4: Multi55 PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1)	95°C	15 min
2)	94°C	30 sec
3)	55°C	90 sec
4)	72°C	60 sec
5)	Wiederholung der Schritte 2) – 4) 34x	
6)	60°C	30 min
7)	4°C	Ende

Lediglich für die Gruppe 2 wurde die Multi58 PCR durchgeführt. Der Unterschied zur Multi55 PCR liegt in der Temperatur in Schritt 3), welche bei der Multi58 PCR bei 58 °C lag.

4.4.3.3. Auswertung am Kapillarelektrophorese-Gerät CEQ™ 8000 Beckman Coulter

Nach der Durchführung der PCR erfolgte die Auswertung der Ergebnisse durch eine Fragmentanalyse (Frag-3) am Kapillarelektrophorese-Gerät CEQ™ 8000 © Beckman Coulter.

Gemäß GRAF (2006) werden bei der Elektrophorese geladene Teilchen, welche sich in einer Elektrolytlösung befinden, unter Einfluss eines elektrischen Feldes aufgrund unterschiedlicher Wanderrichtungen und / oder –geschwindigkeiten getrennt.

Die Kapillar-Gel-Elektrophorese (Capillary Gel Electrophoresis, CGE), welche im Zuge dieser Auswertung durchgeführt wurde, ist bei der Analyse von DNA das Mittel der Wahl, da DNA-Moleküle in der Fragmentlänge große Variationen aufweisen (können), die Ladungsstärke bei unterschiedlicher Fragmentlänge jedoch kaum schwankt. Eine Trennung der Fragmente nur auf Basis von Ladungsunterschieden ist somit wenig geeignet. Durch die Kapillar-Gel-Elektrophorese passieren die DNA-Fragmente in der Kapillare ein Gel; kürzere DNA-Fragmente passieren das Gel schneller und erreichen den Detektor früher als lange DNA-Fragmente (WHATLEY, o.J.).

Mit Hilfe des CEQ8000 erfolgte eine automatische Bestimmung der Fragmentlänge der durch die PCR vervielfältigten DNA-Abschnitte (BECKMAN COULTER, 2004). Wie bereits unter 4.4.3. beschrieben, wurden die in Tabelle 3 angeführten Primer mittels Spezialfarben markiert, um diese für die weiteren Analyseschritte sichtbar zu machen.

Zusätzlich zu der Farbmarkierung erfolgte die Auswertung am CEQ8000 durch Hinzufügen des Master-Mixes zu dem jeweiligen PCR Ergebnis, welcher aus der Sample Loading Solution (SLS), REF 608082 Beckman Coulter und dem DNA Size Standard Kit – 400, REF 608098 Beckman Coulter, bestand. Pro Probe (1 µl des PCR Ergebnisses) wurden 30 µl SLS und 0,7 µl Standard400 hinzugefügt. Der Size Standard 400 enthält Fragmente der folgenden Längen: 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 und 420 Nukleotide (BECKMAN COULTER 2017) und dient als Referenzwert für die nachfolgende Auswertung.

Nach erfolgter Befüllung der Probenplatte wurden die mit dem Mastermix versetzten Proben mit einem Tropfen Mineralöl (Beckman Coulter) bedeckt und in die vorgesehene Halterung im CEQ8000 eingebracht. Der DNA Sequencing Separation Buffer REF 608012 wurde in die Pufferplatte gefüllt und ebenfalls an dem vorgesehenen Ort platziert.

Der Wetting Tray – in welchen die Kapillaren nach Beendigung der Fragmentanalyse zu ihrem Schutz getaucht werden – und Gel-Kartusche (GenomeLab™ Separation Gel (Linear Polyacrylamide)) wurden ebenfalls eingesetzt.

Die Parameter für die Frag-3 Analyse sind wie folgt (ROBY et al., 2002):

- a: Kapillartemperatur: 50°C
- b: Denaturierungs-Temperatur: 90°C, Dauer 120 Sekunden
- c: Einspeisung der DNA in die Kapillare bei 2 kV für 30 Sekunden
- d: Trennung der DNA bei 6 kV, Dauer 35 Minuten

Am CEQ8000 können maximal 96 Proben gleichzeitig ausgewertet werden. Jede der 8 Probenreihen (A-H) enthält 12 – mit maximal 4 Farben – markierte Proben, welche

4.5. Auswertung der Mikrosatelliten

4.5.1. Auswertung der CEQ-Daten

Nach erfolgter Durchführung der Frag-3 Analyse am CEQ8000 wurden die Ergebnisse mittels zugehöriger Software CEQ™ 8000 Genetic Analysis System © Beckman Coulter ausgewertet. Das Softwareprogramm stellt die im Kapillarelektrophoresegerät durch den Detektor aufgenommenen, farblich markierten Fragmente je nach Fragmentlänge graphisch als Kurve (Peaks) dar. Die Kurvenwerte (Peakwerte) wurden händisch in Excel erfasst. In Summe ergab diese Auswertung 14.926 Werte (439 Proben inklusive Referenzproben, 17 Genorte, 2 mögliche Allele je Probe) als Basis für die folgenden Analysen. Abbildung 15 zeigt die Peaks der Probe 999035-01, PCR-Gruppe 1, Genorte WPMS14 (grün), WPMS17 (blau) und WPMS20 (schwarz). Es wurden die beiden höchsten Peaks (bei zwei Allelen) je Genort erfasst. Sofern nur ein Peak (und somit nur ein Allel) am jeweiligen Genort auftrat, wurde dieser Wert doppelt erfasst, da für die nachfolgenden Auswertungen immer 2 Werte je Genort erforderlich waren. Bei wenigen Proben war es auch nach 3 Wiederholungen der PCR und der Datenanalyse am CEQ8000 nicht möglich, die Fragmentlängen mancher Genorte festzustellen. In diesem Fall wurden die Allele mit 0 in der Excel-Tabelle erfasst. Von 14.926 erfassten Werten wurde 235 mal der Wert 0 vermerkt. 1,6 % aller betrachteten Allele konnten somit auch nach 3maliger Wiederholung der PCR und der Analyse am CEQ8000 nicht quantifiziert werden. Bei 383 (87,2 %) von 439 analysierten Proben konnten alle Allele quantifiziert werden. 23 der 56 Proben, von denen nicht alle Allele quantifiziert werden konnten wiesen maximal 2 mal den Wert 0 (von in Summe 34 Werten je Probe) auf. Die restlichen 33 Proben wiesen 2 oder mehr Fehlwerte auf.

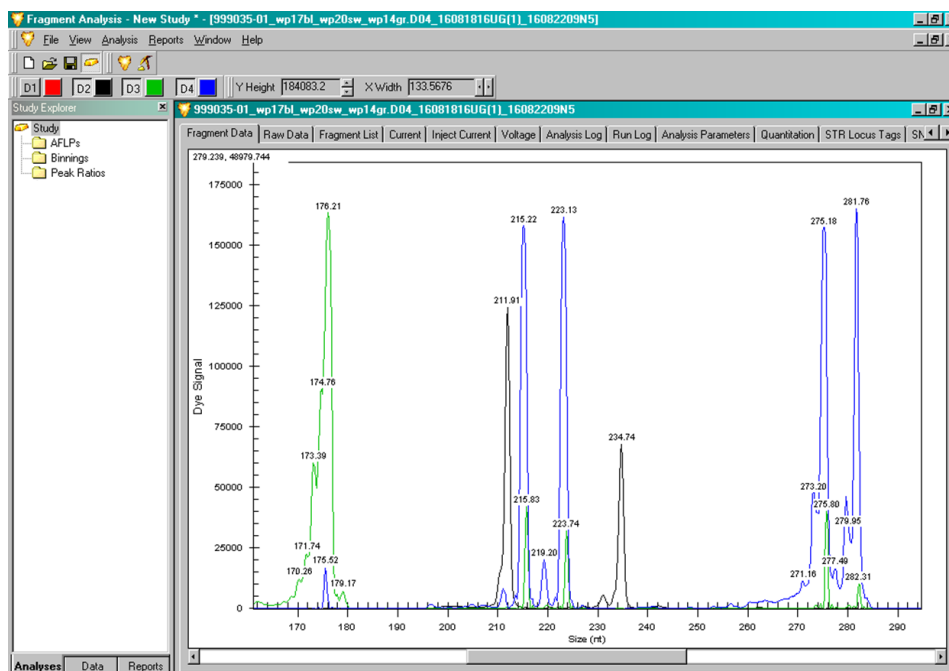


Abbildung 15: Auswertung der Probe 999035-01 mittels CEQ™ 8000 Genetic Analysis System © Beckman Coulter

Die in Excel auf 2 Kommastellen erfassten „wahren“ Werte aus der Fragmentanalyse wurden in „theoretisch wahre“ Gruppen gemäß den Wiederholungsfrequenzen der Mikrosatelliten unterteilt, um eine weitere Analyse möglich zu machen. Die Unterteilung erfolgte aufgrund von Sprüngen in den Fragmentlängen. Ein Auszug der Gruppenzuordnung des Genorts WPMS15 ist in Tabelle 6 ersichtlich:

Tabelle 6: theoretisch wahre Werte und Gruppenzuordnung nach Fragmentlängen

Wahrer Wert Fragmentlänge	Gruppenzuordnung Fragmentlänge
193,34	193
193,8	
195,02	196
195,17	
196,38	
196,38	
196,39	
196,48	
196,62	
196,72	
198,21	199

Im Zuge der Auswertung wurde erkannt, dass 2 Genorte (ORPM86 und Yin2) für eine weitere Analyse zu unspezifisch waren. Daher wurden die Mikrosatellitenanalyse nur anhand von 15 statt ursprünglich 17 Genorten durchgeführt.

4.5.2. Rechnerische Auswertung der Abweichungen

Nachdem für alle wahren Werte die theoretisch wahren Werte (wie in Tabelle 6 exemplarisch dargestellt) festgelegt wurden, erfolgte die Auswertung der Allelhäufigkeiten (vorkommende Fragmentlängen) für jedes einzelne Allel pro Genort.

Für jede einzelne Probe wurde jede vorkommende Fragmentlänge über alle 15 verbliebenen Genorte (30 mögliche Werte) mittels 2 Verfahren verglichen.

1. Vergleich der festgestellten Fragmentlängen (pro Allel) mit einer seitens des BFW zur Verfügung gestellten Vergleichswertliste
2. Vergleich der festgestellten Fragmentlänge (pro Allel) mit den Fragmentlängen der bekannten Hybrid-Referenzproben

Weiters wurden selten vorkommende Fragmentlängen extra markiert. Ein Beispiel für eine seltene Fragmentlänge stellt der Wert 127 für Allel 1 des Genorts WPMS17 dar, da dieser Wert nur einmal vorkommt. Dieser Wert wurde markiert um in einem weiteren Schritt genauer untersucht zu werden.

Es wurden alle Proben als abweichend und somit potentiell hybridbeeinflusst betrachtet, welche am Ende der Auswertung entweder einen gänzlich abweichenden Genort (beide vorkommende Allele weichen stark von den Referenzwerten ab) und einen seltenen Wert aufwiesen oder mindestens 2 gänzlich abweichende Genorte auftraten, falls kein seltener Wert aufschien.

4.5.3. R 3.3.2, RStudio 1.0.44 und PoppR 2.3.0

© The R Foundation <https://www.r-project.org/> 30.03.2017

© 2016 RStudio <https://www.rstudio.com/> 30.03.2017

R ist eine Programmiersprache und Programmumgebung für statistische Berechnungen und graphische Auswertungen. R ist frei verfügbar und bietet viele verschiedene Möglichkeiten für lineare und nicht-lineare Modelle, klassische statistische Test, Klassifikationen und Cluster-Analysen. Die Programmiersprache und Programmumgebung wird durch Nutzer ständig weiterentwickelt, die ordentlichen Mitglieder der R-Foundation werden aufgrund ihres Beitrages zur Weiterentwicklung des Programmes gewählt (THE R FOUNDATION, o. J).

RStudio ist eine in R integrierte Weiterentwicklung und bietet die Möglichkeit, R einfacher und strukturierter handzuhaben. Es ist ebenfalls frei verfügbar (RSTUDIO, 2016).

R bzw. RStudio wurden unter Verwendung des Packages „PoppR“ in dieser Masterarbeit zur Analyse der Daten herangezogen.

Das Package „PoppR“ wurde von KAMAR et al., 2014 entwickelt und ermöglicht die Datenanalyse von beigemengten, klonalen, gemischten und / oder sexuellen Populationen. PoppR kann für Analyse von dominanten / co-dominanten und haploiden / diploiden genetischen Daten verwendet werden.

Das Erkennen von Clustern und die Entdeckung genetisch ähnlicher oder gleicher Bäume waren zwei Kernpunkte der Analysen mit R / RStudio / PoppR.

4.5.3.1. Dateneingabe

Nach erfolgtem Download und der Installation von R / RStudio und PoppR wurden folgende Dateneingaben vorgenommen (die gesamte Dateneingabe findet sich im Anhang D):

Als erster Schritt wurde die Excel-Tabelle mit den Fragmentlängen (den theoretisch wahren Werten) in einem R kompatiblen Format als STRUCTURE (.str) Datei gespeichert und in RStudio / Package PoppR importiert.

Nach erfolgter Festlegung des Dateneingabeformats und den Parametern, welche die eingegebenen Daten charakterisieren (beispielsweise die Anzahl der Individuen, Anzahl der Marker) wurde eine Cutoff Distance von 6 festgelegt. Eine Cutoff Distance von 6 bedeutet, dass alle Individuen, welche 6 oder weniger als 6 unterschiedliche Genorte (somit mindestens 9 übereinstimmende Genorte) aufweisen, in den gleichen Cluster zusammengefasst werden. Diese Clusterzuteilung ermöglicht eine erste Einschätzung von Verwandtschaftsgraden.

4.5.4. Cervus 3.0.7

© Tristan Marshall 1998 – 2014 Field Genetic Ltd www.fieldgenetics.com 01.04.2017

Der in der weiteren Erläuterung als „Vaterschaftsanalyse“ bezeichnete Vorgang kann auch als „Mutterschaftsanalyse“ bzw. „Elternanalyse“ je nach vorliegenden Daten durchgeführt werden.

Das Windows-basierte Computerprogramm Cervus, welches im Rahmen einer Verwandtschaftsstudie bei Rothirschen (*Cervus elaphus*) entwickelt wurde, bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten der Vaterschaftsanalyse (MARSHALL et al., 1998).

Vaterschaftsanalysen basieren auf der Analyse bzw. dem Vergleich von hoch polymorphen und co-dominant vererbten Markern wie beispielsweise Mikrosatelliten. Vor der Entwicklung des Programms Cervus erfolgte die Vaterschaftsanalyse durch ein Ausschlussverfahren (MARSHALL et al., 1998). Es wurden genetische Daten der möglichen Väter mit jenen der Nachkommen verglichen und bei Nichtübereinstimmung eines einzelnen Datensatzes wurden die Kandidaten ausgeschlossen. Wenn nach dieser Prozedur ein möglicher Kandidat übrig blieb, so wurde er als Vater betrachtet (CHAKRABORTY et al., 1974). Kam es jedoch zu der Situation, dass mehrere mögliche Kandidaten übrig blieben, konnte die Frage der Vaterschaft nicht geklärt werden.

Cervus wählt daher den Zugang über die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft (MARSHALL et al., 1998).

4.5.4.1. Berechnungsgrundlagen der Vaterschaftsanalyse

Auf genotypischer Ebene besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Genorte analysiert / typisiert werden (können), weshalb eine Lösung notwendig war, die Fehler in einem gewissen Ausmaß erlaubte, ohne die Vaterschaft aufgrund eines nicht übereinstimmenden Genorts von vorneherein auszuschließen (MARSHALL et al., 1998).

Die Feststellung der Vaterschaft in Cervus erfolgt über ein Wahrscheinlichkeitsverhältnis. Unter mehreren Kandidaten ist jener Kandidat der wahrscheinlichste Vater, dessen Wahrscheinlichkeitsverhältnis am größten im Vergleich zu den anderen Kandidaten ist. Das Wahrscheinlichkeitsverhältnis wird als LOD-Wert (Abbildung 16) ausgedrückt und für alle möglichen Väter berechnet (KALINOWSKI et al., 2007).

$$\text{LOD}_a = \ln \left[\frac{L(H_1)}{L(H_2)} \right]$$

Abbildung 16: Formel Berechnung LOD. Quelle: KALINOWSKI et al., 2007

Die Wahrscheinlichkeit L der Hypothese H_1 [$L(H_1)$], dass der überprüfte Kandidat der wahre Vater ist, wird mit der Wahrscheinlichkeit der Hypothese H_2 [$L(H_2)$], dass der Kandidat nicht der wahre Vater ist, verglichen (MARSHALL et al., 1998). Werden – wie auch in dieser Arbeit – mehrere Genorte untersucht, die nicht gemeinsam vererbt werden (siehe 4.4.3.), so werden die Wahrscheinlichkeitsverhältnisse pro Genort miteinander multipliziert und der natürliche Logarithmus (\ln) berechnet. Dieses Ergebnis wird als LOD-Wert bezeichnet (MARSHALL et al., 1998).

Ein LOD-Wert von 0 bedeutet, dass der mutmaßliche Vater mit der gleichen Wahrscheinlichkeit der tatsächliche Vater ist, als ein völlig zufällig ausgewähltes männliches Individuum. Ein positiver LOD-Wert gibt an, dass der mutmaßliche Vater mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der tatsächliche Vater ist, als ein völlig zufällig ausgewähltes männliches Individuum (MARSHALL et al., 1998). Ein negativer LOD-Wert kann vorkommen und führt zu der Schlussfolgerung, dass der mutmaßliche Vater weniger Übereinstimmung als ein zufällig ausgewähltes männliches Individuum aufweist (KALINOWSKI et al., 2007) bzw. nur oft vorkommende, „gewöhnliche“ Allele gemeinsam bei mutmaßlichem Vater und Nachkommen auftreten (MARSHALL et al., 1998).

Berücksichtigt man die beiden wahrscheinlichsten Väter, so wird der Logarithmus des Wahrscheinlichkeitsverhältnisses als Δ (gleich der Differenz der LOD-Werte) definiert. Mittels Computersimulation der Vaterschaft werden kritische Werte für Δ ermittelt, welche geeignet sind, die Vaterschaft einem gewissen männlichen Individuum innerhalb eines statistischen Vertrauensintervalls zuzuweisen. Ein LOD-Wert von 0 wurde als Grenzwert für die Berechnung von Δ angenommen (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007). Weist ein Individuum einen LOD-Wert unter 0 auf, wird dieses als möglicher Vater ignoriert (KALINOWSKI et al., 2007).

Das Wahrscheinlichkeitsverhältnis für die Vaterschaft bei unbekannter Mutter – ein Umstand unter dem die Studie an den Rothirschen durchgeführt wurde – wird unter Annahme des Hardy-Weinberg-Equilibriums berechnet (MARSHALL et al., 1998).

4.5.4.2. Akzeptanz von Fehlern in der Auswertung

Aufgrund der Tatsache, dass genetische Daten in den seltensten Fällen fehlerlos sind, kann die Durchführung der Vaterschaftsanalyse durch ein Ausschlussverfahren rasch zu falschen oder keinen Ergebnissen führen. Eine Nichtübereinstimmung kann beispielsweise durch eine fehlerhafte Typisierung eines Genorts, einer Mutation am untersuchten Genort oder durch ein Nullallel hervorgerufen werden und muss nicht immer automatisch die Vaterschaft ausschließen (MARSHALL et al., 1998). Cervus erlaubt Fehler daher in einem gewissen prozentuellen Umfang, welcher vom Benutzer selbst festgelegt werden kann (Error rate in likelihood calculations).

4.5.4.3. Simulation der Vaterschaft

Um eine Vaterschaftsanalyse durchführen zu können wird zuerst eine Simulation der Vaterschaft durchgeführt (Simulation of parentage analysis). Die Simulation der Vaterschaft dient dazu, jenen LOD oder Δ Wert festzulegen, bei / ab welchem der mögliche Vater auch der wahre Vater ist (FIELD GENETICS Ltd., 2017).

Cervus bildet hierzu die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft durch die Allelhäufigkeit an den betreffenden Genorten ab. Die Auswertung der Allelhäufigkeit findet sich im Anhang E. Es werden auch parallele Simulationen für Vaterschaftsanalysen, bei denen die genetischen Daten der Mutter unbekannt sind, durchgeführt (KALINOWSKI et al., 2007).

Auf Basis des Hardy-Weinberg-Equilibriums werden mütterliche und väterliche Genotypen aus den auftretenden Allelhäufigkeiten zusammengesetzt und die Nachkommenschaft gemäß den Mendel'schen Vererbungsregeln abgebildet. Es werden auch Genotypen für eine gewisse Anzahl an nicht-verwandten männlichen Individuen generiert. Diese Daten von allen Individuen werden im nächsten Schritt abgeändert und dazu verwendet, die Existenz von nicht beprobten möglichen Vätern, fehlenden oder fehlerhaft typisierten Genorten wiederzugeben (KALINOWSKI et al., 2007). In der Simulation wird davon ausgegangen, dass für jeden Nachkommen der wahre Vater bekannt ist (FIELD GENETICS Ltd., 2017).

Um eine Verteilung der Δ Werte feststellen zu können erfolgt die Simulation für 10.000 Nachkommen (KALINOWSKI et al., 2007).

Cervus vergleicht die Verteilung der LOD und Δ Werte auf 2 Varianten. Bei Variante 1 ist jenes Individuum, welches als der „wahrscheinlichste“ Vater aufscheint auch der tatsächliche Vater; in Variante 2 ist der „wahrscheinlichste“ Vater nicht der wahre Vater. Dies führt zur Ermittlung jener LOD- und Δ Werte, welche von den Kandidaten in der tatsächlichen

Auswertung überschritten werden müssen, um als „wahre“ Väter ermittelt zu werden (FIELD GENETICS Ltd., 2017).

Gibt man in weiterer Folge Cervus die Vorgabe, dass ein Vertrauensintervall von 95 % erreicht werden muss, identifiziert Cervus jenen Δ Wert, welcher von 95 % der wahren Väter erreicht oder überschritten wird (KALINOWSKI et al., 2007).

Die Simulation der Vaterschaft ist eine Voraussetzung um die tatsächliche Vaterschaftsanalyse durchführen zu können.

Eingangsparameter in die Simulation der Vaterschaft

Um die simulierten Daten möglichst realistisch darzustellen finden die in Tabelle 7 beschriebenen, tatsächlich auftretenden Werte Eingang in die Simulation. Das gesamte Simulationsprotokoll ist im Anhang F ersichtlich.

Tabelle 7: Eingangsparameter in die Simulation der Vaterschaft

Anzahl der Nachkommen	10.000 als Simulationsbasis seitens Cervus vorgegeben / empfohlen
Anzahl der Kandidaten (Vater / Mutter)	hier wird die tatsächliche Anzahl der beprobten Individuen angegeben, im Falle dieser Arbeit 121 mögliche Eltern
Anteil der beprobten Eltern (Vater / Mutter)	Wie viele % der potentiell möglichen Eltern wurden beprobt und analysiert? Nach Rücksprache DI Dr. Berthold Heinze (BFW) wurde dieser Wert mit 0,01 = 1 % festgelegt
Anteil der typisierten Genorte	Wie viele % der untersuchten Genorte konnten im Durchschnitt über alle Proben typisiert werden? In der gegenständlichen Untersuchung wurden 30 Genorte typisiert. Bei 406 von 439 Proben konnten mindestens 27 von 30 Genorten typisiert werden. Somit konnten bei 92,5 % der untersuchten Individuen mindestens 90 % der Genorte ausgewertet werden. Der Anteil der typisierten Genorte liegt somit bei 0,9 = 90 %.
Anteil der nicht oder fehlerhaft typisierten Genorte	0,1 = 10 %
Verwendeter Wert für die Festlegung der Vaterschaft	Δ
Mindestanzahl der typisierten Genorte je Probe um für die Auswertung in Frage zu kommen:	10 (75 % der untersuchten Genorte, laut Cervus soll eine Zahl > 50 % gewählt werden).

	Bei der Auswertung in R wurde Individuen in einen Cluster zusammengefasst, wenn diese mindestens 9 übereinstimmende Genorte aufwiesen. Zieht man bei der Cervus Analyse von der Mindestanzahl der typisierten Genorte 10 den Anteil der nicht oder fehlerhaft typisierten Genorte (10 % = 1,5 Genorte) ab, so erhält man aufgerundet als untersten Wert 9 Genorte, die – wie in der Auswertung mit R – übereinstimmen müssen.
Vertrauensintervall	Cervus führt die Berechnungen mittels 2 Vertrauensintervallen durch: strict = 95 %; relaxed = 80 %

Nach erfolgter Simulation der Vaterschaft kann die tatsächliche Vaterschaftsanalyse durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Vaterschaftsanalyse werden unter 5.4. dargestellt.

4.5.4.4. GenAIEx 6.502 – Genetic Analysis in Excel

(PEAKALL & SMOUSE 2006, 2012)

GenAIEx (Genetic Analysis in Excel) ist über den Link <http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Welcome.html> frei erhältlich und ermöglicht die Analyse von diploiden co-dominanten, haploiden und binären Genorten und DNA Sequenzen in Excel. Sowohl frequenzbasierte (Allelhäufigkeiten) als auch auf genetischer Distanz beruhende Tests können mittels des Packages GenAIEx durchgeführt werden. Zu den frequenzbasierten Tests in GenAIEx zählen der F-Test, das Hardy-Weinberg-Equilibrium, Populationszugehörigkeit und Verwandtschaftsverhältnisse. Zu den distanzbasierten Analysen, welche in GenAIEx durchgeführt werden können zählen unter anderem AMOVA (Analysis of Molecular Variance), PCoA (Principal Coordinate Analysis) und Mantel Tests (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

Die im Zuge dieser Masterarbeit durchgeführten Tests werden nachfolgend erläutert.

4.5.4.5. Genetische Distanz

Die genetische Variabilität innerhalb einer Population wird über die durchschnittliche Heterozygotie gemessen. Die genetische Differenz zwischen zwei Populationen wird durch die genetische Distanz berechnet (NEI & ROYCHOUDHURY, 1974).

Die genetische Distanz ist ein Maß für die genetische Differenz zwischen Arten oder Populationen, welche mittels numerischer Methoden gemessen werden kann. Hierfür werden die durchschnittlichen Unterschiede zwischen Codonen (eine Sequenz der DNA oder RNA, welche aus einer Abfolge von 3 Nukleotiden besteht, siehe Punkt 4.1.) oder

Abweichungen in den Nukleotiden je Gen für die Berechnung der genetischen Distanz festgestellt (NEI, o. J.). Die genetische Distanz wird als Maß für das Verwandtschaftsverhältnis verwendet. Je geringer die genetische Distanz (ein maximaler „Abstandswert“ von 1 ist möglich), desto größer ist die genetische Ähnlichkeit der Individuen. Die genetische Distanz zwischen den einzelnen Individuen wird in GenAEx in einer Distanzmatrix dargestellt und dient als Grundlage für alle weiteren Berechnungen.

4.5.4.6. PCoA (Principal Coordinate Analysis)

GROWER (1966) entwickelte eine Methode die es ermöglicht, multivariate Daten als Punkte (P_1, P_2, \dots, P_n) in einem euklidischen Raum darzustellen. Sobald die Distanzen $\Delta (P_i, P_j, \dots)$ zwischen den vorkommenden Punkten berechnet wurden, werden aus den Distanzen Koordinaten in Bezug zu den Hauptachsen ermittelt.

Laut ELMACI & BERRY (1999) bedient sich die Principal Coordinate Analysis für die Darstellung der Punkte in einem Koordinatensystem der euklidischen Distanz zwischen den Punkten. Diese Methode startet von einer „Matrix der Unterschiede“ (Distanzmatrix).

Anhand dieser Unterschiede werden die einzelnen Proben in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt, wobei Populationsstrukturen (Cluster) erkannt werden können.

Die PCoA Analyse wurde in dieser Masterarbeit als Ergänzung zu den bisherigen vorgestellten Untersuchungsmethoden verwendet, um die Anzahl von Populationen konkretisieren und überprüfen zu können. Die graphische Darstellung der PCoA Analyse erlaubt die Feststellung der Zugehörigkeit eines jeden einzelnen Individuums zu einer Population oder Subpopulation.

4.5.4.7. AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

Die von WRIGHT (1931) publizierte F-Statistik bietet eine Reihe von Möglichkeiten, die Übereinstimmung von Allelen zwischen Individuen und zwischen Populationen zu messen. Der für die Berechnung und Interpretation des Genflusses bedeutendste Wert ist der sogenannte F_{ST} Wert (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999).

Der F_{ST} Wert berechnet sich durch den erwarteten Heterozygotieanteil der Gesamtpopulation (H_T) minus der mittleren beobachteten Heterozygotie der Subpopulation (H_S) dividiert durch den erwarteten Heterozygotieanteil der Gesamtpopulation (H_T). Somit: $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$ (WERNER; o. J.).

Der F_{ST} Wert steht in direkter Verbindung zur Variation der Allelhäufigkeit zwischen Populationen und ist ebenfalls von der Ähnlichkeit zwischen Individuen innerhalb einer Population abhängig. Liegt der F_{ST} Wert nahe bei 0 (ein Maximum von 1 ist möglich), so

weist die berechnete Allelhäufigkeit zwischen den Populationen kaum Unterschiede auf (HOLSINGER & WEIR; 2009).

EXCOFFIER et al. (1992) entwickelte die Methode der Analysis of Molecular Variance (AMOVA). Diese Methode berechnet analog zum F_{ST} Wert den Wert ϕ_{ST} , welcher das Verhältnis der Abweichungen der Daten aus der Distanzmatrix darstellt (MEIRMANS, 2006).

Das einfachste AMOVA Szenario besteht im Vorliegen von haploiden Daten für mehrere Populationen, ohne eine Unterteilung der Populationen in Sub-Populationen (MEIRMANS, 2006).

Ein etwas komplexerer Fall, beruht auf dem Vorhandensein eines hierarchischen Systems, in dem mehrere Gruppen von Populationen vorkommen (beispielsweise 2 Gruppen mit je 5 Populationen). In diesem Fall wird der Wert ϕ_{CT} für die Differenzierung zwischen den einzelnen Gruppen berechnet und der Wert ϕ_{SC} für den Unterschied zwischen den Populationen je Gruppe. Der Umstand, dass es durch AMOVA möglich ist, hierarchische Strukturen miteinzubeziehen ist ein großer Vorteil dieser Methode (MEIRMANS, 2006).

Die hierarchischen Strukturen in AMOVA beinhalten Individuen, Populationen und Cluster von Populationen (MEIRMANS, 2012).

Für die Darstellung der molekularen Varianz arbeitet GenAlEx mit einer multiplen linearen Regression.

Die nachfolgend beschriebene und anhand zweier Beispiele erläuterte Varianz innerhalb der Individuen bzw. zwischen den Individuen beruht auf abgeänderten Beispielen von COX & SOLOMON (2003).

Varianz innerhalb der Individuen

COX & SOLOMON (2003)

In einer Gruppe von Individuen gibt es für jedes Individuum einen Erwartungswert (μ_j) der Fragmentlänge des Allels A. Y_j stellt die gemessene Fragmentlänge (den beobachteten Wert) für Individuum j für $j = 1, \dots, n_j$ dar. Y_j ist der konkrete beobachtete Wert für ein Individuum. Für jedes Y_j wird folgende Betrachtung durchgeführt:

$$Y_j = \mu_j + \varepsilon_j$$

Wobei $E(\varepsilon_j) = 0$, $\text{var}(\varepsilon_j) = \sigma_\varepsilon^2 = \tau_\varepsilon$

Die Varianz σ_ε^2 ergibt sich im vorliegenden Fall aus der Summe der Abweichungsquadrate von ε_j geteilt durch die Anzahl der Beobachtungen (439 Individuen). τ_ε stellt die Varianz innerhalb der Individuen dar, welche beispielsweise aufgrund von Messfehlern zustande kommt. Der beobachtete Wert Y_j setzt sich somit aus dem Erwartungswert μ_j plus einer

Abweichung der Beobachtung vom Erwartungswert (ε_j) beispielsweise durch Messunsicherheiten zusammen.

Varianz zwischen den Individuen

COX & SOLOMON (2003)

Betrachtet man die beprobten Individuen als zufällig beobachteten Teil einer „unendlichen“ Population mit dem Mittelwert aller Erwartungswerte = Gesamterwartungswert μ , dann gilt, dass sich der Erwartungswert des Individuums j (μ_j) aus dem Gesamterwartungswert μ plus der Abweichung des Gesamterwartungswerte ξ_j zusammensetzt.

$$\mu_j = \mu + \xi_j$$

In weiterer Folge gilt somit für den beobachteten Wert eines Individuums Y_j :

$$Y_j = \mu + \xi_j + \varepsilon_j$$

Der beobachtete Wert Y_j setzt sich somit aus dem Gesamterwartungswert μ , der Abweichung vom Gesamterwartungswert ξ_j und der Abweichung ε_j vom individuellen Erwartungswert zusammen.

Es ist zu beachten, dass $E(\xi_j) = 0$, $\text{var}(\xi_j) = \sigma^2_\xi = \tau_\xi$, $\text{cov}(\varepsilon_j, \xi_j) = 0$

In diesem Fall ist τ_ξ die Varianz zwischen den Individuen.

4.5.5. Structure 2.3.4

(PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003, 2007; HUBISZ et al., 2009)

Das Software-Paket Structure (kostenloser Download unter: <http://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html> 27.03.2017), ist eine modellbasiert Methode, mittels derer Individuen zu einer noch festzustellenden Anzahl von Herkunftspopulationen (K) zugeordnet werden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Charakterisierung der Herkunftspopulation(en) durch ein bestimmtes Muster von Allelhäufigkeiten möglich ist (PRITCHARD et al., 2000).

Die Zuordnung der Individuen zu den jeweiligen Herkunftspopulationen erfolgt über den Vergleich der Allele mehrerer Genorte aller Individuen; die untersuchten Genorte sind bei allen Individuen gleich. Die Voraussetzung zu einer erfolgreichen Analyse ist, dass die verglichenen Gene im Zuge der Vererbung nicht gemeinsam vererbt werden (PRITCHARD et al., 2000) und co-dominant auftreten (CORANDER et al., 2002).

Diese Voraussetzung wird dadurch erfüllt, dass entweder Gene / Genorte untersucht werden, die an verschiedenen Chromosomen beheimatet sind oder – sofern die untersuchten Gene doch am gleichen Chromosom zu finden sind – diese Gene so weit voneinander

entfernt sind, dass auch in diesem Fall eine gemeinsame Vererbung ausgeschlossen werden kann.

Das Hardy-Weinberg Gleichgewicht wird vorausgesetzt (PRITCHARD et al., 2000).

4.5.5.1. Bayes'sches Modell und Markov Chain Monte Carlo

Structure verwendet für die Zuordnung der einzelnen Individuen zu den möglichen Herkunftspopulationen das Bayes'sche Modell (Bayesian Modell) unter Anwendung der Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (PORRAS-HURTADO et al., 2013).

Im Bayes'schen Modell werden Daten miteinbezogen, die bereits vor Erhebung der Daten vorliegen (*a priori*). Die erhobenen Daten werden mit den Vorabinformationen verbunden (UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, 2004).

Im Fall dieser Diplomarbeit ist das Vorwissen die Anzahl der Probenorte in Kombination mit den Referenzproben. Es wurden an 8 Orten Proben entnommen, den 9. „Ort“ stellen die Referenzproben dar und für die Proben, welche nicht selbst gewonnen wurden (8 Stück) wurde der Ort 10 angenommen. Somit lässt sich die Anzahl der möglichen Populationen auf maximal 10 als Richtwert eingrenzen.

Die Schlussfolgerung der Zugehörigkeit im Bayes'schen Modell erfolgt über die Quantifizierung der Unsicherheit, welche unter dem Gesichtspunkt des Vorwissens (vermutlich maximal 10 mögliche Populationen) über Wahrscheinlichkeiten ausgedrückt wird (HOLMES, o. J.).

Der MCMC Prozess wird zur Erreichung der Schlussfolgerung eingesetzt. Es werden zu Beginn die Individuen unter Berücksichtigung der individuellen Allelhäufigkeiten völlig zufällig einer vorab bestimmten Nummer von Gruppen (in unserem Fall die Gruppen des Vorwissens) zugewiesen. Nach erfolgter Simulation der Zugehörigkeiten wird innerhalb jeder Gruppe die Allelhäufigkeit bestimmt. Nach erfolgter Bestimmung der Allelhäufigkeiten innerhalb der Gruppe werden die Individuen anhand der soeben bestimmten Allelhäufigkeiten neu gruppiert. Eine MCMC Wiederholungsanzahl von 100.000 Versuchen der Zuordnung innerhalb jeder als möglich vorgegebenen Populationsanzahl hat sich als sinnvoll erwiesen (PORRAS-HURTADO et al., 2013).

Die Burnin Period gibt die Versuchsanzahl für die Kalibrierung an. Wie viele Zuordnungsversuche sollen durchgeführt und verworfen werden, bevor die Daten gespeichert und als „wahr“ angenommen werden können?

Die Anzahl der Wiederholungen nach der Burnin-Period gibt an, wie viele Zuordnungsversuche pro K (möglicher Populationsanzahl) simuliert werden sollen, um valide Daten zu erhalten.

Die Eingangsparameter für die Auswertung in Structure lassen sich in Tabelle 8 zusammenfassen:

Tabelle 8: Eingangsparameter Structure

* die Hybridpappeln wurden anhand der genannten Auswertungsmethoden ermittelt

Allgemein	Erfasste Werte	Erläuterung
Anzahl der Individuen	439 mit Hybriden bzw 376 ohne Hybriden*	
Anzahl Mikrosatelliten (Genorte)	15	
Ploidiegrad	2 (diploid)	
Wert fehlender Daten	0	
Parameter Set für MCMC		
Burnin Period	100.000	Kalibrierungsvorgang, Zuordenversuche welche verworfen werden
MCMC Wiederholungen nach der Burnin Period	100.000	Das Programm versucht auf 100.000 verschiedene Arten je Population pro Iteration Gruppen zu bilden
Modellwahl	Admixture Model	Das Admixture Model wird gewählt, wenn eine Populationsübergreifende Vererbung von Genen möglich erscheint
Anzahl möglicher Populationen (K)	1 – 12	Es wurden 10 Populationen als möglich erachtet, die 2 zusätzlichen Populationen wurden als „Sicherheitsfaktor“ eingesetzt
Anzahl der Iterationen	10	

Nach einer Burnin-Period von 100.000 „Zuordenversuchen“ werden für jede mögliche Populationsgröße K (1-12) auf 10 verschiedene Arten (Anzahl der Iterationen) 100.000 Versuche (MCMC Wiederholungen) durchgeführt, um jedes Individuum der am besten passenden Population zuzuordnen.

4.5.5.2. Q-Matrix

Der durchschnittliche, individuelle Wert der Zugehörigkeit (cluster membership coefficient) zu einer Population wird in der Q-Matrix repräsentiert. Ein Individuum wird jener Population zugerechnet, für welche der Wert der Wahrscheinlichkeit am höchsten ist (PORRAS-HURTADO et al., 2013).

Im vorliegenden Fall kommt Structure bei K = 2, Iteration 1 zu dem Ergebnis, dass die Probe 002279 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,614 Population 1, und mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,386 Population 2 zugeordnet werden kann. Die Wahrscheinlichkeit summiert sich bei Structure immer auf 1.

Bei der nächsten Iteration (2) und gleichbleibender Populationsanzahl (K = 2) kommt Structure für die gleiche Probe (002279) zu folgendem Ergebnis: Die Wahrscheinlichkeit, dass genannte Probe der Population 1 zugehörig ist, liegt bei 0,701; die Wahrscheinlichkeit für Population 2 bei 0,299. Diese Zuordnung wird für jedes Individuum so oft durchgeführt, wie durch Iterationen (10) und Populationen (12) vorgegeben wird.

4.5.5.3. Auswertung Structure Harvester DENT, E. A. & VONHOLDT, B. M. (2012)

<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> 27.03.2017

Structure Harvester ist ein Web-basiertes Programm für die Auswertung von Structure Ergebnissen. Es erfolgt beispielsweise eine bildliche Darstellung der mittleren Wahrscheinlichkeit L(K) und Varianz je K (DENT, E. A. & VONHODT, B. M., 2012), ähnlich einer Box-and-Whiskers Abbildung.

Die Structure-Ergebnisdatei wird als zip Datei abgespeichert und auf die oben angeführte Plattform geladen. Structure Harvester berechnet jene Anzahl der Populationen („Best K“), welche die von Structure berechneten Daten repräsentieren (DENT, E. A. & VONHODT, B. M.; 2012). In Abbildung 17 liegt der exemplarisch dargestellte Wert von „Best K“ und somit die wahrscheinlichste Anzahl der Populationen bei 4 (höchster Peak).

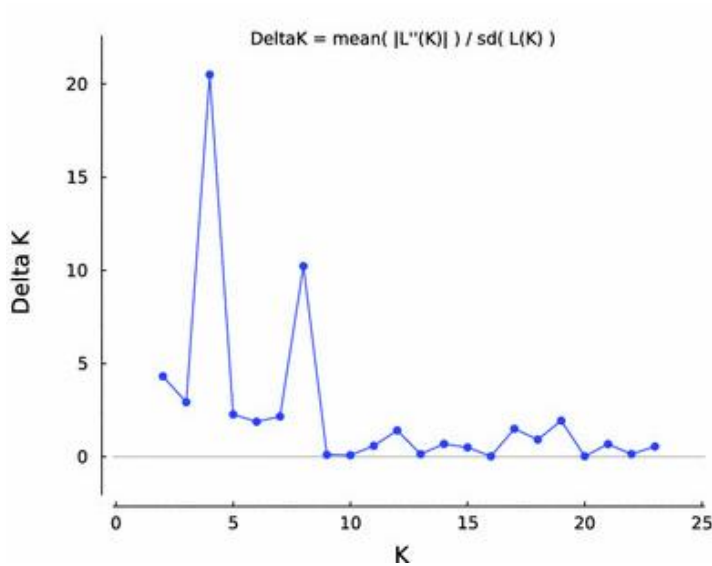


Abbildung 17: Darstellung "best K". Quelle: DENT, E. A. & VONHODT, B. M.; 2012

4.5.5.4. Auswertung CLUMPAK, KOPELMAN et al., 2015

<http://clumpak.tau.ac.il/contact.html> 27.03.2017

CLUMPAK (Cluster Markov Packager Across K, KOPELMAN et al., 2015) ist Structure Harvester ähnlich und liefert mitunter gleiche Ergebnisse.

CLUMPAK fasst ähnliche Allelmuster für unterschiedliche Zuordenversuche je gegebener Populationsanzahl über den Markov-Clustering-Algorithmus, welcher auf einer Ähnlichkeitsmatrix basiert, zusammen. Es entstehen somit für jedes als möglich vorgegebene K Cluster ähnlicher Wiederholungen. Ein Vergleich der Cluster über alle K-Werte wird durchgeführt (KOPELMAN et al., 2015). Das Ergebnis wird wie in Abbildung 17 dargestellt.

4.5.6. Tabellarische Zusammenfassung der Analysemethoden

Nachstehende Tabelle 9 gibt einen Überblick über die durchgeführten Analysemethoden:

Tabelle 9: Zusammenfassung der Analysemethoden

Analysemethode	Erwartete Erkenntnisse
WIN3-Analyse (Gelelektrophorese)	Erster Überblick über: <ul style="list-style-type: none"> ○ Unterschiede in der genetischen Zusammensetzung der gewonnenen Proben ○ Artzugehörigkeit der Individuen ○ Anzahl der „reinen“ Schwarzpappeln ○ Mögliches vermehrtes Auftreten von nicht reinen Individuen je nach Sammelort

Mikrosatellitenanalyse	
R 3.3.2 / R Studio 1.0.44 / PoppR 2.3.0	<p>Nächster Schritt der Analyse, Feststellung von:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Möglichen Clustern innerhalb der gewonnenen Proben • In Kombination mit der WIN3-Analyse Entdeckung möglicher „Hybridcluster“ • Graphische Darstellung der genetischen Distanz der Proben
Cervus 3.0.7	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vaterschaftsanalyse (Jungwuchs-Alt bäume) ○ Überprüfung der Ergebnisse hinsichtlich genetisch identer Individuen
GenAlEx 6.502	<ul style="list-style-type: none"> • Berechnung der Genetischen Distanz für jedes Individuum • Molekulare Varianzanalyse zur Differenzierung der genetischen Variation (AMOVA) • Principal Coordinates Analysis – graphische Darstellung der „Populationscluster“ (PCOA)
Structure 2.3.4 (Structure Harvester, Clumpak)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Genetisches Profil eines jeden Individuums ○ Bestimmung der Anzahl der Ausgangspopulationen (Best K) ○ Graphische Darstellung von reinen Schwarzpappeln, gemischterbigem Individuen und Hybridpappeln

5. Ergebnisse

5.1. WIN3 Analyse

Gemäß HEINZE, 1997b, weist *Populus nigra* bei der Agarose-Gelelektrophorese eine oder zwei Banden auf, die im Bereich von 165bp – 210bp liegen (Abbildung 18). *Populus deltoides* hingegen zeigt eine einzelne Bande bei ca. 265bp (Abbildung 19). Eine Kombination von beiden Merkmalsmustern plus eine extra Bande oberhalb von 300bp (ebenfalls in Abbildung 19 ersichtlich) weist *Populus x canadensis* auf (HEINZE, 1998b).

Abbildung 18 zeigt exemplarisch das Ergebnis der WIN3-Analyse der Jungwuchsproben 999027-20 bis 999029-02. Die vorletzte Tasche auf der rechten Seite zeigt die Referenzprobe „Italica“. In der äußerst linken und rechten Tasche ist der Referenzmarker erkennbar.

Abbildung 19 zeigt eine gemischte Auswertung (Jungwuchs und Alt bäume). Es ist besonders auf die Jungwuchsproben 999035-09 bis 999035-13 und 999035-15 in der Bildmitte

hinzuweisen (1 Bande bei ca. 300bp), da es sich laut DI Dr. Berthold Heinze (BFW) hier um *Populus deltoides* (Kanadische Schwarzpappel) im Jungwuchs handelt.

Die ebenfalls markierte Probe (3 Banden) stellt eine Kombination von Merkmalen durch die Referenzprobe *Populus x canadensis* „Robusta“ dar.

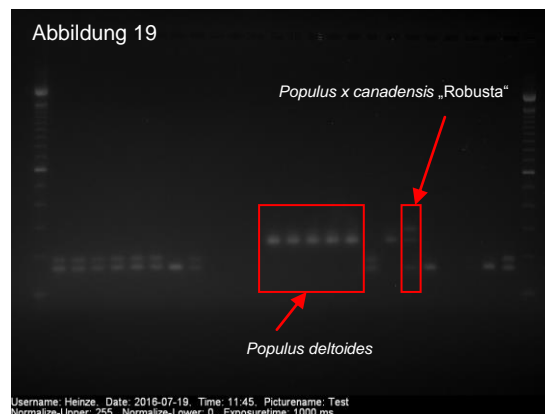
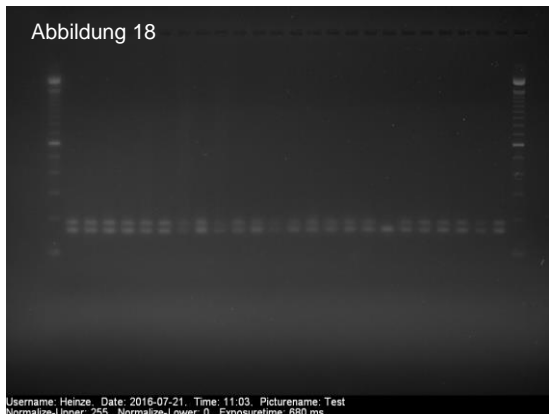


Abbildung 18: Ergebnis der WIN3-Auswertung der Jungwuchspflanzen 999027-20 bis inkl. der Referenzprobe „Italica“.,

Abbildung 19: Ergebnis der WIN3-Auswertung mit besonderem Augenmerk auf die Jungwuchspflanzen 999035-09 bis 999035-13

Die Auswertung aller WIN3-Gelelektrophoresen führte zu dem Ergebnis, dass nach einer ersten optischen Einschätzung 4,9 % (21 Stück) der gewonnenen Proben exklusive der Referenzproben Robusta, AT4 und AT6 einen Einfluss von Hybridpappelgenen aufwiesen. Bei 9,4 % (40 Stück) der Proben konnten keine Banden festgestellt werden. In diesen Fällen war die Qualität der DNA offenbar nicht ausreichend, um eine WIN3 Analyse durchzuführen. In den nachfolgenden Auswertungen konnten für alle 439 Proben (inklusive Referenzproben) Ergebnissen ermittelt werden.

5.1.1. Individuen mit Hybrideinfluss

Folgende Proben wiesen von reinen Schwarzpappeln abweichende Banden auf (exklusive der Referenzproben „Robusta“, AT4 und AT6):

2398, 2446, 2450, 2451, 2452, 2457, 2459, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 999032-05, 999035-09, 999035-10, 999035-11, 999035-12, 999035-13, 999035-15.

5.1.2. Conclusio WIN3-Analyse

Die erste erfolgte Auswertung der extrahierten DNA führte zu dem Ergebnis, dass einige Jungwuchspflanzen abweichende Banden im Vergleich zu reinen Schwarzpappeln aufwiesen. Besonders auffällig schien der Jungwuchs 999035 vom Probenort 7. Die adulten Individuen, welche von reinen Schwarzpappeln abweichende Banden aufzeigten, wurden als Hybridpappeln bzw. Individuen mit Beeinflussung durch Hybridpappelgene quantifiziert. Eine Überprüfung der WIN3-Ergebnisse erfolgte durch weitere Auswerteverfahren.

5.2. Rechnerische Auswertung der Abweichungen

5.2.1. Individuen mit Hybrideinfluss

Folgende Proben wurden – wie in Punkt 4.5.2. erläutert – aufgrund der Abweichungen als potentiell hybridbeeinflusst erfasst:

2327, 2396, 2398, 2446, 2457, 2459, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2483, 2561, 999023-12, 999025-07, 999026-12, 999026-16, 999026-20, 999029-29, 999031-01, 999032-05, 999032-11, 999033-30, 999034-22, 999035-08, 999035-09, 999035-12, 999035-13, 999035-14, 999035-15

5.3. R 3.3.2, RStudio 1.0.44 und PoppR 2.3.0

Nach der Durchführung der WIN3-Analyse, die einen ersten Überblick gab, und der rechnerischen Bestimmung von Abweichungen, erfolgte im nächsten Analyseschritt die Auswertung mit den Programmen R / RStudio / PoppR. Die mit R erstellte, in Abbildung 20 dargestellte Hamming-Distance zeigt die genetische Distanz der ausgewerteten Proben. Ein Großteil der Proben wies 16 oder 17 unterschiedliche Allele von 30 möglichen unterschiedlichen Allelen auf. Um eine Clusterung der Proben zu untersuchen, wurde eine Cutoff Distance von 6 Unterschieden gewählt. Dies bedeutet, dass alle Proben, welche 6 oder weniger unterschiedliche Allele (von 30 möglichen) aufwiesen, dem gleichen Cluster zugerechnet wurden. Die Cutoff Distance von 6 wurde durch einen iterativen Prozess festgelegt.

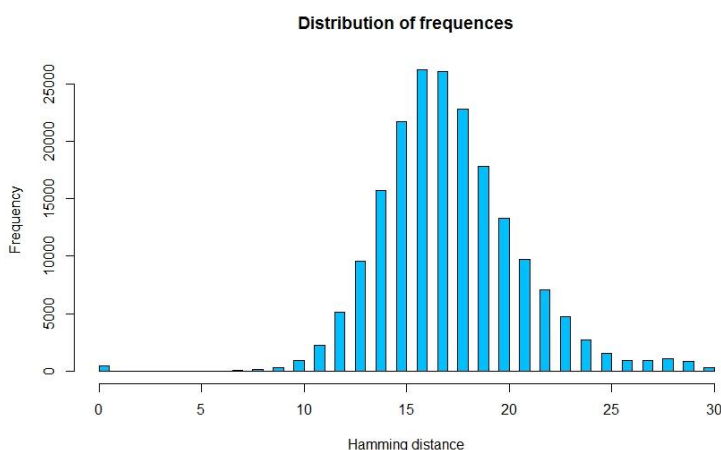


Abbildung 20: Distribution of frequencies, Hamming distance in R

Bei einer Cutoff Distance von 6 wurden 404 Cluster bei 439 Individuen erkannt. Bei den in Tabelle 10 dargestellten Individuen erfolgte laut R eine gemeinsame Clusterzuordnung:

Tabelle 10: Cluster in R

ClusterNr					
16	999024-01	999024-11			
17	999024-02	999024-13	2435		
20	999024-05	999024-07	999024-08		
23	999024-09	999024-10			
43	Robusta1	Robusta2	Robusta3	Robusta5	2471
52	999026-02	999026-19			
67	AT41	AT42	AT43	AT44	
	AT61	AT63	AT64	2459	2396
113	Italica2	Italica3	Italica4	Italica5	
159	999030-18	999030-30			
290	999034-25	999034-27	999034-28	2490	
304	999035-06	999035-07			
336	2377	2378			
354	2398	2457	2465	2467	2470
390	2475	2476			
392	2478	2479			
403	2491	2493			

51 Individuen wurden Clustern zugerechnet, die restlichen 388 Individuen zeigten mehr als 6 unterschiedliche Allele zu jedem anderen Individuum.

Der Cluster mit der höchsten Anzahl an zugehörigen Proben war der Cluster Nr. 67, in welchem sich nahezu geschlossen sämtliche Referenzproben der Familie Abensperg-Traun (Hybridpappeln, Kennzeichnung „AT“) befanden. Lediglich die Probe AT62 wurde diesem Cluster nicht zugeordnet, da diese im Vergleich zur Probe AT63 8 Unterschiede und im Vergleich zur Probe AT61 10 Unterschiede aufwies. Diese genannten Unterschiede waren jedoch nicht eklatant, es handelte sich hierbei teilweise um unterschiedliche Fragmentlängen im Bereich einer Wiederholungssequenz des Mikrosatelliten im Vergleich zur Probe AT61 (Genort WPMS15). Es ist nochmals darauf hinzuweisen, dass alle Proben mit der Kennnummer „AT4_“ und alle Proben mit der Kennnummer „AT6_“ je ein und dieselbe Probe unabhängig der Folgenummer darstellten. Rein theoretisch hätte man bei allen AT4 / AT6 Proben exakt dieselben Fragmentlängen messen müssen. Die Unterschiede in den Fragmentlängen bewegten sich – wie bereits erwähnt – im Bereich der Wiederholungssequenz des Mikrosatelliten (beispielsweise 3 Basenpaare, siehe dazu Punkt 4.5.4.7. Varianz innerhalb der Individuen). Da 7 von 8 Proben richtig zugeordnet wurden, ist auf diesen Umstand zwar hinzuweisen, jedoch handelte es sich um keine grobe Beeinträchtigung der Auswertung.

Betrachtete man die restlichen Cluster so war auffällig, dass in vielen Fällen Folgenummern oder zumindest Proben des gleichen Jungwuchses denselben Clustern (16, 17, 20, 23) zugeordnet wurden. Die Cluster 16, 17, 20 und 23 beinhalteten bis auf die Probennummer 002435 in Cluster 17 nur Proben des Jungwuchses 999024. Ordnete man die Probennummern des Jungwuchses 999024 in ansteigender Reihenfolge, so erhielt man folgende Probenabfolge: 999024-01, 999024-02, 999024-05, 999024-07, 999024-08, 999024-09, 999024-11 und 999024-13.

Bei den Proben 2465, 2467 und 2470 welche im Cluster 354 zusammengefasst wurden, handelt es sich um Hybridpappeln, welche bereits im Zuge der Aufnahme als „wahrscheinliche Hybriden“ vermerkt wurden.

5.3.1. Conclusio der Analyse mit R, RStudio und PoppR

Die durch R festgelegten Cluster gaben erste Hinweise auf Verwandtschaftsverhältnisse und stellen eine Ergänzung der WIN3-Ergebnisse dar. Bei folgenden Individuen war aufgrund der Clusterzuordnung in R von einem Einfluss von Hybridpappelgenen auszugehen (exklusive der Referenzproben):

2396, 2398, 2457, 2459, 2465, 2467, 2470, 2471

5.4. Cervus 3.0.7

Das vollständige Protokoll der Elternschaftsanalyse samt Berechnung der Allelhäufigkeit wird in den Anhängen G und E dargestellt.

Die Elternschaftsanalyse in Cervus zeigte, dass alle 317 Jungwuchsproben an mindestens 10 Genorten getestet werden konnten. Um die Elternschaft als gegeben anzunehmen, musste – da mit co-dominanten Markern gearbeitet wurde – an mindestens 10 Genorten zumindest 1 Allel pro Genort zwischen der Jungwuchsprobe und dem potentiellen Elternteil übereinstimmen.

5.4.1. Jungwuchsproben mit Hybrideltern

Von 22 möglichen Hybrideltern (davon selbst beprobt 19) schienen 15 Hybridindividuen in der Cervus-Analyse als tatsächliches Elternteil auf (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Hybridelternanteile laut Cervus

* Es sind 20 unterschiedliche Probennummern als Hybrid-Jungwuchs quantifiziert worden, wobei eine Doppelnennung der Proben 999031-38, 999035-08 und 999035-10 erfolgte.

Potentielle Hybrideltern auf Basis aller Auswertungen	Lt. Cervus als Elternteil bestimmt	Nachkommen lt. Cervus
2327		
2396	2396	999025-07
2398	2398	999035-08, 999035-10
2446		
2450		
2451	2451	999029-14, 999029-17, 999029-24, 999029-34
2452	2452	999032-12
2457	2457	999034-12
2459		
2464		
2465	2465	999035-10
2466		
2467		
2468	2468	999031-38

2469	2469	999029-23, 999035-11
2470	2470	999035-08, 999035-10
2471	2471	999035-09
2483	2483	999024-05, 999035-13
2561	2561	999026-14, 999031-38
AT4	AT4	999032-05
AT6	AT6	999032-11, 999032-15
Robusta	Robusta	999035-12
Summen		
22	15	20*

Bei 20 von 317 Jungwuchsproben (6,3 %) konnte ein Hybridelternteil laut Cervus nachgewiesen werden. In Anhang H erfolgt die vollständige Darstellung aller Jungwuchsproben mit den dazugehörigen Elternteilen. Bei 5 Jungwuchsproben konnten, wie in Tabelle 12 dargestellt, mehr als ein Elternteil nachgewiesen werden. Die gelb hinterlegten Felder zeigen Hybridelternteile an.

Tabelle 12: Nachkommen mit mehreren beprobten Elternteilen laut Cervus

JW	Elternteil1	matching loci	Elternteil2	matching loci	Elternteil3	matching loci
999035-08	2398	9	2470	9		
999035-10	2398	10	2465	10	2470	10
999027-11	2486	12	2487	12		
999034-20	2486	11	2487	11		
999034-29	2491	13	2493	13		

5.4.1.1. Genetisch idente Proben

Bei der ebenfalls durchgeführten „Identity Analysis“ wurden von Cervus 3 Probenpaare ausgewiesen, die genetische Identität zeigen (Tabelle 13):

Tabelle 13: Ergebnis Identity Analysis Cervus

First ID	Loci typed	Second ID	Loci typed	Matching loci	Mismatching loci	Status
2398	15	2470	15	15	0	Exact match
2486	15	2487	15	15	0	Exact match
2503	15	999035-04	15	15	0	Exact match

5.4.1.2. Graphische Darstellung der übereinstimmenden Genorte

In Abbildung 21 wird die Verteilung der übereinstimmenden Genorte graphisch dargestellt:

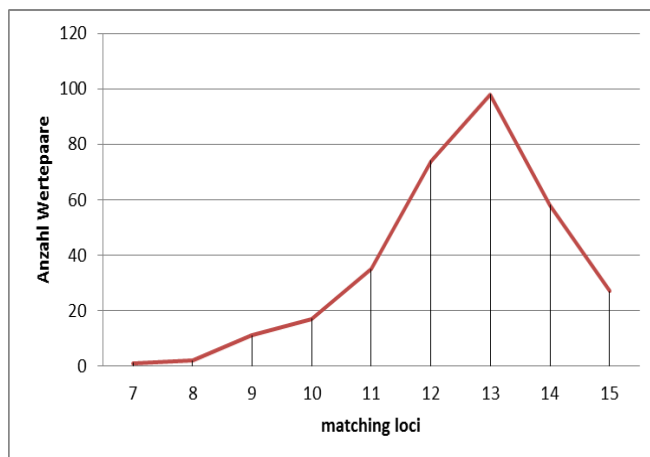


Abbildung 21: graphische Darstellung der übereinstimmenden Genorte

Abbildung 21 basiert auf den Werten der „matching loci“ von 323 Ergebnissen bei 317 Jungwuchsproben. 323 Ergebnisse ergaben sich dadurch, dass Nachkommen, die mehr als einem Elternteil zugewiesen wurden, für jede Zuordnung (vgl. Tabelle 12) erfasst wurden. 98 von 323 zugeordnete Jungwuchsproben wiesen 13 übereinstimmende Allele bei 15 untersuchten Genorten auf. Bei 27 Jungwuchsproben wiesen alle untersuchten Genorte mindestens 1 übereinstimmendes Allel (15 matching loci) mit dem Elternteil auf.

5.4.1.3. Geographische Verteilung Eltern-Nachkommen

Abbildung 22 zeigt die räumliche Verteilung der Eltern-Nachkommen Beziehung. Auch für diese Grafik wurden alle 323 Ergebnisse von 317 Jungwuchsproben als Basis genommen.

Die x-Achse weist sowohl positive als auch negative Zahlen auf. Eine negative Zahl bedeutet, dass der Jungwuchs stromabwärts in östlicher Richtung des Elternteils beprobt wurde, ein positiver Wert weist darauf hin, dass der Jungwuchs stromaufwärts in westlicher Richtung des Elternteils aufgefunden wurde.

90 von 323 Ergebnissen des Jungwuchses (27,9 %) wiesen denselben Sammelort auf wie das zugeordnete Elternteil. Lediglich 11 von 323 Ergebnissen des Jungwuchses (3,4 %) wiesen eine Differenz von 7 Probenorten (unabhängig der Richtung) auf.

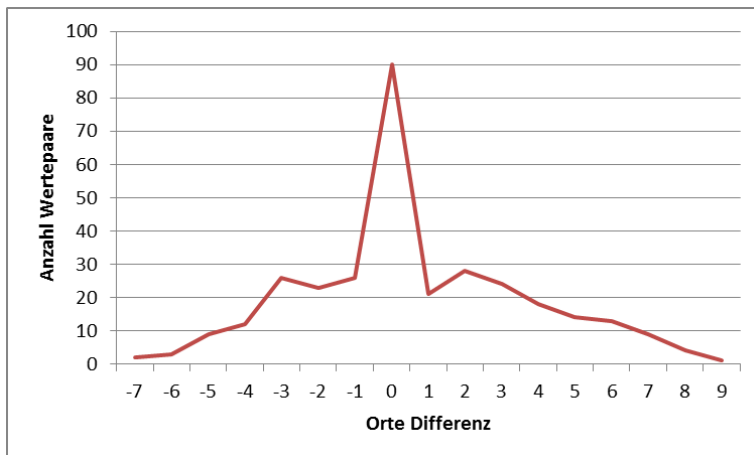


Abbildung 22: räumliche Verteilung der Eltern-Nachkommen Beziehung

Die Differenz von 8 oder 9 Probenorten (beispielsweise Jungwuchsprobe 999023-06) kann dadurch erklärt werden, dass den Referenzproben der Probenort 9, den vom Nationalpark zur Verfügung gestellten Proben der Ort 10 zugewiesen wurde, da der tatsächliche Sammelort unbekannt war. Bereinigt man die Auswertung um alle Proben, welche nicht selbst gewonnen wurden, so weisen nur die in Tabelle 14 angeführten 5 Jungwuchsproben eine tatsächliche Distanz von 7 Probenorten auf:

Tabelle 14: Eltern-Nachkommen mit 7 Orten Differenz

Jungwuchsprobe	Probenort JW	Elternteil	Probenort Elternteil	matching loci
999023-01	1	2492	8	15
999023-02	1	2490	8	15
999024-01	1	2492	8	15
999024-11	1	2492	8	15

5.4.2. Conclusio der Auswertung in Cervus

Von 22 möglichen Hybrideltern schienen tatsächlich 15 Hybridindividuen (68,2 %) als Elternteile auf. 20 Jungwuchspflanzen konnten einem Hybridelternteil zugewiesen werden (6,3 %).

Knapp 1/3 der Jungwuchspflanzen befanden sich am selben Probenort wie zumindest ein Elternteil. 58,2 % der Jungwuchspflanzen befanden sich in einer maximalen Entfernung von 2 Probenorten zum jeweiligen Elternteil.

5.5. GenAEx 6.502

Für Analysen in GenAEx wurden 10 mögliche Sammelorte aus einer Region (Nationalpark Donau-Auen) angenommen. Die beprobten Individuen je Sammelort sind unter Punkt 4.3.5. ersichtlich.

5.5.1. PCoA

5.5.1.1. Mit Hybriden

Abbildung 23 stellt die Auswertung PCoA mit Hybridindividuen, welche sich im rechten oberen Viertel der Grafik befinden, dar.

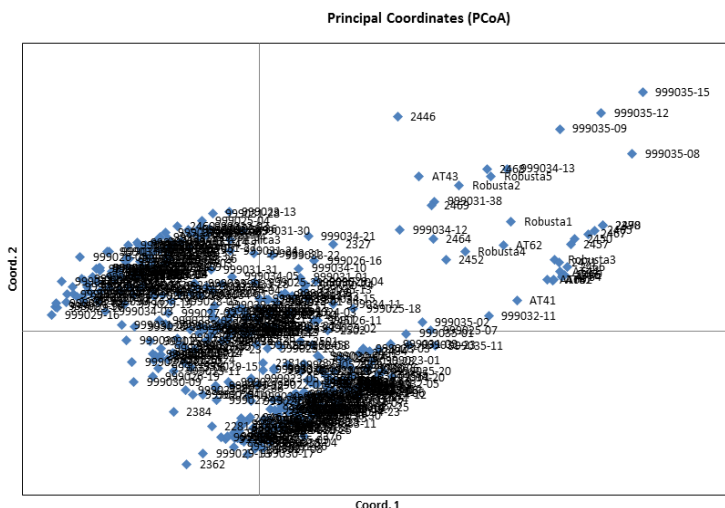


Abbildung 23: PCoA mit Hybriden

Folgende Individuen wurden gemäß der Abbildung 23 als Hybridindividuen ausgeschieden:

2396, 2398, 2446, 2450, 2452, 2457, 2459, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 999031-38, 999032-11, 999034-12, 999034-13, 999035-08, 999035-09, 999035-12, 999035-15, AT41, AT42, AT43, AT44, AT61, AT62, AT63, AT64, Robusta1, Robusta2, Robusta3, Robusta4, Robusta5.

5.5.1.2. Ohne Hybriden

Ohne Berücksichtigung der unter Punkt 5.5.1.1 genannten Hybridindividuen ergab sich folgendes Bild (Abbildung 24):

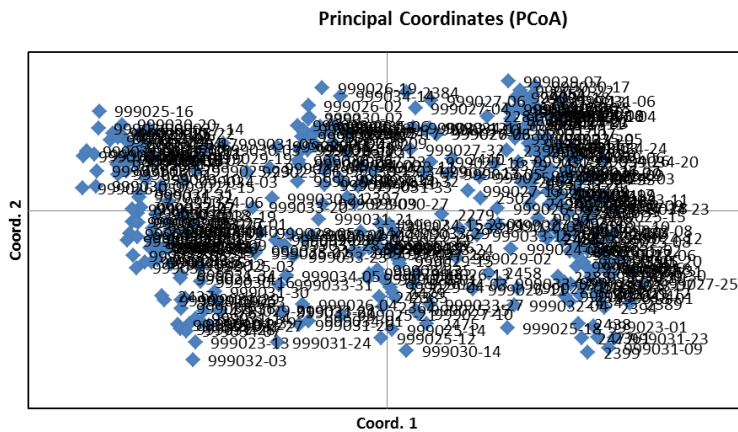


Abbildung 24: PCoA ohne Hybriden

5.5.1.3. Conclusio der PCoA Analyse

In Abbildung 23 sind die Hybridindividuen im rechten oberen Bereich deutlich erkennbar. Sowohl in Abbildung 23 als auch in Abbildung 24 ist eine Art 3er Gruppierung der Proben ersichtlich.

Der Umstand, dass die angedeuteten Gruppen in Abbildung 23 nach rechts und in Abbildung 24 nach links geneigt sind, lässt sich dadurch erklären, dass das Koordinatensystem anhand der vorliegenden Daten „in sich“ kalibriert wurde. Da in Abbildung 24 die Hybridindividuen nicht ausgewertet wurden, berechnete GenAlEx die Koordinaten (die genetische Distanzen darstellen) für jeden Punkt neu und das Koordinatensystem wurde in sich neu kalibriert.

5.5.2. AMOVA

5.5.2.1. Mit Hybriden

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Sammelorte samt Anzahl der beprobten Individuen für die nachfolgende Auswertung mit Hybriden:

Tabelle 15: Sammelorte und Individuenanzahl mit Hybriden

Ort1	Ort2	Ort3	Ort4	Ort5	Ort6	Ort7	Ort8	Ort9	Ort10
36	30	88	48	50	73	41	47	18	8

In Abbildung 25 wird die berechnete molekulare Varianz mit Hybridindividuen dargestellt:

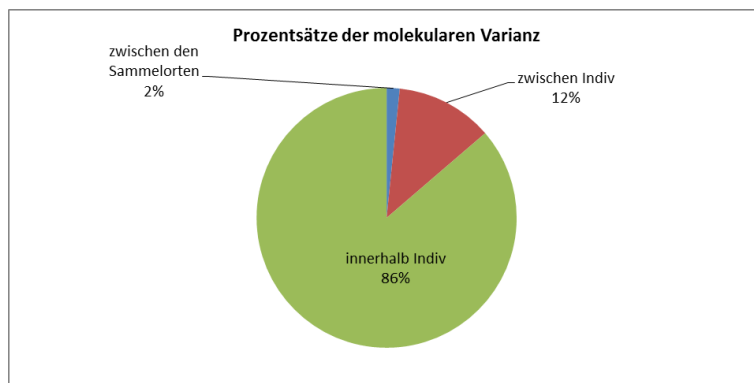


Abbildung 25: AMOVA Analyse mit Hybriden

5.5.2.2. Ohne Hybriden

In Tabelle 16 ist die um die Hybridindividuen bereinigte Probenanzahl je Sammelort dargestellt. Bei den bei Ort 9 (Referenzproben) angeführten 5 Individuen handelt es sich um die Referenzprobe „Italica“, ein Mutant der Schwarzpappel. Im Zuge der Bereinigung wurden sowohl die unter 5.5.1.1. genannten Hybridindividuen auf Basis der PCoA Analyse (exklusive 13 Referenzproben) als auch alle weiteren bis dato auftretenden Hybridindividuen aus den Daten entfernt. Folgende Individuen fanden für die Auswertung ohne Hybriden keine Berücksichtigung:

2327, 2396, 2398, 2446, 2450, 2451, 2452, 2457, 2459, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2483, 2561, 999023-12, 999024-05, 999025-07, 999026-12, 999026-14, 999026-16, 999026-20, 999029-14, 999029-17, 999029-23, 999029-24, 999029-29, 999031-01, 999031-38, 999032-05, 999032-11, 999032-12, 999033-30, 999034-12, 999034-13, 999034-22, 999035-08, 999035-09, 999035-10, 999035-11, 999035-12, 999035-13, 999035-14, 999035-15

Tabelle 16: Sammelorte und Individuenanzahl ohne Hybriden

Ort1	Ort2	Ort3	Ort4	Ort5	Ort6	Ort7	Ort8	Ort9	Ort10
32	30	81	47	39	63	29	43	5	7

Abbildung 26 zeigt die berechnete molekulare Varianz ohne Hybridindividuen:

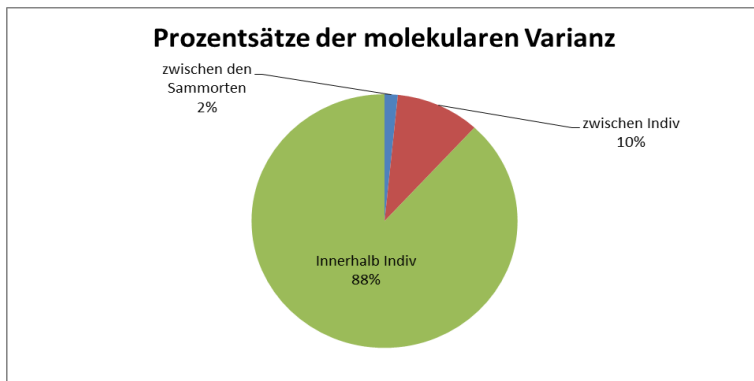


Abbildung 26: AMOVA Analyse ohne Hybriden

5.5.2.3. Conclusio der AMOVA Analysen

Der mit Abstand größte Teil der molekularen Varianz trat innerhalb der Individuen auf. Sowohl bei der Auswertung mit als auch ohne Hybridindividuen lag die molekulare Varianz zwischen den Sammelorten bei 2 %.

Die molekulare Varianz innerhalb der Individuen stieg bei der Auswertung ohne Hybridindividuen um 2 %, wogegen diese zwischen den Individuen von 12 % auf 10 % sank.

Nimmt man die ursprüngliche molekulare Varianz zwischen den Individuen von 12 % als 100 % Basis an, so stellt der Rückgang von 2 % innerhalb dieses Vergleichs 16,7 % der Ausgangsbasis dar. 63 von 439 Individuen wurden im Zuge der Auswertung „ohne Hybrid“ aus den Daten entfernt, dies entsprach 14,4 % der Individuen.

5.6. Structure 2.3.4

Die Ergebnisse der „Structure-Läufe“ wurden – wie unter den Punkten 4.5.6.3. und 4.5.6.4. beschrieben – mittels Structure Harvester und Clumpak ausgewertet. Es wurden für die Auswertung je 2 Varianten der Ergebnisse analysiert. Bei Variante 1 erfolgte die Auswertung mit, bei Variante 2 ohne Hybriden.

Folgende Individuen wurden für die Auswertung „ohne Hybriden“ nicht berücksichtigt:

2327, 2396, 2398, 2446, 2450, 2451, 2452, 2457, 2459, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2483, 2561, 999023-12, 999024-05, 999025-07, 999026-12, 999026-14, 999026-16, 999026-20, 999029-14, 999029-17, 999029-23, 999029-24, 999029-29, 999031-01, 999031-38, 999032-05, 999032-11, 999032-12, 999033-30, 999034-12, 999034-13, 999034-22, 999035-08, 999035-09, 999035-10, 999035-11, 999035-12, 999035-13, 999035-14, 999035-15

Die Feststellung dieser Individuen erfolgte über alle Programme in mehreren Wiederholungen der Auswertungen als iterativer Prozess. Alle bis dato als mögliche Hybridindividuen aufgetretenen Proben wurden im Zuge der Structure Analyse „ohne Hybriden“ nicht berücksichtigt.

5.6.1. Ergebnis Structure Harvester

Das in Abbildung 27 dargestellte Ergebnis zeigt das „Best K“ (die voraussichtliche Populationsanzahl) mit Hybriden. Laut Abbildung 27 ist die „am besten passendste“ Populationsanzahl 2.

In Abbildung 28 wird das „Best K“ ohne Hybriden dargestellt. Das Ergebnis „Best K = 3“ fällt weniger deutlich als das Ergebnis „Best K = 2“ in Abbildung 28 aus.

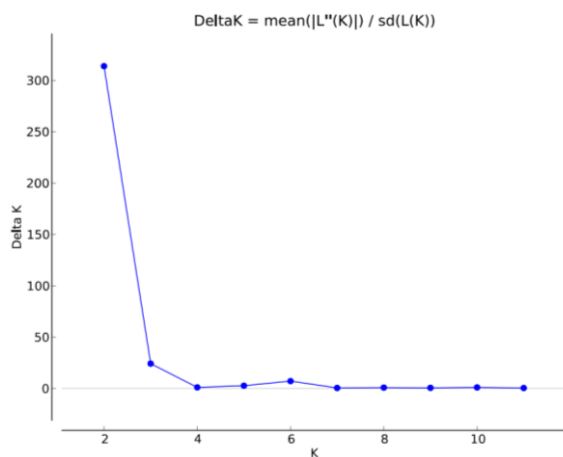


Abbildung 27: Structure Harvester, „Best K“ mit Hybriden

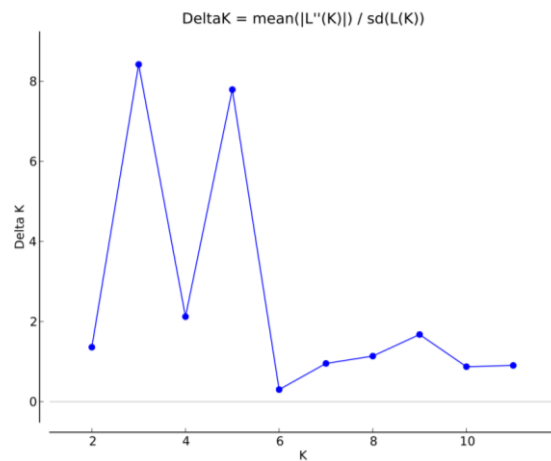


Abbildung 28: Structure Harvester, „Best K“ ohne Hybriden

5.6.2. Ergebnis Clumpak

Die Ergebnisse von Clumpak zeigen ein sehr ähnliches Bild wie die Ergebnisse von Structure Harvester. Auch hier zeigt die Abbildung 29 mit Hybriden ein „Best K“ von 2, die Abbildung 30 ohne Hybriden ein „Best K“ von 3, wobei der Unterschied in Abbildung 30 zwischen den möglichen Populationsanzahlen von K = 3 und K = 5 deutlicher erscheint als bei den Ergebnissen von Structure Harvester (vergleiche Abbildung 28).

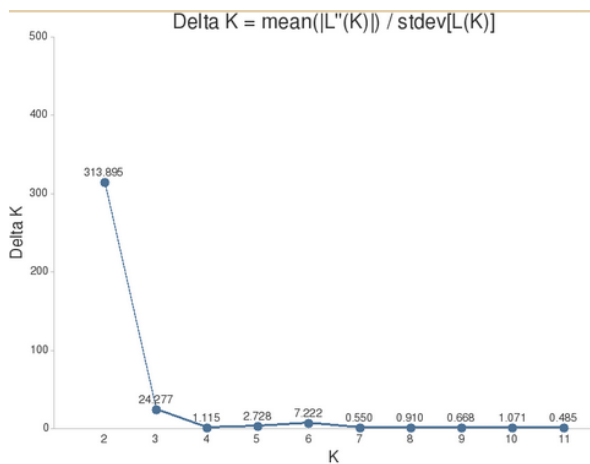


Abbildung 29: Clumpak, „Best K“ mit Hybriden

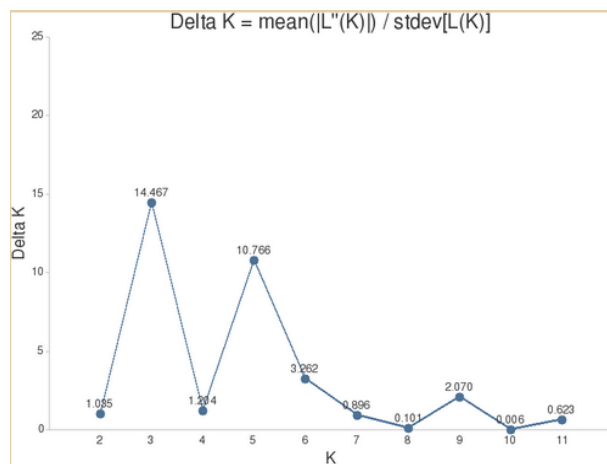


Abbildung 30: Clumpak, „Best K“ ohne Hybriden

5.6.3. Analyse der Populationsanzahl

Die eben erläuterten Auswertungen führten zu 3 Ergebnissen: Unter Einbezug der Hybriden wurde die Populationsanzahl mit 2 (Hybridpopulation und Nicht-Hybridpopulation) angegeben. Schloss man die Hybridindividuen von den Berechnungen aus, so war die am besten passendste Populationsanzahl 3, wobei eine Populationsanzahl von 5 in den Ergebnissen ebenfalls aufschien. Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse war somit unumgänglich.

Structure bietet die Möglichkeit, Einzelergebnisse für jeden Auswertungslauf (10 Iterationen für 12 Populationen, somit 120 Auswertungsläufe) als Balkendiagramm darzustellen, wobei sämtliche Einzelindividuen anhand ihrer genetischen Zusammensetzung unterschiedlich eingefärbt werden. Die einzelnen Individuen können durch den Befehl „Sort by Q“ aufgrund ihrer genetischen Zusammensetzung sortiert werden.

5.6.4. Ergebnis mit Hybriden K = 2

Abbildung 31 stellt Run 13 bei K = 2 mit Hybriden dar. In Summe gibt es 10 Einzelläufe (10 Iterationen) von K = 2 welche durch die Runs 11 bis 20 dargestellt werden. Die Ergebnisse der Runs 11 bis 20 unterschieden sich nur unwesentlich, daher wurde Run 13 exemplarisch ausgewählt. Die Hybriden sind in Grün dargestellt. Die Abgrenzung der Populationen (Hybrid / Nicht- Hybrid) ist erkennbar, allerdings gibt es auch einige Individuen, welche dem Übergangsbereich von reinen Schwarzpappeln (rot) zu Hybridpappeln (grün) zugeordnet werden.



Abbildung 31: Run 13, K = 2, Ergebnis Sort by Q, single line

Wählt man die Option alle Einzelindividuen nach Q sortiert anzeigen zu lassen, so erhält man folgendes Bild (Abbildung 32 stellt lediglich einen Ausschnitt des Gesamtergebnisses dar, in welchem die gemischterbigen Individuen dargestellt werden). Alle mit schwarzem Pfeil markierten Individuen von Nummer 220 bis inklusive 93 und 67 bis 277 scheinen als gemischterbige Individuen auf. Die Individuen 420 bis 434 stellen reine Hybridpappeln dar.

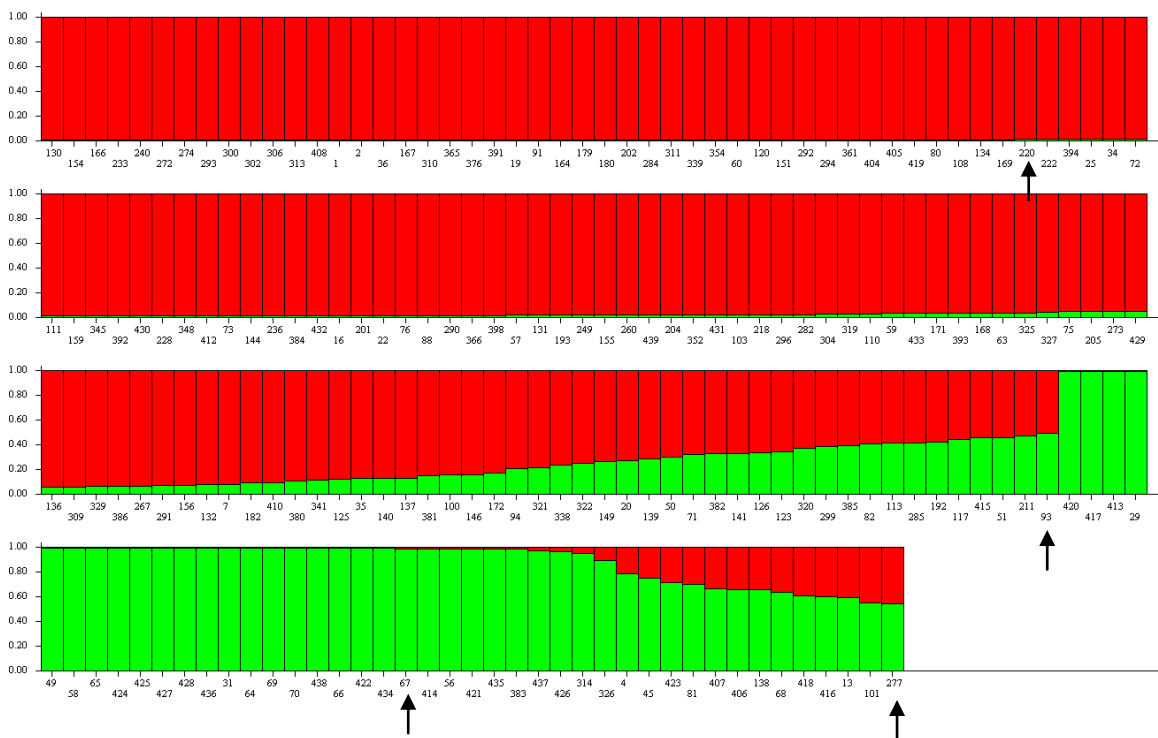


Abbildung 32: Gemischterbige Individuen Sort by Q, multiple lines

5.6.4.1. Individuen mit Hybridanteilen, reine Hybriden

Anhand dieser Auswertung konnten folgende 13 Individuen (exklusive der Referenzproben) als reine Hybriden ausgeschieden werden: 2396, 2398, 2450, 2459, 2465, 2466, 2467, 2468, 2470, 2471, 999035-08, 999035-12, 999035-15. Somit wurden 3,1 % (13 von 416 gesammelten Proben exklusive Referenzproben) als reine Hybriden erkannt.

Structure stellte exklusive aller Referenzproben 112 von 416 im Nationalpark gesammelte Proben als gemischterbige Individuen dar. Die Referenzprobe „Italica“, welche eine Mutation

der Schwarzpappel darstellt, wurde ebenfalls bei allen 5 Wiederholungen als gemischterbiges Individuum ausgewiesen. Exklusive der Referenzprobe „Italica“ waren 26,9 % (112 von 416 Proben) als gemischterbig zu identifizieren.

In Anhang I erfolgt eine vollständige Auflistung aller gemischterbigen Individuen und in weiterer Folge eine vollständige Übersicht der Structure ID's und dazugehörigen Probennummern.

5.6.5. Ergebnis ohne Hybriden K = 3

Abbildung 33 zeigt Run 24 ohne Hybriden bei K = 3 (somit die 4. Iteration für K = 3) sort by Q. Ein fließender Übergang zwischen den 3 von Structure Harvester und Clumpak bestimmten Populationen ist erkennbar; eine scharfe Trennung der Populationen ist nicht möglich.

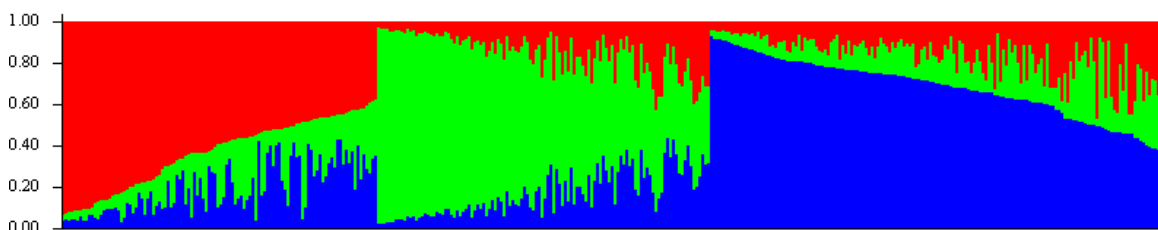


Abbildung 33: Populationsanalyse K = 3 ohne Hybrid, sort by Q, single line

5.6.6. Conclusio der Structure-Auswertungen

Die anhand dieser Auswertung festgestellten reinen Hybriden decken sich wiederum großteils mit den Ergebnissen der WIN3-Analyse und R. Betrachtet man die Populationsanalyse K = 3 (Abbildung 33) so erkennt man, dass eine eindeutige Trennung von Populationen nicht möglich ist.

5.7. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller Analysemethoden

In nachfolgender Tabelle 17 wird sowohl die Anzahl als auch der Prozentsatz aller Individuen mit Hybrideinfluss je nach Auswerteverfahren dargestellt. Die Ergebnisse beinhalten nicht die Hybridreferenzproben AT4_, AT6_ und „Robusta“. Über alle Auswertemethoden wurden in Summe 54 von 416 tatsächlich im Nationalpark Donau-Auen beprobten Individuen (auch die Referenzprobe „Italica“ wurde in dieser Aufstellung nicht berücksichtigt) als Hybridindividuen oder zumindest durch Hybridpappelgene beeinflusste Individuen ermittelt. Dies entspricht 13 % der beprobten Individuen. Von diesen 416 beprobten Individuen waren 317 Jungwuchspflanzen und 99 Altbäume. Die in der Tabelle 17 angegebenen % Werte beziehen sich immer auf die Grundgesamtheit von 416 Proben. Die in () angegebenen Prozentwerte beziehen sich bei den Altbäumen auf die Berechnungsbasis von 99

Altbäumen, bei den Jungwuchsproben auf die Basis von 317 betrachteten Jungwuchspflanzen.

Die Prozentwerte der WIN3 Altbaum-Analyse setzen sich beispielsweise wie folgt zusammen: Von 416 beprobten Individuen im Nationalpark Donau-Auen wurden im Zuge der WIN3-Analyse 3,4 % Altbäume mit Hybridanteil festgestellt. Diese 14 Altbaumproben mit Hybridanteil stellen 14,4 % aller beprobten Altbäume dar.

Tabelle 17: Anzahl und Prozentanteile der Hybridindividuen (Altbäume, Jungwuchs)

Analyse- methode	Altbäume mit Hybridanteil, Anzahl	Altbäume mit Hybridanteil %	Jungwuchs mit Hybridanteil, Anzahl	Jungwuchs mit Hybridanteil %	Summen	
					Anzahl /	%
WIN3	14	3,4 (14,4)	7	1,7 (2,2)	21	5,0
Rechnerische Abweichung	15	3,6 (15,2)	17	4,1 (5,4)	32	7,7
R	8	1,9 (8,1)	0	0 (0)	8	1,9
Cervus	12	2,9 (12,1)	20	4,8 (6,3)	32	7,7
GenAIEx PCoA	15	3,6 (15,2)	8	1,9 (2,5)	23	5,5
Structure (reine Hybriden)	10	2,4 (10,1)	3	0,7 (0,9)	23	5,5

Von den 51 in Summe als Hybridindividuen ausgewiesenen Proben entfallen 31 Proben auf den Jungwuchs, 20 Proben auf Altbäume.

In Anbetracht der in Summe 416 gewonnenen Proben weist der Jungwuchs mit 31 durch Hybridpappelgene beeinflussten Proben eine Introgression von 7,5 % auf. Betrachtet man nur die 317 untersuchten Jungwuchsproben, so zeigen 9,8 % aller untersuchten Jungwuchsproben einen Anteil an Hybridpappelgenen. Nachstehende Tabelle 18 bietet einen Überblick über alle aufscheinenden Individuen mit einer Beeinflussung durch Hybridpappelgene samt Auswerteverfahren, im Zuge dessen das betreffende Individuum aufschien. Alle Individuen, welche bei nur einem einzigen Auswerteverfahren als hybridbeeinflusst aufschienen wurden farbig markiert.

Tabelle 18: alle Hybridindividuen samt Auswerteverfahren

Festgestellte Hybriden total	WIN3	Rechnerische Abweichungen	R	Cervus	GenAlEx PCoA	Structure (reine Hybriden)
2327		2327				
2396		2396	2396	2396	2396	2396
2398	2398	2398	2398	2398	2398	2398
2446	2446	2446			2446	
2450	2450				2450	2450
2451	2451			2451		
2452	2452			2452	2452	
2457	2457	2457	2457	2457	2457	
2459	2459	2459	2459		2459	2459
2464					2464	
2465	2465	2465	2465	2465	2465	2465
2466	2466	2466			2466	2466
2467	2467	2467	2467		2467	2467
2468	2468	2468		2468	2468	2468
2469	2469	2469		2469	2469	

2470	2470	2470	2470	2470	2470	2470
2471	2471	2471	2471	2471	2471	2471
2483		2483		2483		
2561		2561		2561		
999023-12		999023-12				
999024-05				999024-05		
999025-07		999025-07		999025-07		
999026-12		999026-12				
999026-14				999026-14		
999026-16		999026-16				
999026-20		999026-20				
999029-14				999029-14		
999029-17				999029-17		
999029-23				999029-23		
999029-24				999029-24		
999029-29		999029-29				
999029-34				999029-34		
999031-01		999031-01				

999031-38				999031-38	999031-38	
999032-05	999032-05	999032-05		999032-05		
999032-11		999032-11		999032-11	999032-11	
999032-12				999032-12		
999032-15				999032-15		
999033-30		999033-30				
999034-12				999034-12	999034-12	
999034-13					999034-13	
999034-22		999034-22				
999035-08		999035-08		999035-08	999035-08	999035-08
999035-09	999035-09	999035-09		999035-09	999035-09	
999035-10	999035-10			999035-10		
999035-11	999035-11			999035-11		
999035-12	999035-12	999035-12		999035-12	999035-12	999035-12
999035-13	999035-13	999035-13		999035-13		
999035-14		999035-14				
999035-15	999035-15	999035-15			999035-15	999035-15

6. Diskussion

6.1. Analysemethoden und Vergleich der Ergebnisse

6.1.1. WIN3

Bei allen in Abbildung 18 ersichtlichen Proben handelt es sich – nach „grober“ Schätzung durch die WIN3-Analyse – um reine *Populus nigra*.

Das Auftreten von *Populus deltoides* im Jungwuchs (Abbildung 19) ist insofern beachtenswert, als es sich dabei bereits um eine Rückkreuzung eines ehemaligen Hybrid-Jungwuchses mit einer reinen *Populus deltoides* als Mutter handeln könnte.

6.1.2. R, RStudio und PoppR

Eine Clusterzuordnung in R gibt *per se* noch keine Auskunft über einen möglichen Hybrideinfluss. Ein Hybrideinfluss kann – wie beispielsweise bei der Probe 2471 in Cluster 42 – abgeleitet werden, da diese Probe dem gleichen Cluster wie die Referenzprobe „Robusta“ zugeordnet wurde.

Das Vorkommen von Individuen im gleichen Cluster lässt darauf schließen, dass diese entweder Klone sind oder in einem nahen Verwandtschaftsverhältnis zueinander stehen.

Das Auftreten von Proben (zB 002396 und 002459) im gleichen Cluster mit den AT-Referenzproben legte die Vermutung nahe, dass die eben genannten Proben AT-Klone sind.

Bei jenen Proben, die in den Clustern 16, 17, 20 und 23 auftreten, handelt es sich aller Voraussicht nach um (Halb)Geschwister.

Die Ergebnisse der WIN3-Analyse konnten durch die Auswertung in R insofern ergänzt werden, als dass Proben, welche im Zuge der WIN3-Analyse von Schwarzpappeln abweichende Banden aufwiesen (beispielsweise die Proben 2465, 2467, 2470), von R in den gleichen Cluster kategorisiert wurden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Proben, welche bei der WIN3-Analyse abweichende Banden aufwiesen und bei denen eine Zuordnung in einen gemeinsamen Cluster erfolgte a) Hybridpappeln sind und b) vermutlich vom selben Klon abstammen.

Auch bei Proben, welche im Zuge der WIN3-Analyse als reine Schwarzpappeln erkannt wurden, konnten erste Vermutungen von Verwandtschaftsverhältnissen angestellt werden (Cluster 16, 17, 20).

Das gemeinsame Auftreten von Altbäumen im gleichen Cluster mit Jungwüchsen (zB Cluster 290) deutet darauf hin, dass es sich in diesen Fällen um „Eltern-Nachkommen“ Beziehungen handelt.

6.1.3. Cervus

Der Umstand, dass einer Jungwuchsprobe mehrere beprobte Elternteile zugeordnet wurden (Punkt 5.4.1), lässt sich wie folgt erklären:

6.1.3.1. Vergleich der Ergebnisse R und Cervus

Vergleicht man die Ergebnisse von Cervus (Tabelle 12) mit den in Punkt 5.3. dargestellten Ergebnisse von R so erkennt man, dass die Proben 2398, 2465 und 2470 alle im Cluster mit der Nummer 354 zu finden sind, und somit 6 oder weniger unterschiedliche Genorte aufwiesen. Berücksichtigt man zusätzlich die matching loci der Tabelle 12, so ist ersichtlich, dass bei besagten Proben entweder 9 oder 10 von 15 analysierten loci übereinstimmen, also maximal 6 Genorte unterschiedlich sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Cutoff-Distance von 6 in R.

Betrachtet man die von R gebildeten Cluster 16 und 17, so konnte durch Cervus bestätigt werden, dass die Proben Nr. 999024-01 und 999024-11 offenbar (Halb)Geschwister sind und beide von der Probe 2492 abstammen (siehe Anhang H die Auflistung aller JW Proben samt Elternteil). Von 15 analysierten Genorten stimmten bei beiden Jungwüchsen 14 Genorte überein. Bemerkenswert ist, dass der Jungwuchs 999024 am Probenort 1, das vermutliche Elternteil jedoch am Probenort 8 aufgenommen wurde und somit (mehr oder weniger) der komplette Nationalpark Donau-Auen zwischen Elternteil und Nachkommen liegt. Pappelsamen sind in erster Linie prädestiniert für die Verbreitung durch Wind (Anemochorie). Trotz allem findet sich ein Großteil der Nachkommen am selben Probenort wie eines der Elternteile.

Die Elternschaft der in Cluster 17 angeführten Jungwüchse 999024-02 und 999024-13 durch die Probennummer 2435 wurde durch Cervus ebenfalls bestätigt. Von 15 analysierten Genorten stimmten bei der Probe 999024-02 alle, und bei der Probe 999024-13 14 von 15 untersuchten Genorte überein.

Die im letzten Absatz von 6.1.2. angestellte Vermutung, es könnte sich bei den Proben des Clusters 290 (siehe S 53) um „Eltern-Kind“ Beziehungen handeln, wurde durch die Cervus Analyse bestätigt. Die Proben 999034-25, 999034-27 und 999034-28 wiesen alle die maximal mögliche Übereinstimmung (15 typed und 15 matching loci) mit der Probe 2490 auf.

Bei den in Tabelle 12 angeführten Proben 2465 und 2470 handelt es sich vermutlich um denselben Klon (die Bäume stehen am gleichen Probenort 5), womit eine genetische Identität zwischen den Proben 2465 und 2470 zu erwarten ist. Bei der Probe 2398 (Probenort 3) besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass es sich um denselben Klon wie bei 2465 und 2470 handelt und somit tatsächlich nur 1 Hybridelternteil bei den Abkömmlingen der Altbäume 2398, 2465 und 2470 (Cluster 354 in R) beteiligt ist.

Bei den weiteren in Tabelle 12 ersichtlichen Proben 2486 und 2487 handelt es sich offenbar ebenfalls um genetisch idente Individuen, wobei jedoch zu bemerken ist, dass die Bäume 2486 und 2487 und der Jungwuchs 999034 an Probenort 8 (Turnhaufen) beheimatet sind, der Jungwuchs 999027 hingegen am Probenort 3 (Schönauer Traverse).

Die in einer Entfernung von 18,3 m wurzelnden Individuen 2491 und 2493 scheinen ebenfalls genetisch ident oder zumindest nahe verwandt zu sein (siehe Cluster 403).

Die von Cervus festgestellte genetische Identität (Tabelle 13) bedeutet, dass beide Allele je untersuchten Genort dieselben Werte aufweisen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der Probennahme nicht erkannt wurde, dass es sich bei den adulten Individuen entweder um denselben Klon oder um Wurzelbrut handelt.

Lediglich die Proben 2398 / 2470 wurden auch von R dem gemeinsamen Cluster 354 zugeordnet.

Dies ist sehr verwunderlich, da Cervus die Proben 2486 / 2487 und 2503 / 999035-04, welche durch R nicht in einen gemeinsamen Cluster kategorisiert wurden, als genetisch ident erkannte. Es erfolgte daher eine manuelle Überprüfung der erfassten Genorte für die von Cervus als genetisch ident erkannten Individuen mit dem Ergebnis, dass sowohl die Proben 2486 und 2487 als auch die Proben 2503 und 999035-04 tatsächlich mit identen Werten an allen Genorten erfasst wurden. Eine neuerliche Auswertung durch R mit den Cutoff-Distanzen von 1 und 0 zeigte bezüglich der fraglichen Proben wiederum keine Zuordnung in einen gemeinsamen Cluster. Durch diesen Vergleich der Ergebnisse von R und Cervus konnte eine fehlerhafte Auswertung in R entdeckt werden, die trotz mehrmaliger Wiederholung und Adaptierung des Analysevorganges nicht behoben werden konnte. Ein Programmfehler in R wird als Ursache angenommen.

Die Entfernung der Probe 2503 zur „identen“ Probe 999035-04 beträgt 17,7 m. Eine Wurzelbrut kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Zwischen den Proben 2398 und 2470 liegen 4,8 km Luftlinie. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um ein und denselben Klon einer Hybridpappel handelt.

Die Feststellung der genetischen Identität einiger Proben sicherte die bis dato angestellte Vermutung, es handle sich um denselben Klon oder um Wurzelbrut, ab.

6.1.4. GenAIEx

6.1.4.1. PCoA

Die bei der PCoA ersichtliche 3er Gruppierung (Abbildungen 23 und 24) kann dadurch erklärt werden, dass ursprünglich vermutlich 3 Ausgangspopulationen vorhanden waren, welche mittlerweile jedoch genetisch nahezu vollständig miteinander vermischt sind.

Eine detaillierte Auswertung der angedeuteten Gruppen zeigte kein spezielles Muster innerhalb der Gruppen. Lediglich die Jungwüchse 999032 und 999035 sind „nur“ in 2 von 3 möglichen Gruppen vertreten. Alle anderen untersuchten Jungwüchse und Altbäume haben Vertreter in jeder der 3 Gruppen. Die Altbäume sind zu knapp 72 % im rechten Cluster gruppiert. Eine Zuordnung der Jungwüchse zu einem der 3 möglichen Cluster aufgrund eines Jahrganges war ebenfalls nicht möglich.

6.1.4.2. AMOVA

Die molekulare Varianz von 2 % zwischen den Sammelorten bestätigt die nach der PCoA Analyse getätigte Vermutung, dass es sich – über alle Sammelorte betrachtet – um eine einzige Population von Schwarzpappeln handelt, die über die gesamte Erstreckung des Nationalparks Donau-Auen in genetischem Austausch steht.

Diese festgestellte genetische Differenz der Schwarzpappeln zwischen den Sammelorten ist ähnlich der von JELIC et al., 2015 festgestellten genetischen Varianz von 2,95 % zwischen Schwarzpappelpopulationen entlang der Donau.

Der Rückgang der molekularen Varianz zwischen den Individuen von 12 % (mit Hybriden) auf 10 % (ohne Hybriden) kann durch die Art der Auswertung erklärt werden.

6.1.5. Structure

Die Abweichung der Abbildung 28 („Best K“ = 3) zu der Abbildung 27 („Best K“ = 2) lässt sich wie folgt erklären:

Da in Abbildung 27 die Hybriden inkludiert sind, unterscheidet Structure Harvester zwei Hauptgruppen (in diesem Fall das „Best K“ = 2): Hybriden und Nicht-Hybriden.

In Abbildung 28 sind die Hybridindividuen nicht inkludiert, eine absolut eindeutige Bestimmung des „Best K“ wie in Abbildung 27 ist nicht möglich.

Structure Harvester versuchte innerhalb der Schwarzpappeln ohne Hybriden Populationen zu bestimmen und berechnete die Populationsanzahl K mit 3 (der höchste Peak in Abbildung 28). Der zweithöchste Peak erscheint bei K = 5, eine genauere Betrachtung und weitere Analysen waren notwendig, um das Ergebnis K = 3 zu festigen oder zu verwerfen.

Eine Vermischung von Schwarz- und Hybridpappeln über viele Generationen kann anhand von Abbildung 31 ausgeschlossen werden, die vorkommenden Schwarzpappeln sind größtenteils genetisch reinerbig.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GenAlEx Auswertung (siehe die Punkte 5.5.1. und 5.5.2.) ließ auch die Structure-Analyse den Schluss zu, dass ursprünglich vermutlich 3 Populationen vorzufinden waren, mittlerweile jedoch nahezu eine vollständige Vermischung der 3 Ausgangspopulationen stattgefunden hat.

6.2. Forschungsfragen

Alle unter Punkt 1.4. gestellten Forschungsfragen konnten anhand dieser Diplomarbeit beantwortet werden.

1. Welche Anzahl an Schwarzpappelpopulationen lässt sich im Nationalpark Donau-Auen feststellen?

Es ist *de facto* (heutzutage) von einer einzigen Schwarzpappelpopulation im gesamten Untersuchungsgebiet auszugehen, welche – allem Anschein nach – jedoch auf ursprünglich 3 Schwarzpappelpopulationen beruht. Ein genetischer Austausch über die Gesamterstreckung des Nationalparks Donau-Auen wurde festgestellt.

2. Findet eine Introgression von Hybridpappelgenen in die Schwarzpappelpopulation des Nationalparks Donau-Auen bereits statt? Wenn ja, in welchem Ausmaß?

Eine Introgression von Hybridpappelgenen in die Schwarzpappelpopulation des Nationalparks Donau-Auen findet bereits statt. Die vorliegende Untersuchung konnte auf Basis von 317 untersuchten Jungwuchspflanzen bei 9,8 % der Nachkommen eine Beeinflussung durch Hybridpappelgene nachweisen. Berücksichtigt man alle 439 untersuchten Proben, so stellt die Introgression in den Jungwuchs (31 der untersuchten Proben) 7,5 % dar.

3. Kann die Elternschaft speziell von adulten Hybriden anhand der Sämlinge / Jungpflanzen nachgewiesen werden („Vaterschaftsanalyse“)?

Von 22 beprobten Hybridindividuen wurden 15 Hybridindividuen als Elternteile bestimmt. 20 von 317 Jungwuchsproben (6,3 %) konnten einem Hybridelternteil als Nachkomme zugeordnet werden.

4. Können Verbreitungsmuster (Verbreitungsdistanzen) festgestellt werden?

27,9 % der Jungwüchse wiesen denselben Sammelort auf wie das zugeordnete Elternteil. 58,2 % der Jungwuchspflanzen befanden sich in einer maximalen Entfernung von 2 Probenorten zum jeweiligen Elternteil.

Lediglich 4 beprobte Nachkommen (999023-01, 999023-02, 999024-01, 999024-11) wiesen eine Differenz von 7 Probenorten (unabhängig der Richtung) auf. Als Elternteile der eben genannten Jungwuchsproben traten nur 2 adulte Schwarzpappel-Individuen (2490 und 2492, beide lokalisiert am Probenort 8, Turnhaufen) auf. Eine Überprüfung der Auswertungen in R und Cervus zeigte bei keiner der genannten Proben eine genetische Identität oder eine Gruppierung im gleichen Cluster.

5. Wie wirkt sich die Kombination verschiedener Analysemethoden auf das Ergebnis im Vergleich zur einzelnen Betrachtung je Analysemethode aus?

Eine fundierte Feststellung der tatsächlichen Introgressionsrate ist nur durch die Verwendung eines Auswerteverfahrens kaum möglich. Wie unter Punkt 4.5.1. beschrieben eignen sich nicht alle Genorte für die Analyse einer möglichen Introgression. Aus diesem Grund wurden die Genorte ORPM86 und Yin2 für die weitere Auswertung in dieser Masterarbeit nicht verwendet. Je nach Analysemethode lassen sich unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf Individuen mit Hybrideinfluss feststellen (siehe dazu Tabelle 18). Eine Kombination von mehreren Verfahren stellt eine sinnvolle Vorgehensweise dar, um die Ergebnisse so gut als möglich abzusichern. Bei der Auswertung der Altbäume gab es über alle Methoden nur wenige Abweichungen. Lediglich 2 Altbäume wurden nur ein einziges Mal als hybridbeeinflusst ausgewiesen (2327 und 2464, siehe Tabelle 18). Bei den Jungwüchsen wurden 19 von 31 Proben nur im Zuge eines Auswerteverfahrens als hybridbeeinflusst ausgewiesen. Diese „Unschärfe“ lässt sich teilweise dadurch erklären, dass im Jungwuchs nur ein Teil der Hybridpappelgene aufscheint, die ausgewiesenen vorkommenden Altbäume zu einem Großteil jedoch reine Hybriden sind.

6.3. Introgression und Folgerungen

Das im Zuge dieser Masterarbeit festgestellte Ausmaß der Introgression deckt sich mit den Ergebnissen / Vermutungen aus früheren Studien (vgl. HEINZE, 2008). Eine Untersuchung von BENETKA et al., 1999 bestimmte eine Introgressionsrate bei *Populus nigra* von in etwa 9 % bei spontaner Bestäubung in freier Natur.

BIALOZYT et al. (2012) konnte Rückkreuzungen von Hybriden in Schwarzpappelpopulationen nachweisen. Diese Rückkreuzungen wurden sowohl in den Samen (0 – 6%), als auch im Jungwuchs gefunden. Die Bildung von Hybridschwärmen stellt durchaus ein reelles Risiko für die bestehenden Schwarzpappelpopulationen dar.

KNOLL, 2015 untersuchte im Zuge einer Masterarbeit die Bestandesentwicklung von Hybridpappelforsten im Nationalpark Donau-Auen. Gemäß dieser Untersuchung weisen Hybridpappelbestände mit zunehmendem Alter mehr heimische Arten auf und brechen laut OITZINGER & KOVACS (2010) zitiert nach KNOLL (2015) auch schneller als erwartet

zusammen. Ein aktives Entfernen (Keimzellenverfahren) bzw. Ringeln von Hybridpappeln wird – unter Abwartung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung – vorerst nicht als vordringlich empfohlen (KNOLL, 2015).

Die Introgressionsrate von in etwa 7 – 10 % scheint sich im Laufe der Jahre stabilisiert zu haben. Um die Schwarzpappelpopulationen weiterhin in einem notwendigen Ausmaß erhalten zu können scheint eine Renaturierung und Erhaltung von Lebensräumen und ein Zulassen der Auidynamik unumgänglich.

Literaturverzeichnis

AAS, G. (2006): Die Schwarzpappel (*Populus nigra*) – zur Biologie einer bedrohten Baumart. In: Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (Hrsg.): LWF Wissen, Nr. 52, Beiträge zur Schwarzpappel, Freising 2006, S 7-12. ISBN-0945-8131

BECKMAN COULTER (2004): CEQ™ 8000 Genetic Analysis System User's Guide. A16637-AA April 2004.

BENETKA, V.; MOTTL J.; VACKOVA, K.; POSPIKOVA, M.; DUBSKY, M. (1999): Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers. In: *Silvae Genet.*, 48: 218-223

BENVENUTTI, F.; BERAN, A.; WEILINGER, H.; WEISCH, W. (o. J): Der Mensch in Raum und Wirtschaft 3, S 18–19. Wien: E. Dornier GmbH. ISBN: 978-3-7034-2150-1

BERGER, R.; EHRENDORFER, F. (2011): Ökosystem Wien: die Naturgeschichte einer Stadt. Band 2 von Wiener Umweltstudien. Wien: Böhlau Verlag. ISBN: 3205774205, 9783205774204

BFW (2009): Digitale Bodenkarte von Österreich.
http://gis.lebensministerium.at/eBOD/frames/index.php?&gui_id=eBOD 14.03.2017

BFW (o. J): Einführung in die bodenkundlichen Grundlagen.
<https://bfw.ac.at/rz/bfwcms2.web?dok=7131> 14.03.2017

BIALOZYT, R.; RATHMACHER, G.; NIGGEMANN, M.; ZIEGENHAGEN, B. (2012): Wie groß ist das Potential von *Populus nigra* mit *Populus x canadensis* Hybridschwärme zu bilden? – Wo sich Mendel und molekulare Marker begegnen. In: Beiträge aus der NW-FVA, Band 8, 295-313

BRADSHAW, H. D. Jr; VILLAR, M.; WATSON, B. D.; OTTO, K. G.; STEWART, S.; STETTLER, R. F. (1994): Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. In: *Theor. Appl. Genet* (1994) 89: S 167-178. Springer-Verlag

Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald, Naturgefahren und Landschaft, kurz BFW

sowie Bundesamt für Wald. Österreichische Waldinventur (Erhebung 2007 – 2009 und Erhebung 2000 - 2002) www.waldinventur.at 08.03.2017; 13.03.2017

Bundeskanzleramt (2017): Vereinbarung gemäß Artikel 15a B-VG zwischen dem Bund und den Ländern Niederösterreich und Wien zur Errichtung und Erhaltung eines Nationalparks Donau-Auen. StF: LGBl. 5506-0

<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10001470> 09.03.2017

CHAKRABORTY, R.; SHAW, M.; SCHULL, W. J (1974): Exclusion of Paternity: The Current State of the Art. In: Am J Hum Genet 26: 477-488, 1974

CORRANDER, J.; WALDMANN, P.; SILLANPÄÄ, M. J. (2003): Bayesian Analysis of Genetic Differentiations Between Populations. In: Genetics Society of America (ed.), Genetics 163: 367–374 (January 2003)

COX, D. R. and SOLOMON, P. J. (2003): Components of Variance. Chapman & Hall/CRC. ISBN: 1-58488-354-5

CREMER, E. und KONNERT, M. (2010): Genetische Untersuchungen an Schwarzpappeln aus Bayern. In: Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (Hrsg.) LWF Wissen 64. Die Bayerischen Schwarzpappelvorkommen. Berichte der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft

DAYANANDAN, S.; RAJORA, O. P.; BAWA, K. S. (1998): Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). In: Springer Verlag (Hrsg.): Theor Appl Genet (1998) 96: S 950-956

DocCheckFlexikon (2017): Marker(Genetik).
[http://flexikon.doccheck.com/de/Marker_\(Genetik\)](http://flexikon.doccheck.com/de/Marker_(Genetik)) 17.03.2017

Donaukommission (2017): www.danubecommission.org 13.03.2017

DORN, E., MANZANO, C., SCHINDLER M. (2010): Nationalpark Donauauen. In: Popp-Hackner, V., Popp, G. 2010 (Hrsg.): Die österreichischen Nationalparks S 124-155. Graz: Leykam Buchverlagsgesellschaft m.b.H. Nfg. & Co. KG, ISBN: 978-3-7011-7626-7

EARL, D. A and VONHOLDT, B. M. (2012): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

ECKMÜLLNER, O.; FLECK, W.; FRAISSL, C.; HOLZNER, W.; LUTTERSCHMIED, H.; POSCH, B.; REIMOSER, F.; SCHNETZ, M. (2008): Aufnahmeschlüssel Naturrauminventur

Winter 2008/2009 im Nationalpark Donau-Auen basierend auf dem Schlüssel 2003/2004 sowie dem Schlüssel Stichprobeninventur 1998/99 in Naturraum „Wald“. Endversion 4. Oktober 2008

ELLMAUER, T. (2005): Entwicklung von Kriterien, Indikatoren und Schwellenwerten zur Beurteilung des Erhaltungszustandes der Natura 2000-Schutzgüter. Band 3: Lebensraumtypen des Anhang I der Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie. Im Auftrag der neun österreichischen Bundesländer, des Bundesministerium f. Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft und der Umweltbundesamt GmbH, 616 ff

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. (1992): In: Genetics Society of America (ed.): Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data., Genetics 131: 479-491 (June 1992)

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. (2003): Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. In: Genetics 164: 1567-1587

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. (2007): Inference of populations structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. In: Molecular Ecology Notes (2007).

FIELD GENETICS Ltd. (2017): Cervus: Overview.
<http://www.fieldgenetics.com/pages/home.jsp> 02.04.2017

FLADUNG, M. (2005): Amerikanische Balsampappel – Erbgut vollständig entschlüsselt. AFZ/Der Wald 5/2005, S 248-252

FUSSI, B. (2010): Phylogeography, Flowering Phenology and Cytonuclear Interactions of *Populus alba* and *P. tremula*: Two European Hybridising Forest Trees. Dissertation an der Universität Wien

GRAF, M. (2006): Analytik von Proteinen in der Kapillarelektrophorese. Untersuchung des Adsorptionsverhaltens unter Berücksichtigung statistischer Aspekte und Entwicklung anti-adhesiver Strategien. Dissertation an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

GOWER, J. C. (1966): Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. In: Biometrika (1966), 53, 3 and 4, 325 ff

HEINZE, B. (1997a): Die Schwarzpappel – *Populus nigra* L. auf dem Rückzug aus Niederösterreich. In: WWF (Hrsg.): Bericht zur Fachtagung am 1. Oktober 1997 an der FBVA Mariabrunn: Zukunft für gefährdete Baumarten? Rückbringung und Förderung seltener und gefährdeter Baum- und Straucharten. S 45–50

HEINZE, B. (1997b): A PCR MARKER FOR A *POPULUS DELTOIDES* ALLELE AND ITS USE IN STUDYING INTROGRESSION WITH NATIVE EUROPEAN *POPULUS NIGRA*. In: Royal Botanical Society of Belgium (Hrsg.). Belgian Journal of Botany, Vol. 129, Fasc. 2, Use of Molecular Markers in Plant Population Biology (1997), pp. 123-130

HEINZE, B (1998a): Erhaltung der Schwarzpappel in Österreich – forstwirtschaftliche, genetische und ökologische Aspekte. FBVA-Berichte; Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien, 1998, Nr. 106, S 33 ff. ISSN: 1013-0713

HEINZE, B. (1998b): Molekulargenetische Unterscheidung und Identifizierung von Schwarzpappeln und Hybridpappelklonen. FBVA-Berichte; Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien, Nr. 105. S 44 ff. ISSN: 1013-0713

HEINZE, B. (1998c): Die Schwarzpappel in Oberösterreich – von der „Königin des Auwaldes“ zur gefährdeten Baumart. In: ÖKO-L 20/4, S 16-23

HEINZE, B. (2008): Genetic traces of cultivated hybrid poplars in the offspring of native *Populus nigra* in Austria. In: Preslia 80: 365-374

HOFMANN, T.; HALVICEK, P.; HARZHAUSER, M. (2011): Das Wiener Becken – geologische Betrachtungen, Wiss. Mitt. Niederösterreich. Landesmuseum 22, S 13–24. St. Pölten

HOLMES, C. (o. J): Markov Chain Monte Carlo and Applied Bayesian Statistics: a short course. In: University of Oxford, Department of Statistics, Oxford Centre for Gene Function. http://www.stats.ox.ac.uk/~cholmes/Courses/BDA/bda_mcmc.pdf 27.03.2017

HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. (2009): Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. In: Molecular Ecology Resources (2009) 9, 1322-1332

IMBERT, E. und LEFEVRE, F. (2003): Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. In: British Ecological Society (ed.): Journal of Ecology 2003, 91, S 447-456

JELIC, M.; PATENKOVIC, A.; SKORIC, M.; MISIC, D.; NOVICIC, Z. K.; BORDACS, S.; VARHIDI, F.; VASIC, I.; BENKE, A.; FRANK, G.; SILER, B. (2015): Indigenous forests of European black poplar along the Danube River: genetic structure and reliable detection of introgression. In: *Tree Genetics & Genomes*, 11:89

JUNGWIRTH, M.; HAIDVOGL, G.; HOHENSINNER, S.; WAIDBACHER, H.; ZAUNER, G. (2014): *Österreichs Donau. Landschaft – Fisch – Geschichte*. Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement. Universität für Bodenkultur Wien. Wolkersdorf: Holzhausen Druck GmbH. ISBN: 978-3-900932-20-6

KAMVAR, Z. N.; BROOKS, J. C.; GRÜNWALD, N. J. (2015): Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. In: *Front. Genet.* 6:208. doi: 10.3389/fgene.2015.00208

KHASA, D.; POLLEFEYS, P.; NAVARRO-QUEZADA, A.; PERINET, P.; BOUSQUET, J. (2005): Species-specific microsatellite markers to monitor gene flow between exotic poplars and their natural relatives in eastern North America. In: *Molecular Ecology Notes* (2005) 5, S 923-923

KNOLL, T. (2015): Bestandesentwicklung von Hybridpappelforsten im Nationalpark Donau-Auen. Wissenschaftliche Reihe Nationalpark Donau-Auen, Heft 39/2015

KOPELMAN, N. M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A.; MAYROSE, I. (2015): CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K". In: *Molecular Ecology Resources* 15(5): 1179-1191, doi: 10.1111/1755-0998.12387

LIESBACH, M.; SCHNECK, V.; WOLF, H. (2011): Züchtung von Aspen für den Kurzumtrieb. In: *Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (Hrsg.): Züchtung und Ertragsleistung schnellwachsender Baumarten im Kurzumtrieb. Erkenntnisse aus drei Jahren FastWOOD, ProLoc und Weidenzüchtung. Fachtagung vom 21. bis 22.09.2011 in Hann. Münden. Beiträge aus der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 8.* Universitätsverlag Göttingen

MADRITCH, D. M.; GREENE, S. L.; LINDROTH, R. L. (2009): Genetic mosaics of ecosystem functioning across aspen-dominated landscapes. In: *Springer Verlag 2009 (Hrsg.): Oecologia* (2009) 160: S 119-127

Magistratsabteilung 23 der Stadt Wien Wirtschaft, Arbeit und Statistik (2017): Wetter – Statistiken. <https://www.wien.gv.at/statistik/lebensraum/wetter/> 14.03.2017

MARGL, H. (1973): Pflanzengesellschaften und ihre standortgebundene Verbreitung in teilweise abgedämmten Donauauen (Untere Lobau). Forstliche Bundesversuchsanstalt

MEIRMANS, G. P. (2012): AMOVA-Based Clustering of Population Genetic Data. In: The American Genetic Association (ed): Journal of Heredity 2012: 103(5): 744-750

MEIRMANS, P. G. (2006): Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. In: Evolution, 60(11), 2006: 2399-2402

Nationalpark Donau-Auen GmbH (2017): Zahlen, Daten, Fakten:

<http://www.donauauen.at/?area=nationalpark&subarea=numbers>. 09.03.2017

Nationalpark Donau-Auen GmbH (2017): Natur/Wissenschaft: Die Donau

<http://www.donauauen.at/?area=nature&subarea=danube>. 13.03.2017

Nationalpark Donau-Auen GmbH (2009): Managementplan Nationalpark Donau-Auen 2009 – 2018. Horn: Ferdinand Berger & Söhne GmbH

Naturschutzbund Deutschland (NABU) e.V. (2008): Energieholzproduktion in der Landwirtschaft. Chancen und Risiken aus Sicht des Natur- und Umweltschutzes. 1. Auflage. Meckenheim: Warlich Druck Meckenheim GmbH

NEI, M. and ROYCHOUDHURY A. K. (1974): Sampling Variances of Heterozygosity and Genetic Distance. Genetics 76, February 1974: 379-390

NEI, M. (o. J.): Genetic Distance and Molecular Phylogeny.

http://nsgl.gso.uri.edu/washu/washub87001/washub87001_part6.pdf 13.04.2017

NIKLFIELD, H. und SCHRATT-EHRENDORFER, L. (1999): Rote Listen gefährdeter Pflanzen Österreichs. Grüne Reihe des Bundesministeriums für Umwelt, Jugend und Familie, Wien.

http://www.umweltbundesamt.at/umweltsituation/naturschutz/artenschutz/rl_pflanzen/ 08.03.2017

Österreichische Bundesforste AG (2009): Aufnahmetabelle Schwarzpappel Donau-Auen 2008_2009

Participants of the FFI/IUCN SSC Central Asian regional tree Red Listing workshop, Bishkek, Kyrgyzstan (11-13 July 2006). 2007. Populus nigra. The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e.T63530A12687370.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2007.RLTS.T63530A12687370.en>. Downloaded on 08 March 2017. <http://www.iucnredlist.org/details/63530/0>

PEAKALL, R. and SMOUSE P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

PEAKALL, R. and SMOUSE P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.

POLITOV, D. V.; BELOKON, M. M.; BELOKON, Y. S.; POLYAKOVA, T. A.; SHATOKHINA A. V.; MUDRIK E. A.; AZAROVA, A. B.; FILIPPOV, M. V.; SHESTIBRATOV, K. A. (2015): Application of Microsatellite Loci for Molecular Identification of Elite Genotypes, Analysis of Clonality, and Genetic Diversity in Aspen *Populus tremula* L. (Salicacea). In: Hindawi Publishing Corporation (ed.). *International Journal of Plant Genomics* Volume 2015, Article ID 261518, 11 pages

PORRAS-HURTADO, L.; RUIZ, Y.; SANTOS, C.; PHILLIPS, C.; CARRACEDO, A.; LAREU, M. V. (2013): An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. In: *Frontiers in Genetics*, May 2013, Volume 4, Article 98.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. (2000): Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. In: *Genetics Society of America* (ed.), *Genetics* 155: 945-959 (June 2000)

PURVES, W. K.; SADAIVA, D.; ORIANI, G. H.; HELLER, H. C (2006): *Biologie*. 7. Auflage 2006. Originaltitel: *Life – The Science of Biology*, 7/e. Deutsche Übersetzung. Jürgen Markl (Hrsg). München: Elsevier GmbH

Rat der Europäischen Gemeinschaften (1979): Richtlinie des Rates vom 2. April 1979 über die Erhaltung der wildlebenden Vogelarten (79/409/EWG) (ABl. L 103 vom 25.4.1979, S. 1). 1979L0409 – DE – 01.01.2007 – 006.001- 1

Rat der Europäischen Gemeinschaft (1992): Richtlinie 92/43/EWG des Rates vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen (ABl. L 206 vom 22.7.1992, S. 7). 1992L0043 – DE – 01.01.2007 – 005.001 – 1

RAHMAN, M.H.; DAYANANDAN, S.; RAJORA, O. P. (2000): Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. In: *Genome* 43 (2000), S 293-297

RATHMACHER, G.; NIGEMANN, M.; ZIEGENHAGEN, B.; BIALOZYT, R. (2008): Genfluss bei der Pappel- Risiko und Chance für die Arterhaltung von *Populus nigra* L. In: Bundesamt für Naturschutz, Bonn (Hrsg.). *Treffpunkt Biologische Vielfalt* 8, 2008, S 89-95

ROBINSON, T. R. (2010): Genetik für Dummies. Übersetzung aus dem Amerikanischen von Dr. Jan Hendrik Schneider und Babette Balzer. 2. Überarbeitete und aktualisierte Auflage, 1. Nachdruck 2014. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

ROBY, K.; DOBBS, M.; CLARK, D.; BOYER, S.; THREADGILL, G. (2002): Highly precise DNA sizing on the CEQ™ Genetic Analysis System. In: BECKMAN COULTER Inc. (ed.) Application Information A-1876B

ROLOFF, A. (2006): Der Baum des Jahres 2006: die Schwarz-Pappel (*Populus nigra* L.) – Biologie, Ökologie, Verwendung. In: Ministerium für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Brandenburg (Hrsg.): Eberswalder Forstliche Schriftenreihe Band XXVII. Die Schwarz-Pappel Fachtagung zum Baum des Jahres 2006. 1. Auflage, S 8–14

RStudio (2016): <https://www.rstudio.com/> 30.03.2017

SMULDERS, M.J.M.; VAN DER SCHOOT, J.; ARENS, P.; VOSMAN, B. (2001): Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). In: Molecular Ecology Notes (2001) 1, S 188-190

Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (1999): <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/sequence-tagged-site/61119#lex-autoren> 16.03.2017

The European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN) (2017): <http://www.euforgen.org/about-us/overview/> 10.03.2017

The R Foundation (o. J.) The R Project for Statistical Computing: <https://www.r-project.org/> 30.03.2017

Thermo Fisher Scientific Inc. (o. J.a): T009-Technical Bulletin, NanoDrop 1000 & 8000. 260/280 and 260/230 Ratios. <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. 15.03.2017

Thermo Fisher Scientific Inc. (o. J.b): T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers, Assessment of Nucleic Acid Purity. <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. 15.03.2017

TUROK, J.; BORELLI, S.(2000): EUFORGEN: The road from Strasbourg Resolution S2. Forest Systems, [S.I.], v. 9, n. 4, p. 9-20, dec. 2000. ISSN 2171-9845

Umweltbundesamt GmbH 2016: OASIS 2.0 <http://www.umweltbundesamt.at/oasis>
08.03.2017

UNIVERSITÄT GÖTTINGEN, 2004: Skriptum zur Vorlesung Statistik III, Kapitel 10, Bayessches Verfahren. <http://www.statoek.wiso.uni-goettingen.de/veranstaltungen/statistik3alt/daten/sec10.pdf> 27.03.2017

VAN DER SCHOOT, J.; POSPISKOVA, M.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M.J.M (2000): Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). In: Springer Verlag (Hrsg.) 2000. Theor Appl Genet (2000) 101: S 317-322

WALENTOWSKI, H. und KARRER, G. (2006): Die Schwarzpappel in den Pflanzengesellschaften der Auen. In: Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (Hrsg.) LWF Wissen, Nr. 52, Beiträge zur Schwarzpappel, S 13-18. Freising 2006. ISBN-0945-8131

WEISGEBER, H. (2010): *Populus nigra* LINNE, 1753 In: Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U. M., Stimm, B., 2010 (Hrsg.): Bäume Mitteleuropas, Von Aspe bis Zirbel-Kiefer. 1. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN: 978-3-527-32825-3

WENZEL, W.; HÖSL, R.; STRAUSS, P. (2012): Erläuterungen zur Niederösterreichischen Bodenkarte 1:900.000

WERNER, P. (o. J.): Analysis of Molecular Variance (AMOVA): <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/amova/amova.htm> 14.04.2017

WHATLEY, H. (o. J.) Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. In: PETERSEN, J. R. and MOHAMMAD A. A. (Hrsg.). Human Press Inc., Totowa, NJ

WHITHLOCK, M. C. and MCCAULEY, D. E. (1999): Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4N m + 1)$. Heredity 82 (1999), 117-125

WRIGHT, S. (1931): Evolution in Mendelian Populations. Genetics 16: 97 Mr 1931

WÜHLISCH, G. (2006): Erhaltung der genetischen Vielfalt der Schwarzpappel. In: Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (Hrsg.): LWF Wissen, Nr. 52, Beiträge zur Schwarzpappel, Freising 2006, S 46-50. ISBN-0945-8131

Eigenständigkeitserklärung

Name, Vorname: MICEK, Melanie

Matrikelnr.: 1041457

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit bzw. Leistung eigenständig, ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus der Literatur bzw. dem Internet habe ich als solche kenntlich gemacht.

Wien, den 01.06.2017

Unterschrift

ANHANG

Aufnahmebogen Schwarzpappelkartierung (*Populus nigra* L.)

Altbaum

ALLGEMEINES:

laufende Nummer: _____

Aufnahme durch: Micek _____

Genetikprobe: Probennummer: _____

Ort: _____

Beschreibung des Ortes: _____

Revier/Abt./UAbt./...: _____

Datum: _____

Koordinaten: X: _____ Y: _____

Baum: stehend: liegend:

Anmerkungen: _____

BHD in cm: _____

Höhe in m: _____ (geschätzt /gemessen)

Vitalität (1-5): _____ Rindenzustand (1-5): _____

Kronendurchmesser: N-S: _____ O-W: _____

astfreier Schaft in m: _____

Maserknollen:

In % des Stammes: bis 25 % bis 50% >50%

Position: freistehend / im Bestand / Bestandesrand / am Ufer / Hangmitte

Schäden: _____

Totastmaterial in m³: _____

Anzahl der Hauptstämme: _____

Anhang A

UMGEBUNG & GEFAHREN:

Entfernung zur nächsten Str.: _____

Gefahr durch Baumsturz (1-3): _____ herabfallende Äste (1-5): _____

Wurzelfreilegung (1-3): _____

Wichtigk. als Mutterb. (1-3): _____

Baumarten des N.bestandes: _____

Baum(teile) vermodert (1-3): _____

Wunden (1-3): _____

sonstiges: _____

Fotos?

Aufnahmeschlüssel, Erläuterungen

Vitalität	1	Keinerlei Beeinträchtigungen, vorherrschend
	2	Geringe, nicht wesentliche Beeinträchtigungen, vorherrschend
	3	Durchschnittliche Beeinträchtigungen, nicht mehr vorherrschend
	4	Bereits sehr starke Beeinträchtigungen, die zum Tod führen, noch lebend
	5	Tot

Rindenzustand	1	Keinerlei Schäden
	2	Feine Risse in geringer Zahl
	3	Feine Risse in großer Zahl und (oder) wenige grobe Risse
	4	Große Anzahl grober Risse und (oder) kleinflächiger Rindenverlust
	5	Großflächiger Rindenverlust

Gefahr durch Baumsturz	1	Keinerlei Anzeichen, dass die Stabilität des Baumes gefährdet ist
	2	Baum leicht geneigt, oder geringe Anzeichen für beeinträchtigte Stabilität
	3	Baum mäßig geneigt und (oder) Anzeichen für beeinträchtigte Stabilität
	4	Stark in eine Richtung hängend, deutliche Anzeichen für stark beeinträchtigte Stabilität
	5	Ausreichende Stabilität nicht mehr gegeben

Anhang A

Gefahr durch herabfallende Äste	1	Keinerlei Gefahr sichtbar
	2	Geringe Gefahr durch feine Äste
	3	Mäßige Gefahr durch wenige grobe Äste
	4	Hohe Gefahr durch grobe Äste
	5	Sehr hohe Gefahr durch sehr grobe Hauptäste oder ganze Stammteile

Wurzelfreilegung	1	Keine oder kaum Wurzeln sichtbar
	2	Deutlich freigelegte Wurzeln oder Wurzelteile
	3	Teile des Wurzelkörpers freigelegt

Wichtigkeit als Mutterbaum	1	Rund um den Baum sehr dichte Nachkommenschar
	2	Umgebender Bestand zum Teil von diesem Baum ausgehend
	3	Umgebender Bestand nicht oder nur im geringen Maße von diesem Baum ausgehend

Baumteile vermodert	1	Keinerlei Anzeichen
	2	Vermodernde oder vermoderte Teile im Astbereich
	3	Hauptstämme betroffen

Wunden	1	Nicht oder in sehr geringem Ausmaß
	2	Hauptäste betroffen
	3	Hauptstämme betroffen

Protokoll für DNA-Extraktion mit INVISORB SPIN PLANT MINI KIT

März 2012 (Jahn) für Knospen, Keimlinge und getrocknete Blätter

Vorbereitung:

- Thermomixer aufheizen auf 65°C
- Elution Buffer D vorheizen auf 65°C
- 80 mL 95% Ethanol zu Wash Buffer I zugeben
- 105 mL 95% Ethanol zu Wash Buffer II zugeben
- Proteinase K in 1 mL dH₂O auflösen, bei -20°C lagern

Extraktion:

- **Pflanzenmaterial, Zusätze (Glaspulver + PVP)** und Glasperlen in ein 2,0 ml Eppi geben und **in der Mühle 2 x 2 Minuten bei 25 Hz verreiben** (davor und dazwischen mit flüssigem Stickstoff kühlen) **danach 400µL Lysis Buffer P und 20µL Proteinase K dazugeben** (sollte mehr Material sein **500µL + 25µL** bzw. **600µL + 30µL** dazugeben)
 - **Alternative:** 60mg Pflanzenmaterial + Glaspulver, Aktivkohle, PVP 360 000 und Sodium in ein 1,5 ml Eppi geben; 200µL Lysis Buffer P dazu und mit dem Stempel verreiben; nochmals 200µL Lysis Buffer P und 20µL Proteinase K dazugeben
 - kurz vortexen und bei 65°C 30 Min. inkubieren
 - 15 Min. bei 12000 rpm zentrifugieren
 - den Prefilter (weiß) in ein 2,0 mL Tube geben und die Lösung auf die Säule aufbringen, bei 12000 rpm 1 Min. zentrifugieren
 - den Prefilter verwerfen und zu dem Zentrifugat 40µL RNase A zugeben, vortexen und 5 Min. bei RT inkubieren
 - 200µL Binding Buffer A dazu pipettieren, gut vortexen (mindestens 15 Min. bei RT stehen lassen)
 - Spin Filter Column (gelb) in ein frisches 2,0 mL Tube einsetzen und die Suspension auf die Säule transferieren
 - für 1 Min. bei 65°C inkubieren , anschließend für 1 Min. bei 12000 rpm zentrifugieren
 - das Filtrat verwerfen

Anhang B

Waschen:

- 550 µL Wash Buffer I auf die Säule aufbringen und 1 Min. zentrifugieren
- das Filtrat verwerfen und die Säule wieder in das Tube geben
- 550 µL Wash Buffer II auf die Säule aufbringen und 1 Min. zentrifugieren
- das Filtrat verwerfen und die Säule wieder in das Tube geben
- den Waschschrift mit dem Wash Buffer II wiederholen
- das Filtrat verwerfen und die Säule 1 Min. bei 12000rpm zentrifugieren, danach die Eppis in der Zentrifuge um 180° drehen und nochmals 1 Min. zentrifugieren

Eluieren:

- den Spin Filter in ein frisches 1,5 mL Tube transferieren, 100µL erwärmten Elution Buffer D zugeben
- 3 Min. bei 65°C inkubieren
- mit 10000 rpm 1 Min. zentrifugieren, Filter verwerfen, DNA bei 4°C lagern

Anhang C

PCR mit WIN3

PCR berechnet für 1 Platte (100 Proben)

5 x Phire Buffer	300,0 µl
dNTPs	15,0 µl
Primer F	15,0 µl
Primer R	15,0 µl
Mg	15,0 µl
H ₂ O	1030,0 µl
Polymerase Phire II	1,0 µl

SPEC 50		
Step	Temp.	Time
1	94°	3 min
2	94°	50 sec
3	70°	1 min
4	9 x zu 2	
5	94°	30 sec
6	50°	50 sec
7	70°	2 min
8	34 x zu 5	
9	4°	5 min
10	end	

Anhang D

R version 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"

Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing

Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

R is free software and comes with ABSOLUTELY NO WARRANTY.

You are welcome to redistribute it under certain conditions.

Type 'license()' or 'licence()' for distribution details.

R is a collaborative project with many contributors.

Type 'contributors()' for more information and

'citation()' on how to cite R or R packages in publications.

Type 'demo()' for some demos, 'help()' for on-line help, or

'help.start()' for an HTML browser interface to help.

Type 'q()' to quit R.

[Workspace loaded from ~/.RData]

Loading required package: adegenet

Loading required package: ade4

/// adegenet 2.0.1 is loaded ////////////

> overview: '?adegenet'

> tutorials/doc/questions: 'adegenetWeb()'

> bug reports/feature requests: adegenetIssues()

> library(poppr)

This is poppr version 2.3.0. To get started, type package?poppr

OMP parallel support: available

Use `suppressPackageStartupMessages(library("poppr"))` to eliminate package startup messages.

Anhang D

```
> x<-getfile()
```

```
> data<-import2genind(x$file)
```

How many genotypes are there?

439

How many markers are there?

15

Which column contains labels for genotypes ('0' if absent)?

1

Which column contains the population factor ('0' if absent)?

0

Which other optional columns should be read (press 'return' when done)?

1:

Which row contains the marker names ('0' if absent)?

1

Are genotypes coded by a single row (y/n)?

y

Converting data from a STRUCTURE .stru file to a genind object...

```
> poppr(data)
```

```
| Total
```

```
  Pop  N MLG eMLG SE   H   G lambda  E.5 Hexp  Ia  rbarD File
1 Total 439 436  436  0 6.08 433  0.998 0.996 0.642 0.928 0.0672 data
```

```
> gengraph.genind(data)
```

Please choose a cutoff distance:

6

Anhang D

Number of clusters found: 404

Are you satisfied with this solution? (yes:y / no:n):

y

\$graph

IGRAPH UNW- 439 62 --

+ attr: name (v/c), color (v/c), label (v/c), label.dist (v/n), size (v/n), label.family (v/c),
label.color

| (v/c), weight (e/n), label (e/n)

+ edges (vertex names):

[1] 999024-01--999024-11 999024-02--999024-13 999024-02--2435 999024-05--999024-07 999024-05--999024-08

[6] 999024-09--999024-10 999024-13--2435 Robusta1 --Robusta2 Robusta1 --Robusta3
Robusta1 --Robusta5

[11] 999026-02--999026-19 AT41 --AT61 AT41 --AT42 AT41 --2396 AT41
--2459

[16] AT41 --AT64 AT61 --AT42 AT61 --AT64 Italica2 --Italica3 Italica2 --
Italica4

[21] Italica2 --Italica5 Robusta2 --Robusta3 Robusta2 --Robusta5 999030-18--999030-30
AT42 --2396

[26] AT42 --2459 AT42 --AT64 Italica3 --Italica4 Italica3 --Italica5 Robusta3 --
Robusta5

[31] Robusta3 --2471 AT43 --2396 AT43 --2459 AT43 --AT64 AT63 --
2396

+ ... omitted several edges

Anhang D

\$clust

\$clust\$membership

999018-01	999022-01	999023-01	999023-02	999023-03	999023-04	999023-05	999023-06	999023-07	999023-08	999023-09	999023-10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
999023-11	999023-12	999023-13	999024-01	999024-02	999024-03	999024-04	999024-05	999024-06	999024-07	999024-08	Italica1
13	14	15	16	17	18	19	20	21	20	20	22
999024-09	999024-10	999024-11	999024-12	999024-13	999025-01	999025-02	999025-03	999025-04	999025-05	999025-06	999025-07
23	23	16	24	17	25	26	27	28	29	30	31
999025-08	999025-09	999025-10	999025-11	999025-12	999025-13	999025-14	999025-15	999025-16	999025-17	999025-18	Robusta1
32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
999025-19	999025-20	999025-21	999025-22	999025-23	999025-24	999025-25	999026-01	999026-02	999026-03	999026-04	999026-05
44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
999026-06	999026-07	999026-08	999026-09	999026-10	999026-11	999026-12	999026-13	999026-14	999026-15	999026-16	AT41
56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
999026-17	999026-18	999026-19	999026-20	999027-01	999027-02	999027-03	999027-04	999027-05	999027-06	999027-07	999027-08
68	69	52	70	71	72	73	74	75	76	77	78
999027-09	999027-10	999027-11	999027-12	999027-13	999027-14	999027-15	999027-16	999027-17	999027-18	999027-19	AT61
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	67
999027-20	999027-21	999027-22	999027-23	999027-24	999027-25	999027-26	999027-27	999027-28	999027-29	999027-30	999027-31
90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
999027-32	999027-33	999027-34	999028-01	999028-02	999028-03	999028-04	999028-05	999028-06	999029-01	999029-02	Italica2
102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
999029-03	999029-04	999029-05	999029-06	999029-07	999029-08	999029-09	999029-10	999029-11	999029-12	999029-13	999029-14
114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
999029-15	999029-16	999029-17	999029-18	999029-19	999029-20	999029-21	999029-22	999029-23	999029-24	999029-25	Robusta2

Anhang D

126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	43
999029-26	999029-27	999029-28	999029-29	999029-30	999030-01	999030-02	999030-03	999030-04	999030-05	999030-06	999030-07
137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148
999030-08	999030-09	999030-10	999030-11	999030-12	999030-13	999030-14	999030-15	999030-16	999030-17	999030-18	AT42
149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	67
999030-19	999030-20	999030-21	999030-22	999030-23	999030-24	999030-25	999030-26	999030-27	999030-28	999030-29	999030-30
160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	159
999031-01	999031-02	999031-03	999031-04	999031-05	999031-06	999031-07	999031-08	999031-09	999031-10	999031-11	AT62
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182
999031-12	999031-13	999031-14	999031-15	999031-16	999031-17	999031-18	999031-19	999031-20	999031-21	999031-22	999031-23
183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194
999031-24	999031-25	999031-26	999031-27	999031-28	999031-29	999031-30	999031-31	999031-32	999031-33	999031-34	Italica3
195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	113
999031-35	999031-36	999031-37	999031-38	999031-39	999031-40	999032-02	999032-03	999032-04	999032-05	999032-06	999032-07
206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217
999032-08	999032-09	999032-10	999032-11	999032-12	999032-13	999032-14	999032-15	999033-01	999033-02	999033-03	Robusta3
218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	43
999033-04	999033-05	999033-06	999033-07	999033-08	999033-09	999033-10	999033-11	999033-12	999033-13	999033-14	999033-15
229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
999033-16	999033-17	999033-18	999033-19	999033-20	999033-21	999033-22	999033-23	999033-24	999033-25	999033-26	AT43
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	67
999033-27	999033-28	999033-29	999033-30	999033-31	999033-32	999033-33	999033-34	999033-35	999033-36	999033-37	999033-38
252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263
999033-39	999033-40	999034-01	999034-02	999034-03	999034-04	999034-05	999034-06	999034-07	999034-08	999034-09	AT63
264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	67
999034-10	999034-11	999034-12	999034-13	999034-14	999034-15	999034-16	999034-17	999034-18	999034-19	999034-20	999034-21

Anhang D

275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286
999034-22	999034-23	999034-24	999034-25	999034-26	999034-27	999034-28	999034-29	999034-30	999034-31	999034-32	Italica4
287	288	289	290	291	290	290	292	293	294	295	113
999034-33	999034-34	999034-35	999035-01	999035-02	999035-03	999035-04	999035-05	999035-06	999035-07	999035-08	999035-09
296	297	298	299	300	301	302	303	304	304	305	306
999035-10	999035-11	999035-12	999035-13	999035-14	999035-15	Robusta4	2494	2495	2496	2497	2498
307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318
2499	2500	2501	2502	2503	2561	SP09	573	2279	2281	2327	2361
319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
2362	2363	2364	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383
331	332	333	334	335	336	336	337	338	339	340	341
2384	2385	2386	2387	2388	2389	Italica5	2390	2392	2393	2394	2395
342	343	344	345	346	347	113	348	349	350	351	352
2396	2397	2398	2399	2400	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440
67	353	354	355	356	357	17	358	359	360	361	362
2441	2443	2444	2445	2446	2447	Robusta5	2448	2449	2450	2451	2452
363	364	365	366	367	368	43	369	370	371	372	373
2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464
374	375	376	377	354	378	67	379	380	381	382	383
2465	2466	2467	2468	2469	2470	AT44	2471	2472	2473	2474	2475
354	384	354	385	386	354	67	43	387	388	389	390
2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487
390	391	392	392	393	394	395	396	397	398	399	400
2488	2489	2490	2491	2492	2493	AT64					
401	402	290	403	404	403	67					

Anhang E

Cervus 3.0.7 - (c) Copyright Tristan Marshall 1998-2014
Distributed by Field Genetics Ltd - www.fieldgenetics.com
Licensed for non-commercial use only

Allele frequency analysis completed 03.04.2017 18:28:22

**** Summary statistics ****

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
wpms17	12	437	0.677	0.659	0.604	0.760	0.596	0.421	0.171	0.463	NS	-0.0149
wpms20	7	434	0.802	0.807	0.777	0.564	0.387	0.208	0.066	0.364	**	0.0031
wpms14	20	435	0.871	0.875	0.862	0.402	0.251	0.095	0.028	0.320	NS	0.0015
ORNL	14	438	0.338	0.603	0.533	0.802	0.660	0.494	0.227	0.506	***	0.2883
PMGC	15	438	0.870	0.848	0.829	0.469	0.304	0.135	0.041	0.337	***	-0.0145
wpms15	18	431	0.731	0.631	0.575	0.777	0.616	0.437	0.192	0.483	***	-0.0872
wpms09	31	435	0.802	0.905	0.897	0.320	0.191	0.057	0.016	0.302	***	0.0596
PTR8	3	439	0.025	0.123	0.117	0.992	0.940	0.888	0.775	0.882	ND	0.5934
wpms16	8	439	0.715	0.759	0.723	0.637	0.457	0.270	0.094	0.394	NS	0.0299
GCPM1894	6	429	0.068	0.088	0.086	0.996	0.956	0.915	0.834	0.915	ND	0.1887
ORPM29	34	411	0.616	0.888	0.878	0.356	0.218	0.069	0.021	0.312	***	0.1839
ORPM344	18	407	0.580	0.756	0.721	0.631	0.452	0.260	0.094	0.396	***	0.1320
PTR4	6	437	0.085	0.142	0.139	0.990	0.925	0.859	0.740	0.864	ND	0.2541
ASP112	14	438	0.555	0.730	0.691	0.663	0.485	0.290	0.111	0.413	***	0.1461
GCPM1719	11	433	0.838	0.820	0.796	0.529	0.355	0.177	0.056	0.354	*	-0.0142

Anhang E

Number of individuals:	439
Number of loci:	15
Mean number of alleles per locus:	14.467
Mean proportion of loci typed:	0.9842
Mean expected heterozygosity:	0.6422
Mean polymorphic information content (PIC):	0.6153
Combined non-exclusion probability (first parent):	0.00079347
Combined non-exclusion probability (second parent):	0.00000879
Combined non-exclusion probability (parent pair):	2.368E-0009
Combined non-exclusion probability (identity):	5.220E-0015
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0.00000667

**** Files ****

Input

Genotype data file: Gesamttabelle.txt

Output

Summary text file: allelfreqoutput.txt

Allele frequency file: allelfreqoutput.alf

**** Loci ****

- 1 wpms17
- 2 wpms20
- 3 wpms14
- 4 ORNL

Anhang E

- 5 PMGC
- 6 wpms15
- 7 wpms09
- 8 PTR8
- 9 wpms16
- 10 GCPM1894
- 11 ORPM29
- 12 ORPM344
- 13 PTR4
- 14 ASP112
- 15 GCPM1719

**** Locus wpms17 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
118	6	6	0	0.0069	0.0069
124	2	2	0	0.0023	0.0023
127	1	1	0	0.0011	0.0011
130	3	3	0	0.0034	0.0034
133	216	176	20	0.2471	0.2573
136	175	137	19	0.2002	0.1981
139	34	32	1	0.0389	0.0385
142	3	3	0	0.0034	0.0034
145	427	225	101	0.4886	0.4958
148	5	5	0	0.0057	0.0057
157	1	1	0	0.0011	0.0011
206	1	1	0	0.0011	0.0011

Anhang E

Number of individuals typed:	437
Heterozygotes:	296
Homozygotes:	141
Number of alleles:	12
Observed heterozygosity:	0.6773
Expected heterozygosity:	0.6593
Polymorphic information content (PIC):	0.6042
Average non-exclusion probability (first parent):	0.7605
Average non-exclusion probability (second parent):	0.5958
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.4206
Average non-exclusion probability (identity):	0.1709
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.4635
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	3.0457
Degrees of freedom:	3
P-value:	0.3846
Significance (with Bonferroni correction):	NS
Null allele frequency estimate:	-0.0149

**** Locus wpms20 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
217	3	3	0	0.0035	0.0035
223	188	134	27	0.2166	0.2069
229	135	127	4	0.1555	0.1644

Anhang E

235	223	169	27	0.2569	0.2595
241	100	86	7	0.1152	0.1136
247	176	134	21	0.2028	0.1982
253	43	43	0	0.0495	0.0508

Number of individuals typed:	434
Heterozygotes:	348
Homozygotes:	86
Number of alleles:	7
Observed heterozygosity:	0.8018
Expected heterozygosity:	0.8070
Polymorphic information content (PIC):	0.7774
Average non-exclusion probability (first parent):	0.5642
Average non-exclusion probability (second parent):	0.3866
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.2078
Average non-exclusion probability (identity):	0.0662
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3635
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	30.7061
Degrees of freedom:	10
P-value:	0.00065599
Significance (with Bonferroni correction):	**
Null allele frequency estimate:	0.0031

Anhang E

**** Locus wpms14 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
201	1	1	0	0.0011	0.0012
219	1	1	0	0.0011	0.0012
225	2	2	0	0.0023	0.0023
228	2	2	0	0.0023	0.0023
231	185	143	21	0.2126	0.2107
234	21	21	0	0.0241	0.0244
237	8	8	0	0.0092	0.0092
240	8	8	0	0.0092	0.0092
243	36	36	0	0.0414	0.0423
246	2	0	1	0.0023	0.0012
249	113	93	10	0.1299	0.1264
252	148	132	8	0.1701	0.1765
255	97	89	4	0.1115	0.1133
258	31	31	0	0.0356	0.0363
261	59	57	1	0.0678	0.0691
264	8	8	0	0.0092	0.0092
267	5	5	0	0.0057	0.0058
270	95	75	10	0.1092	0.1030
273	11	11	0	0.0126	0.0127
279	37	35	1	0.0425	0.0423

Number of individuals typed:	435
Heterozygotes:	379
Homozygotes:	56

Anhang E

Number of alleles:	20
Observed heterozygosity:	0.8713
Expected heterozygosity:	0.8752
Polymorphic information content (PIC):	0.8618
Average non-exclusion probability (first parent):	0.4023
Average non-exclusion probability (second parent):	0.2508
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.0948
Average non-exclusion probability (identity):	0.0282
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3200
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	22.6941
Degrees of freedom:	15
P-value:	0.0909
Significance (with Bonferroni correction):	NS
Null allele frequency estimate:	0.0015

**** Locus ORNL ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
160	11	9	1	0.0126	0.0105
163	30	30	0	0.0342	0.0319
166	7	5	1	0.0080	0.0063
169	7	5	1	0.0080	0.0063
172	305	103	101	0.3482	0.2431
175	458	116	171	0.5228	0.3682
178	37	17	10	0.0422	0.0287

Anhang E

181	5	5	0	0.0057	0.0052
184	2	0	1	0.0023	0.0010
187	4	0	2	0.0046	0.0021
190	3	1	1	0.0034	0.0021
193	4	2	1	0.0046	0.0031
196	1	1	0	0.0011	0.0010
275	2	2	0	0.0023	0.0021

Number of individuals typed:	438
Heterozygotes:	148
Homozygotes:	290
Number of alleles:	14
Observed heterozygosity:	0.3379
Expected heterozygosity:	0.6028
Polymorphic information content (PIC):	0.5332
Average non-exclusion probability (first parent):	0.8023
Average non-exclusion probability (second parent):	0.6598
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.4940
Average non-exclusion probability (identity):	0.2273
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.5058
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	153.9031
Degrees of freedom:	3
P-value:	3.766E-0033
Significance (with Bonferroni correction):	***
Null allele frequency estimate:	0.2883

Anhang E

**** Locus PMGC ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
169	1	1	0	0.0011	0.0011
193	17	17	0	0.0194	0.0196
196	17	15	1	0.0194	0.0184
202	150	122	14	0.1712	0.1696
205	194	158	18	0.2215	0.2265
208	150	130	10	0.1712	0.1751
211	80	66	7	0.0913	0.0871
214	157	147	5	0.1792	0.1919
217	23	23	0	0.0263	0.0266
220	14	14	0	0.0160	0.0161
223	35	33	1	0.0400	0.0396
226	28	28	0	0.0320	0.0325
229	1	1	0	0.0011	0.0011
232	8	6	1	0.0091	0.0080
235	1	1	0	0.0011	0.0011

Number of individuals typed:	438
Heterozygotes:	381
Homozygotes:	57
Number of alleles:	15
Observed heterozygosity:	0.8699
Expected heterozygosity:	0.8484
Polymorphic information content (PIC):	0.8294
Average non-exclusion probability (first parent):	0.4691

Anhang E

Average non-exclusion probability (second parent):	0.3041
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.1348
Average non-exclusion probability (identity):	0.0413
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3366
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	57.7406
Degrees of freedom:	10
P-value:	9.673E-0009
Significance (with Bonferroni correction):	***
Null allele frequency estimate:	-0.0145

**** Locus wpms15 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
193	2	2	0	0.0023	0.0023
196	8	8	0	0.0093	0.0093
199	86	80	3	0.0998	0.1006
205	2	2	0	0.0023	0.0023
208	4	4	0	0.0046	0.0046
211	8	8	0	0.0093	0.0093
214	252	208	22	0.2923	0.3141
217	451	271	90	0.5232	0.5892
220	5	5	0	0.0058	0.0058
223	4	4	0	0.0046	0.0046
229	3	3	0	0.0035	0.0035

Anhang E

232	15	13	1	0.0174	0.0162
235	16	16	0	0.0186	0.0186
238	1	1	0	0.0012	0.0012
244	1	1	0	0.0012	0.0012
247	1	1	0	0.0012	0.0012
250	1	1	0	0.0012	0.0012
268	2	2	0	0.0023	0.0023

Number of individuals typed:	431
Heterozygotes:	315
Homozygotes:	116
Number of alleles:	18
Observed heterozygosity:	0.7309
Expected heterozygosity:	0.6306
Polymorphic information content (PIC):	0.5753
Average non-exclusion probability (first parent):	0.7766
Average non-exclusion probability (second parent):	0.6164
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.4369
Average non-exclusion probability (identity):	0.1916
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.4829
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	80.8031
Degrees of freedom:	3
P-value:	2.066E-0017
Significance (with Bonferroni correction):	***
Null allele frequency estimate:	-0.0872

Anhang E

**** Locus wpms09 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
215	3	1	1	0.0034	0.0023
227	1	1	0	0.0011	0.0011
233	1	1	0	0.0011	0.0011
235	18	14	2	0.0207	0.0185
237	12	10	1	0.0138	0.0127
245	48	46	1	0.0552	0.0554
249	37	33	2	0.0425	0.0409
251	56	46	5	0.0644	0.0602
253	177	125	26	0.2034	0.1912
255	104	68	18	0.1195	0.1039
257	31	27	2	0.0356	0.0338
259	94	78	8	0.1080	0.1039
261	45	35	5	0.0517	0.0469
263	46	44	1	0.0529	0.0529
265	83	75	4	0.0954	0.0950
267	43	31	6	0.0494	0.0433
269	20	20	0	0.0230	0.0232
271	1	1	0	0.0011	0.0011
273	2	0	1	0.0023	0.0011
275	11	9	1	0.0126	0.0115
277	5	5	0	0.0057	0.0057
279	1	1	0	0.0011	0.0011
281	5	3	1	0.0057	0.0046
283	7	5	1	0.0080	0.0069

Anhang E

285	8	8	0	0.0092	0.0092
287	3	3	0	0.0034	0.0034
289	3	3	0	0.0034	0.0034
291	1	1	0	0.0011	0.0011
295	2	2	0	0.0023	0.0023
297	1	1	0	0.0011	0.0011
301	1	1	0	0.0011	0.0011

Number of individuals typed:	435
Heterozygotes:	349
Homozygotes:	86
Number of alleles:	31
Observed heterozygosity:	0.8023
Expected heterozygosity:	0.9048
Polymorphic information content (PIC):	0.8967
Average non-exclusion probability (first parent):	0.3199
Average non-exclusion probability (second parent):	0.1907
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.0566
Average non-exclusion probability (identity):	0.0163
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3022
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	43.2572
Degrees of freedom:	6
P-value:	0.00000010
Significance (with Bonferroni correction):	***
Null allele frequency estimate:	0.0596

Anhang E

**** Locus PTR8 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
136	821	9	406	0.9351	0.3906
139	47	9	19	0.0535	0.0214
142	10	4	3	0.0114	0.0053

Number of individuals typed:	439
Heterozygotes:	11
Homozygotes:	428
Number of alleles:	3
Observed heterozygosity:	0.0251
Expected heterozygosity:	0.1228
Polymorphic information content (PIC):	0.1174
Average non-exclusion probability (first parent):	0.9925
Average non-exclusion probability (second parent):	0.9397
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.8878
Average non-exclusion probability (identity):	0.7750
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.8824
Hardy-Weinberg equilibrium test:	Not done
Null allele frequency estimate:	0.5934

**** Locus wpms16 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
142	328	194	67	0.3736	0.3628

Anhang E

145	161	123	19	0.1834	0.1773
148	96	86	5	0.1093	0.1096
151	1	1	0	0.0011	0.0011
154	191	133	29	0.2175	0.2055
157	16	16	0	0.0182	0.0184
160	84	74	5	0.0957	0.0943
172	1	1	0	0.0011	0.0011

Number of individuals typed:	439
Heterozygotes:	314
Homozygotes:	125
Number of alleles:	8
Observed heterozygosity:	0.7153
Expected heterozygosity:	0.7589
Polymorphic information content (PIC):	0.7226
Average non-exclusion probability (first parent):	0.6368
Average non-exclusion probability (second parent):	0.4567
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.2696
Average non-exclusion probability (identity):	0.0940
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3945
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	14.9651
Degrees of freedom:	10
P-value:	0.1333
Significance (with Bonferroni correction):	NS
Null allele frequency estimate:	0.0299

Anhang E

**** Locus GCPM1894 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
167	3	3	0	0.0035	0.0034
170	3	3	0	0.0035	0.0034
173	4	4	0	0.0047	0.0045
176	2	2	0	0.0023	0.0023
179	819	23	398	0.9545	0.7698
182	27	23	2	0.0315	0.0285

Number of individuals typed:	429
Heterozygotes:	29
Homozygotes:	400
Number of alleles:	6
Observed heterozygosity:	0.0676
Expected heterozygosity:	0.0879
Polymorphic information content (PIC):	0.0859
Average non-exclusion probability (first parent):	0.9961
Average non-exclusion probability (second parent):	0.9556
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.9150
Average non-exclusion probability (identity):	0.8340
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.9146
Hardy-Weinberg equilibrium test:	Not done
Null allele frequency estimate:	0.1887

**** Locus ORPM29 ****

Anhang E

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
212	2	0	1	0.0024	0.0012
224	19	19	0	0.0231	0.0226
226	4	4	0	0.0049	0.0047
228	14	14	0	0.0170	0.0166
230	18	14	2	0.0219	0.0190
232	161	77	42	0.1959	0.1513
234	192	92	50	0.2336	0.1838
236	71	47	12	0.0864	0.0719
238	37	31	3	0.0450	0.0408
240	24	18	3	0.0292	0.0250
242	24	16	4	0.0292	0.0238
244	23	17	3	0.0280	0.0238
246	7	5	1	0.0085	0.0071
248	21	11	5	0.0255	0.0190
250	34	26	4	0.0414	0.0359
252	33	23	5	0.0401	0.0335
254	32	16	8	0.0389	0.0286
256	14	6	4	0.0170	0.0118
258	19	11	4	0.0231	0.0178
260	6	4	1	0.0073	0.0059
262	12	12	0	0.0146	0.0142
264	3	3	0	0.0036	0.0035
266	5	5	0	0.0061	0.0059
268	6	6	0	0.0073	0.0071
270	7	5	1	0.0085	0.0071
272	6	0	3	0.0073	0.0035

Anhang E

276	10	10	0	0.0122	0.0118
280	10	8	1	0.0122	0.0106
284	1	1	0	0.0012	0.0012
288	1	1	0	0.0012	0.0012
294	1	1	0	0.0012	0.0012
298	1	1	0	0.0012	0.0012
304	1	1	0	0.0012	0.0012
306	3	1	1	0.0036	0.0024

Number of individuals typed:	411
Heterozygotes:	253
Homozygotes:	158
Number of alleles:	34
Observed heterozygosity:	0.6156
Expected heterozygosity:	0.8877
Polymorphic information content (PIC):	0.8782
Average non-exclusion probability (first parent):	0.3562
Average non-exclusion probability (second parent):	0.2179
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.0692
Average non-exclusion probability (identity):	0.0212
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3120
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	125.1150
Degrees of freedom:	3
P-value:	6.108E-0027
Significance (with Bonferroni correction):	***

Anhang E

Null allele frequency estimate:

0.1839

**** Locus ORPM344 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
211	1	1	0	0.0012	0.0012
235	45	27	9	0.0553	0.0444
237	18	14	2	0.0221	0.0195
239	1	1	0	0.0012	0.0012
241	315	141	87	0.3870	0.3295
243	2	2	0	0.0025	0.0024
245	194	122	36	0.2383	0.2135
247	52	44	4	0.0639	0.0597
253	141	91	25	0.1732	0.1515
255	23	17	3	0.0283	0.0244
261	2	2	0	0.0025	0.0024
263	2	0	1	0.0025	0.0012
265	6	2	2	0.0074	0.0048
267	1	1	0	0.0012	0.0012
275	2	0	1	0.0025	0.0012
279	5	5	0	0.0061	0.0061
301	1	1	0	0.0012	0.0012
311	3	1	1	0.0037	0.0024

Number of individuals typed:

407

Heterozygotes:

236

Homozygotes:

171

Anhang E

Number of alleles:	18
Observed heterozygosity:	0.5799
Expected heterozygosity:	0.7558
Polymorphic information content (PIC):	0.7214
Average non-exclusion probability (first parent):	0.6314
Average non-exclusion probability (second parent):	0.4522
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.2603
Average non-exclusion probability (identity):	0.0936
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3960
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	63.3297
Degrees of freedom:	6
P-value:	9.455E-0012
Significance (with Bonferroni correction):	***
Null allele frequency estimate:	0.1320

**** Locus PTR4 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
106	10	2	4	0.0114	0.0064
109	809	35	387	0.9256	0.6903
112	12	8	2	0.0137	0.0108
115	11	7	2	0.0126	0.0097
118	30	22	4	0.0343	0.0283
130	2	0	1	0.0023	0.0011

Anhang E

Number of individuals typed:	437
Heterozygotes:	37
Homozygotes:	400
Number of alleles:	6
Observed heterozygosity:	0.0847
Expected heterozygosity:	0.1417
Polymorphic information content (PIC):	0.1387
Average non-exclusion probability (first parent):	0.9897
Average non-exclusion probability (second parent):	0.9254
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.8591
Average non-exclusion probability (identity):	0.7398
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.8642
Hardy-Weinberg equilibrium test:	Not done
Null allele frequency estimate:	0.2541

**** Locus ASP112 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
143	2	2	0	0.0023	0.0022
149	14	10	2	0.0160	0.0135
151	81	73	4	0.0925	0.0901
153	12	8	2	0.0137	0.0112
155	61	35	13	0.0696	0.0551
157	361	129	116	0.4121	0.3273
159	255	143	56	0.2911	0.2548

Anhang E

161	37	37	0	0.0422	0.0422
163	16	16	0	0.0183	0.0180
165	8	6	1	0.0091	0.0079
167	21	21	0	0.0240	0.0237
169	5	5	0	0.0057	0.0056
177	2	0	1	0.0023	0.0011
256	1	1	0	0.0011	0.0011

Number of individuals typed:	438
Heterozygotes:	243
Homozygotes:	195
Number of alleles:	14
Observed heterozygosity:	0.5548
Expected heterozygosity:	0.7296
Polymorphic information content (PIC):	0.6913
Average non-exclusion probability (first parent):	0.6626
Average non-exclusion probability (second parent):	0.4854
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.2900
Average non-exclusion probability (identity):	0.1110
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.4134
Hardy-Weinberg equilibrium test	
Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	76.0333
Degrees of freedom:	3
P-value:	2.177E-0016
Significance (with Bonferroni correction):	***
Null allele frequency estimate:	0.1461

Anhang E

**** Locus GCPM1719 ****

Allele	Count	Hets	Homs	Freq	Freq with null
196	1	1	0	0.0012	0.0012
199	238	192	23	0.2748	0.2904
202	45	39	3	0.0520	0.0497
205	142	118	12	0.1640	0.1634
208	148	128	10	0.1709	0.1746
211	3	1	1	0.0035	0.0023
214	172	140	16	0.1986	0.2001
217	45	39	3	0.0520	0.0497
220	53	49	2	0.0612	0.0607
226	12	12	0	0.0139	0.0140
229	7	7	0	0.0081	0.0081

Number of individuals typed:	433
Heterozygotes:	363
Homozygotes:	70
Number of alleles:	11
Observed heterozygosity:	0.8383
Expected heterozygosity:	0.8205
Polymorphic information content (PIC):	0.7958
Average non-exclusion probability (first parent):	0.5294
Average non-exclusion probability (second parent):	0.3555
Average non-exclusion probability (parent pair):	0.1768
Average non-exclusion probability (identity):	0.0563
Average non-exclusion probability (sib identity):	0.3543

Anhang E

Hardy-Weinberg equilibrium test

Minimum expected frequency:	5.0
Chi-square value:	29.3079
Degrees of freedom:	10
P-value:	0.00111074
Significance (with Bonferroni correction):	*
Null allele frequency estimate:	-0.0142

Anhang F

Cervus 3.0.7 - (c) Copyright Tristan Marshall 1998-2014
Distributed by Field Genetics Ltd - www.fieldgenetics.com
Licensed for non-commercial use only

Simulation of parentage analysis completed 03.04.2017 18:31:43

**** Summary statistics ****

Mother alone:

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments	Assignment Rate
Strict	95.00	6.75	31	0%
Relaxed	80.00	4.44	58	1%
Unassigned			9942	99%
Total			10000	100%

Mother given known father:

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments	Assignment Rate
Strict	95.00	7.19	49	0%
Relaxed	80.00	4.13	85	1%
Unassigned			9915	99%
Total			10000	100%

Anhang F

**** Files ****

Input

Allele frequency file: allelfreqoutput.alf

Output

Simulation summary file: simulationmaternityoutput.txt

Simulation data file: simulationmaternityoutput.sim

**** Loci ****

- 1 wpms17
- 2 wpms20
- 3 wpms14
- 4 ORNL
- 5 PMGC
- 6 wpms15
- 7 wpms09
- 8 PTR8
- 9 wpms16
- 10 GCPM1894
- 11 ORPM29
- 12 ORPM344
- 13 PTR4
- 14 ASP112
- 15 GCPM1719

Anhang F

**** Simulation parameters ****

Input

Number of offspring:	10000
Number of candidate mothers:	122
Proportion of candidate mothers sampled:	0.0100
Proportion of loci typed:	0.90000000
Proportion of loci mistyped:	0.10000000
Error rate in likelihood calculations:	0.10000000
Minimum number of typed loci:	10

Output

Confidence determined using:	Delta
Relaxed confidence level:	80.00%
Strict confidence level:	95.00%

**** Delta distributions ****

Mother alone:

Identity of most likely candidate	N	Mean Delta	Standard Deviation
True mother	86	5.48	2.90
Non-mother (true mother sampled)	1	1.58	0.00
Non-mother (true mother unsampled)	582	1.38	1.18
None	9331		
Total	10000		

Anhang F

Mother given known father:

Identity of most likely candidate	N	Mean Delta	Standard Deviation
True mother	92	7.05	3.86
Non-mother (true mother sampled)	1	0.82	0.00
Non-mother (true mother unsampled)	321	1.56	1.38
None	9586		
Total	10000		

**** Breakdown of parentage assignments ****

Mother alone:

Identity of most likely candidate	Confidence level		
	Strict	Relaxed	Most likely
True mother	30 (97%)	47 (81%)	86 (13%)
Non-mother (true mother sampled)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0%)
Non-mother (true mother unsampled)	1 (3%)	11 (19%)	582 (87%)
Total assignments	31	58	669
No assignment made	9969	9942	9331
Total tests	10000	10000	10000

Mother given known father:

Anhang F

Identity of most likely candidate	Confidence level		
	Strict	Relaxed	Most likely
True mother	47 (96%)	68 (80%)	92 (22%)
Non-mother (true mother sampled)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0%)
Non-mother (true mother unsampled)	2 (4%)	17 (20%)	321 (78%)
Total assignments	49	85	414
No assignment made	9951	9915	9586
Total tests	10000	10000	10000

Anhang G

Cervus 3.0.7 - (c) Copyright Tristan Marshall 1998-2014
Distributed by Field Genetics Ltd - www.fieldgenetics.com
Licensed for non-commercial use only

Parentage analysis completed 03.04.2017 18:34:21

**** Summary statistics ****

Mother alone (all offspring):

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95.00	6.75	5 (1)	2%	(0%)
Relaxed	80.00	4.44	23 (2)	7%	(1%)
Unassigned			294 (315)	93%	(99%)
Total			317 (317)	100%	(100%)

Mother alone (father unknown):

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95.00	6.75	5 (1)	2%	(0%)
Relaxed	80.00	4.44	23 (2)	7%	(1%)
Unassigned			294 (315)	93%	(99%)
Total			317 (317)	100%	(100%)

Anhang G

**** Number of individuals tested ****

Offspring (total):	317
Tested (typed at 10 or more loci):	317
Not tested (typed at fewer than 10 loci):	0
 Candidate mothers (total):	122
Tested (typed at 10 or more loci):	122
Not tested (typed at fewer than 10 loci):	0
Average number of candidate mothers per offspring:	122
Average proportion of sampled candidate mothers:	1.0000

**** Files ****

Input

Offspring file:	Jungwuchs ohne YIN und ORPM.txt
Candidate mother file:	Altbäume.txt
Genotype file:	Gesamttabelle.txt
Allele frequency file:	allelfreqoutput.alf
Simulation data file:	simulationmaternityoutput.sim

Output

Parentage summary file:	maternityanalysisoutput.txt
Parentage data file:	maternityanalysisoutput.csv

Anhang G

**** Loci ****

- 1 wpms17
- 2 wpms20
- 3 wpms14
- 4 ORNL
- 5 PMGC
- 6 wpms15
- 7 wpms09
- 8 PTR8
- 9 wpms16
- 10 GCPM1894
- 11 ORPM29
- 12 ORPM344
- 13 PTR4
- 14 ASP112
- 15 GCPM1719

**** Simulation parameters ****

Input

Number of offspring:	10000
Number of candidate mothers:	122
Proportion of candidate mothers sampled:	0.0100
Proportion of loci typed:	0.90000000

Anhang G

Proportion of loci mistyped:	0.10000000
Error rate in likelihood calculations:	0.10000000
Minimum number of typed loci:	10

Output

Confidence determined using:	Delta
Relaxed confidence level:	80.00%
Strict confidence level:	95.00%

Anhang H

Offspring ID	Loci typed	Candidate mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching
999018-01	15	2389	15	15	2
999022-01	15	2390	15	15	2
999023-01	15	2492	15	15	2
999023-02	15	2490	15	15	1
999023-03	15	2448	13	13	2
999023-04	15	2434	15	15	2
999023-05	15	2393	15	15	1
999023-06	15	573	15	15	2
999023-07	15	2362	15	15	1
999023-08	15	2502	15	15	4
999023-09	15	2463	15	15	1
999023-10	15	2445	15	15	4
999023-11	15	2462	15	15	1
999023-12	15	2502	15	15	3
999023-13	15	2497	15	15	5
999024-01	15	2492	15	15	1
999024-02	15	2435	15	15	0
999024-03	15	2445	15	15	2
999024-04	15	2473	13	13	3
999024-05	15	2483	15	15	3

Anhang H

999024-06	15	2378	15	15	2
999024-07	15	2376	15	15	2
999024-08	15	2386	15	15	3
999024-09	15	2363	15	15	1
999024-10	15	2378	15	15	2
999024-11	15	2492	15	15	1
999024-12	15	Italica5	15	15	0
999024-13	15	2435	15	15	1
999025-01	15	2503	15	15	3
999025-02	15	2387	15	15	1
999025-03	15	2489	13	13	2
999025-04	15	Italica3	15	15	2
999025-05	15	2473	13	13	2
999025-06	15	2443	15	15	3
999025-07	15	2396	15	15	4
999025-08	15	2494	15	15	3
999025-09	15	2491	13	13	1
999025-10	15	2473	13	13	2
999025-11	15	2492	15	15	1
999025-12	15	2453	15	15	1
999025-13	15	2362	15	15	3
999025-14	15	2447	15	15	1

Anhang H

999025-15	15	2473	13	13	2
999025-16	15	2384	15	15	3
999025-17	15	2463	15	15	1
999025-18	15	2502	15	15	2
999025-19	14	2485	13	12	2
999025-20	15	2279	15	15	2
999025-21	15	2387	15	15	2
999025-22	15	2279	15	15	3
999025-23	15	2444	15	15	2
999025-24	15	2492	15	15	0
999025-25	15	2501	15	15	3
999026-01	15	2460	12	12	2
999026-02	15	2384	15	15	2
999026-03	15	2447	15	15	3
999026-04	15	2387	15	15	2
999026-05	15	2392	15	15	2
999026-06	15	2387	15	15	0
999026-07	15	2473	13	13	1
999026-08	15	2500	15	15	0
999026-09	15	2384	15	15	2
999026-10	15	2392	15	15	2
999026-11	15	SP09	15	15	1

Anhang H

999026-12	15	2383	14	14	3
999026-13	14	2399	15	14	1
999026-14	13	2561	15	13	1
999026-15	15	2475	15	15	4
999026-16	15	Italica2	15	15	2
999026-17	15	Italica4	15	15	3
999026-18	13	2460	12	11	2
999026-19	15	2454	15	15	2
999026-20	15	Italica3	15	15	0
999027-01	15	2456	15	15	3
999027-02	15	2381	15	15	1
999027-03	15	2496	15	15	2
999027-04	15	2454	15	15	2
999027-05	15	2456	15	15	2
999027-06	15	2498	15	15	1
999027-07	15	2377	13	13	1
999027-08	15	2378	15	15	0
999027-09	15	2380	15	15	0
999027-10	15	2381	15	15	1
999027-11	15	2486	15	15	3
999027-11	15	2487	15	15	3
999027-12	15	2390	15	15	2

Anhang H

999027-13	15	2456	15	15	1
999027-14	13	2378	15	13	1
999027-15	15	2387	15	15	2
999027-16	15	2482	14	14	1
999027-17	15	2378	15	15	2
999027-18	15	2400	15	15	1
999027-19	15	2378	15	15	4
999027-20	15	2448	13	13	2
999027-21	15	2363	15	15	2
999027-22	15	2378	15	15	1
999027-23	15	2443	15	15	0
999027-24	15	2454	15	15	2
999027-25	15	2377	13	13	1
999027-26	15	2489	13	13	2
999027-27	15	2489	13	13	1
999027-28	15	2500	15	15	1
999027-29	15	2438	15	15	2
999027-30	15	2397	15	15	1
999027-31	15	2443	15	15	1
999027-32	15	2488	15	15	0
999027-33	15	2473	13	13	2
999027-34	15	2381	15	15	0

Anhang H

999028-01	15	2484	13	13	4
999028-02	15	2440	15	15	2
999028-03	15	Italica5	15	15	0
999028-04	15	2376	15	15	2
999028-05	15	2381	15	15	0
999028-06	15	2436	15	15	1
999029-01	15	2279	15	15	0
999029-02	15	2377	13	13	1
999029-03	15	2400	15	15	2
999029-04	15	2489	13	13	2
999029-05	15	Italica4	15	15	2
999029-06	15	2485	13	13	1
999029-07	15	2454	15	15	2
999029-08	15	Italica4	15	15	2
999029-09	15	2387	15	15	1
999029-10	15	2485	13	13	1
999029-11	15	2435	15	15	2
999029-12	15	Italica5	15	15	0
999029-13	15	2392	15	15	2
999029-14	15	2451	14	14	2
999029-15	15	2376	15	15	1
999029-16	15	2400	15	15	1

Anhang H

999029-17	15	2451	14	14	2
999029-18	15	2488	15	15	1
999029-19	15	2279	15	15	1
999029-20	15	2364	15	15	3
999029-21	15	2453	15	15	2
999029-22	15	2394	15	15	1
999029-23	15	2469	12	12	2
999029-24	15	2451	14	14	1
999029-25	15	2456	15	15	0
999029-26	15	2485	13	13	2
999029-27	15	2460	12	12	3
999029-28	15	2400	15	15	2
999029-29	15	2434	15	15	1
999029-30	15	2473	13	13	3
999030-01	15	2377	13	13	1
999030-02	15	2454	15	15	1
999030-03	15	2393	15	15	1
999030-04	15	2454	15	15	2
999030-05	15	2443	15	15	0
999030-06	15	2375	14	14	4
999030-07	15	2455	15	15	2
999030-08	15	2384	15	15	1

Anhang H

999030-09	15	2387	15	15	1
999030-10	15	2377	13	13	2
999030-11	15	2281	15	15	1
999030-12	15	2436	15	15	3
999030-13	15	2378	15	15	2
999030-14	15	Italica2	15	15	0
999030-15	15	2461	15	15	2
999030-16	15	2387	15	15	3
999030-17	15	2454	15	15	1
999030-18	15	2441	15	15	2
999030-19	15	2500	15	15	3
999030-20	15	2454	15	15	2
999030-21	12	2397	15	12	1
999030-22	15	2454	15	15	1
999030-23	15	2445	15	15	2
999030-24	15	2438	15	15	2
999030-25	15	2499	15	15	4
999030-26	15	2387	15	15	2
999030-27	14	2502	15	14	2
999030-28	15	2493	15	15	2
999030-29	15	2460	12	12	0
999030-30	15	2399	15	15	2

Anhang H

999031-01	15	2494	15	15	3
999031-02	15	2463	15	15	3
999031-03	15	2474	15	15	3
999031-04	15	2490	15	15	2
999031-05	15	2393	15	15	4
999031-06	15	2377	13	13	2
999031-07	15	2462	15	15	3
999031-08	15	2561	15	15	2
999031-09	15	2386	15	15	4
999031-10	15	2462	15	15	0
999031-11	15	2441	15	15	2
999031-12	15	2498	15	15	2
999031-13	15	2397	15	15	2
999031-14	15	2453	15	15	2
999031-15	15	2477	15	15	3
999031-16	15	2382	15	15	3
999031-17	15	2448	13	13	0
999031-18	15	2439	15	15	2
999031-19	15	2363	15	15	3
999031-20	15	Italica1	15	15	3
999031-21	15	2363	15	15	1
999031-22	15	2441	15	15	3

Anhang H

999031-23	15	2477	15	15	1
999031-24	15	2437	15	15	3
999031-25	15	2456	15	15	1
999031-26	15	2472	15	15	3
999031-27	15	Italica3	15	15	2
999031-28	15	Italica3	15	15	2
999031-29	15	2439	15	15	3
999031-30	15	2478	15	15	3
999031-31	15	2394	15	15	2
999031-32	15	2437	15	15	3
999031-33	15	2279	15	15	3
999031-34	15	2382	15	15	2
999031-35	15	2382	15	15	2
999031-36	14	2498	15	14	3
999031-37	15	2437	15	15	3
999031-38	15	2468	15	15	2
999031-39	15	2399	15	15	1
999031-40	15	2376	15	15	3
999032-02	15	2455	15	15	3
999032-03	15	Italica3	15	15	3
999032-04	15	2445	15	15	3
999032-05	15	AT43	15	15	3

Anhang H

999032-06	15	2462	15	15	2
999032-07	15	2383	14	14	4
999032-08	15	2495	13	13	2
999032-09	15	2395	15	15	2
999032-10	14	2435	15	14	2
999032-11	15	AT62	15	15	0
999032-12	14	2452	12	11	2
999032-13	15	2387	15	15	3
999032-14	15	2495	13	13	3
999032-15	15	Italica3	15	15	2
999033-01	15	2454	15	15	2
999033-02	15	2485	13	13	3
999033-03	15	2503	15	15	2
999033-04	15	2392	15	15	2
999033-05	15	2387	15	15	2
999033-06	15	2481	15	15	3
999033-07	15	2383	14	14	1
999033-08	15	2492	15	15	2
999033-09	15	2448	13	13	2
999033-10	15	2385	15	15	1
999033-11	15	2361	15	15	1
999033-12	15	2490	15	15	1

Anhang H

999033-13	15	2477	15	15	1
999033-14	15	2454	15	15	2
999033-15	15	2434	15	15	2
999033-16	15	2475	15	15	2
999033-17	15	2458	15	15	2
999033-18	15	2439	15	15	2
999033-19	15	2460	12	12	2
999033-20	14	2444	15	14	1
999033-21	14	2492	15	14	1
999033-22	14	2478	15	14	3
999033-23	15	2444	15	15	3
999033-24	15	2382	15	15	2
999033-25	15	2500	15	15	1
999033-26	14	2503	15	14	5
999033-27	15	2453	15	15	3
999033-28	15	2447	15	15	3
999033-29	15	2389	15	15	2
999033-30	15	2472	15	15	2
999033-31	15	2473	13	13	2
999033-32	15	2361	15	15	4
999033-33	14	2448	13	12	1
999033-34	13	2397	15	13	1

Anhang H

999033-35	15	Italica1	15	15	2
999033-36	15	2477	15	15	1
999033-37	15	2394	15	15	2
999033-38	15	2503	15	15	3
999033-39	15	Italica4	15	15	1
999033-40	15	2387	15	15	2
999034-01	15	2387	15	15	3
999034-02	14	2492	15	14	3
999034-03	15	Italica3	15	15	1
999034-04	15	2490	15	15	1
999034-05	14	2490	15	14	2
999034-06	12	2490	15	12	1
999034-07	15	2490	15	15	2
999034-08	15	2490	15	15	1
999034-09	15	2490	15	15	1
999034-10	12	2490	15	12	0
999034-11	12	2480	14	12	4
999034-12	11	2457	15	11	2
999034-13	11	2494	15	11	4
999034-14	12	2440	15	12	2
999034-15	13	2388	15	13	4
999034-16	14	2488	15	14	2

Anhang H

999034-17	15	2488	15	15	1
999034-18	15	2496	15	15	2
999034-19	15	2279	15	15	0
999034-20	12	2486	15	12	1
999034-20	12	2487	15	12	1
999034-21	12	2473	13	12	2
999034-22	15	2490	15	15	2
999034-23	15	SP09	15	15	3
999034-24	15	2480	14	14	0
999034-25	15	2490	15	15	0
999034-26	15	2480	14	14	0
999034-27	15	2490	15	15	0
999034-28	15	2490	15	15	0
999034-29	13	2491	13	13	0
999034-29	13	2493	15	13	0
999034-30	15	2400	15	15	0
999034-31	15	2397	15	15	1
999034-32	15	2389	15	15	3
999034-33	15	2490	15	15	2
999034-34	10	2451	14	10	2
999034-35	15	SP09	15	15	0
999035-01	15	2494	15	15	2

Anhang H

999035-02	15	2494	15	15	4
999035-03	15	2502	15	15	3
999035-04	15	2503	15	15	0
999035-05	15	2458	15	15	2
999035-06	14	2281	15	14	2
999035-07	15	2485	13	13	2
999035-08	12	2398	15	12	3
999035-08	12	2470	15	12	3
999035-09	15	2471	15	15	5
999035-10	14	2398	15	14	4
999035-10	14	2465	15	14	4
999035-10	14	2470	15	14	4
999035-11	12	2469	12	11	2
999035-12	15	Robusta2	15	15	3
999035-13	13	2483	15	13	4
999035-14	15	2484	13	13	1
999035-15	15	AT64	15	15	3

Anhang I

gemischterbige Individuen		Hybriden		gemischterbige Individuen	
Block 1				Block 2	
Structure-ID	Probennr	Structure-ID	Probennr	Structure-ID	Probennr
220	999029-04	420	999035-15	67	2468
222	999029-06	417	999035-12	414	999035-09
394	999034-24	413	999035-08	56	2457
25	2392	29	2396	421	AT41
34	2434	49	2450	435	Robusta2
72	2473	58	2459	383	999034-13
111	999023-06	65	2466	437	Robusta4
159	999026-03	424	AT44	426	AT62
345	999033-15	425	AT61	314	999031-38
392	999034-22	427	AT63	326	999032-11
430	Italica2	428	AT64	4	2327
228	999029-12	436	Robusta3	45	2446
348	999033-18	31	2398	423	AT43
412	999035-07	64	2465	81	2482
73	2474	69	2470	407	999035-02
144	999025-13	70	2471	406	999035-01
236	999029-20	438	Robusta5	138	999025-07

Anhang I

384	999034-14	66	2467	68	2469
432	Italica4	422	AT42	418	999035-13
16	2382	434	Robusta1	416	999035-11
201	999027-25	67	2468	13	2379
22	2388			101	2502
76	2477			277	999031-01
88	2489				
290	999031-14				
366	999033-36				
398	999034-28				
57	2458				
131	999024-13				
193	999027-17				
249	999030-03				
204	999027-28				
253	999030-07				
431	Italica3				
103	2561				
218	999029-02				
296	999031-20				
282	999031-06				
304	999031-28				

Anhang I

319	999032-04				
110	999023-05				
59	2460				
433	Italica5				
171	999026-15				
393	999034-23				
168	999026-12				
63	2464				
325	999032-10				
327	999032-12				
75	2476				
205	999027-29				
273	999030-27				
429	Italica1				
136	999025-05				
309	999031-33				
329	999032-14				
386	999034-16				
267	999030-21				
291	999031-15				
156	999025-25				
132	999025-01				

Anhang I

7	2363				
182	999027-06				
410	999035-05				
380	999034-10				
341	999033-11				
125	999024-07				
35	2435				
140	999025-09				
137	999025-06				
381	999034-11				
100	2501				
146	999025-15				
172	999026-16				
94	2495				
321	999032-06				
338	999033-08				
322	999032-07				
149	999025-18				
20	2386				
139	999025-08				
50	2451				
71	2472				

Anhang I

382	999034-12				
141	999025-10				
126	999024-08				
123	999024-05				
320	999032-05				
299	999031-23				
385	999034-15				
82	2483				
113	999023-08				
285	999031-09				
192	999027-16				
117	999023-12				
415	999035-10				
51	2452				
211	999028-01				
93	2494				