



Universität für Bodenkultur Wien
University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna

Masterarbeit

Genetische Charakterisierung von Eichenbeständen im Kamptal (Niederösterreich)

verfasst von

Sophia GRUBER, B.Sc.

im Rahmen des Masterstudiums

Phytomedizin

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Wien, Oktober 2021

Betreut von:

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Eduard Hochbichler
Dr.rer.nat. Charalambos Neophytou
Institut für Waldbau
Department für Wald- und Bodenwissenschaften

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich diese Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Gedanken, die im Wortlaut oder in grundlegenden Inhalten aus unveröffentlichten Texten oder aus veröffentlichter Literatur übernommen wurden, sind ordnungsgemäß gekennzeichnet, zitiert und mit genauer Quellenangabe versehen.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder ganz noch teilweise in gleicher oder ähnlicher Form an einer Bildungseinrichtung als Voraussetzung für den Erwerb eines akademischen Grades eingereicht. Sie entspricht vollumfänglich den Leitlinien der Wissenschaftlichen Integrität und den Richtlinien der Guten Wissenschaftlichen Praxis.

Wien, 26.10.2021

Sophia GRUBER (eigenhändig)

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	2
Zusammenfassung	5
Abstract	6
1. Einleitung	7
1.1 Problemstellung und Hintergrund des ACORN-Projektes	7
1.2 Die Stieleiche (<i>Quercus robur L.</i>)	9
1.3 Zielsetzungen der Arbeit	10
2. Stand des Wissens	11
2.1 Literaturüberblick	11
2.2 Relevante populations- und forstgenetische Grundlagen dieser Arbeit	15
3. Material und Methoden	17
3.1 Untersuchungsgebiet	17
3.1.1 Untersuchungsbestände	18
3.1.2 Probenahme	19
3.2 Laborverfahren und Genotypisierung	20
3.2.1 DNA-Extraktion	20
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
3.2.3 Mikrosatelliten	24
3.2.4 Gelelektrophorese	26
3.2.5 Genotypisierung	27
3.2.5.1 Fragmentlängenanalyse	27
3.2.5.2 Bestimmung der Allele mittels GeneMapper	29
3.2.6 Artkenennung und innerartliche Strukturierung der untersuchten Individuen anhand von Referenzproben mithilfe von STRUCTURE	30
3.2.6.1 Artkenennung	30
3.2.6.2 Innerartliche Strukturierung mit Hilfe von STRUCTURE	31
3.2.7 Innerartliche Diversität und Differenzierung	32
3.2.7.1 Genetische Diversität innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatellitengenorte	32
Standardisierte Anzahl der Allele pro Population (Allelreichtum)	35
3.2.7.2 Genetische Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatelliten	35
AMOVA	35
Fixierungsindex F_{ST}	36
D_{JOST}	37
Hauptkoordinatenanalyse basierend auf der Genetischen Distanz nach NEI (1972, 1978)	38
3.2.8 Untersuchung der mütterlichen Abstammung und der refugialen Herkunft mithilfe von Chloroplasten-Mikrosatelliten	39

Minimum Spanning Network (MSN)	40
PermutCpSSR	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Artkennung und innerartliche Strukturierung der untersuchten Individuen anhand von Referenzproben mithilfe von STRUCTURE	41
4.2 Innerartliche Diversität und Differenzierung.....	43
4.2.1 Genetische Diversität innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatellitengenorte	43
4.2.2 Genetische Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatellitengenorte.....	45
AMOVA	45
Fixierungsindex F_{ST}	46
D_{JOST}	46
Hauptkoordinatenanalyse.....	48
4.3 Untersuchung der mütterlichen Abstammung und der refugialen Herkunft mithilfe von Chloroplasten-Mikrosatelliten.....	50
Minimum Spanning Network (MSN)	50
PermutCpSSR.....	50
5. Diskussion.....	53
5.1 Deutliche Abgrenzung des Genpools der Stieleiche von der Trauben- und Flaumeiche	53
5.2 Kamptal: ein Treffpunkt von Migrationsrouten der Eiche	54
5.3 Innerartlich sind die Stieleichenbestände hoch divers.....	56
5.4 Deutliches räumliches Muster der genetischen Struktur bei den Kamptaler Populationen im innerartlichen Vergleich.....	57
5.5 Eignung und Vergleich des F_{ST} -Wertes mit D_{JOST} zur Berechnung der genetischen Differenzierung der populationsgenetischen Daten dieser Studie	58
5.6 Abweichendes Muster der genetischen Struktur an Trockenstandort im Kamptal	59
6. Fazit und Ausblick	61
7. Danksagung.....	64
8. Literaturverzeichnis	65
9. Tabellenverzeichnis	77
10. Abbildungsverzeichnis.....	79
11. Glossar	81
12. Anhang.....	84
Anhang A	84
Anhang B.1	87
Anhang B.2	88
Anhang C	90

Zusammenfassung

Der rasch voranschreitende Klimawandel birgt ein hohes Risiko der Fehlanpassung von Waldökosystemen an sich verändernde Klima- und Standortbedingungen. Dagegen unternimmt das internationale BiodivERsA Projekt „ACORN“ die Selektion und den Transfer von als anpassungsfähig eingeschätztem Saatgut, um so das Anpassungspotenzial zukünftiger Eichenwälder zu erhöhen. Im Rahmen des Projektes war es Ziel der Arbeit, vier ausgewählte Stieleichenbestände (*Quercus robur* L.) im Kamptal (Niederösterreich) mithilfe molekularer Marker der Kern- und Chloroplasten-DNA in Bezug auf ihre Artidentität, eiszeitliche refugiale Herkunft und genetische Vielfalt hin zu untersuchen. Zusätzlich wurden zwei Maße der genetischen Differenzierung, der F_{ST} nach WEIR und COCKERHAM (1984) und D nach JOST (2008) auf ihre Eignung zur Berechnung der populationsgenetischen Strukturen dieser Arbeit miteinander verglichen.

Die molekulargenetische Analyse der Kern-DNA bestätigte die Artzugehörigkeit von 118 der insgesamt 120 phänotypisch identifizierten Stieleichen, wobei zwei einen intermediären Genotyp zwischen Stiel- und Traubeneiche aufwiesen. Aus den Genmarkern der Chloroplasten-DNA konnte nachgewiesen werden, dass die Vorfahren der Kamptaler Stieleichen sowohl aus dem Apennin als auch aus dem Balkan stammen. Die Kombination dieser beiden Migrationsrouten der Eiche ist auch aus umliegenden Gebieten bekannt (FAIROAK 2021) und lässt auf die Autochthonie der Populationen rückschließen. Die populationsgenetische Untersuchung ergab, dass es sich im Kamptal um vergleichsweise heterogene (F_{ST} -Genpoolwert = 0,026) und hoch diverse Bestände handelt. Ein Grund dafür könnte das Zusammentreffen von Apennin- und Balkanroute im Kamptal sein, was zu einer erhöhten Diversität des lokalen Genpools führte. Ein interessantes Ergebnis stellte die abweichende genetische Struktur der Population *Altenhof* dar, welche wahrscheinlich durch Naturverjüngung entstanden und aus einigen wenigen Individuen hervorgegangen ist („Gründereffekt“). Trotz felsigem Untergrund und geringer Wasserversorgung konnten sich die Bäume an dem Standort etablieren, was ein Hinweis auf Trockenadaptation ist. Bestände, welche eine hohe genetische Vielfalt wie die Kamptaler Stieleichen aufweisen, insbesondere die „Trockenpopulationen“, sind von großer Bedeutung für zukünftige Anpassung und könnten sich daher als eine wichtige Saatgutquelle erweisen, um die Klimafitness zukünftiger Eichenwälder zu erhöhen.

Der Vergleich des F_{ST} mit D_{JOST} zeigte, dass die Eignung des F_{ST} von der Polymorphie der verwendeten Mikrosatelliten und untersuchten Genorte abhängt. Da die meisten untersuchten Loci dieser Arbeit mäßig und nicht hoch variabel sind, bleiben der F_{ST} und D_{JOST} vergleichbar und eignen sich somit gleichermaßen gut als Maß für die genetische Differenzierung.

Abstract

Rapidly advancing climate change altering climatic and site conditions poses a high risk of maladaptation of forest ecosystems. Therefore, the international BiodivERsA project "ACORN" has undertaken the selection and the transfer of seed material that has been previously assessed as adaptable, in order to increase the adaptive potential of future oak stands. Within the framework of the ACORN project, the purpose of this Master thesis was to investigate four selected stands of pedunculate oak (*Quercus robur L.*) in the Kamptal in Lower Austria with respect to their species identity, glacial refugial origin and genetic diversity using molecular markers of nuclear and chloroplast DNA. In addition, two measures of genetic differentiation, the F_{ST} according to WEIR and COCKERHAM (1984) and D according to JOST (2008) were compared for their suitability to calculate the population genetic structures of this work.

Molecular genetic analysis of nuclear DNA confirmed the species membership of 118 of the total 120 phenotypically identified pedunculate oaks, with two having an intermediate genotype between pedunculate and sessile oak. From the markers of chloroplast DNA, it was demonstrated that the ancestors of the Kamptal pedunculate oaks originated from both the Apennine and the Balkan glacial refugia. The mutual occurrence of these two post-glacial migration routes is also known from surrounding areas of the Kamptal (FAIROAK 2021) and suggests autochthony of the populations. Population genetic analysis revealed that the Kamptal is home to comparatively differentiated (global $F_{ST} = 0.026$) and highly diverse populations. This is potentially due to the encounter of the Apennine and Balkan post-glacial migration routes in the Kamptal that has led to an increase in the diversity of the local gene pool. An interesting result was the deviating genetic structure of the *Altenhof* population, which most likely originated from natural regeneration from a few individuals ("founder effect"). The trees on this site were able to establish on rocky subsoil in low water conditions, potentially indicating drought adaptation. Stands showing high genetic diversity like the Kamptal pedunculate oaks, especially the "dry populations", are of great importance for future adaptation and could therefore prove to be an important seed source to increase the climate fitness of future oak forests.

Finally, the comparison of the F_{ST} with D_{JOST} showed that the suitability of the F_{ST} depends on the polymorphism of the microsatellite markers and gene loci used. Since most of the loci studied in this work are moderately and not highly variable, the F_{ST} and D_{JOST} remain comparable and thus are equally suitable as measures of genetic differentiation.

1. Einleitung

1.1 Problemstellung und Hintergrund des ACORN-Projektes

Aufgrund des rasant voranschreitenden Klimawandels werden (Wald-) Ökosysteme mehr und mehr an die Grenzen ihrer Anpassungsfähigkeit getrieben. In den Klimamodellen des *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)* werden steigende Temperaturen für ganz Europa, zunehmende Trockenheit, ein erhöhtes Schädlingsaufkommen sowie vermehrt auftretende Extremwetterereignisse prognostiziert (HANEWINKEL et al. 2013). Die Veränderungen von Klimaparametern haben eine Verschiebung von Standorteigenschaften zur Folge und resultieren in einer potenziellen Verminderung der Anpassung lokaler Waldbestände. So werden an Kälte adaptierte, mesische Arten wie z.B. die Fichte (*Picea abies (L.) H.Karst.*) auf lange Sicht weiträumige Gebiete ihres (natürlichen) Verbreitungsareals zu Gunsten von trockenangepassteren Arten wie der Eiche verlieren (HANEWINKEL et al. 2013).

Die große Herausforderung der Forstwirtschaft und -wissenschaft besteht nun darin, dass die langen Generationszeiten bei Waldbäumen einerseits und der schnell voranschreitende Klimawandel andererseits zu einem hohen Grad an Fehlanpassung führen können (AITKEN et al. 2008). Ein vielversprechender Ansatz um einer Fehlanpassung zuvorzukommen, ist die Verwendung von standortfremdem, aber als anpassungsfähig eingeschätztem Saatgut bei Pflanzungen. Das Konzept der künstlichen Migration von Genen einer Art wird als „*Assisted Gene Flow*“ bezeichnet (AITKEN und BEMMELS 2016). Die Idee dahinter ist, für Pflanzungen von Jungbäumen Saatgut aus Regionen zu verwenden, die heute das Klima haben, das in Zukunft für den Zielstandort unter Klimawandel mittels Klimamodelle vorausgesagt wird (ALFARO et al. 2014, RELLSTAB et al. 2017). Dieser Aufgabe widmet sich das 2021 gestartete, internationale BiodivERsA Projekt „ACORN“. Mit Hilfe von genetischen und genomischen Ansätzen sollen Populationen der Stiel-, Trauben- und Flaumeiche identifiziert werden, die ein hohes Anpassungspotenzial an einen klimabedingten erhöhten Trockenstress aufweisen. Die zentrale Hypothese des Vorhabens ist, dass natürliche Selektion über mehrere Generationen hinweg zur Etablierung von trockenstresstoleranten Varianten an Standorten mit einem ausgeprägtem Wasserdefizit geführt hat. Dadurch konnten diese Eichenpopulationen kleinräumig eine Widerstandsfähigkeit gegen Dürre entwickeln. Alle im ACORN-Projekt ausgewählten Bestände werden mittels Zellkern- und Chloroplasten-DNA-Marker bezüglich ihrer Artidentität und refugialen Herkunft genetisch analysiert, so auch die für die vorliegende Masterarbeit ausgewählten Stieleichenbestände im Kamptal.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind wichtig für das ACORN-Projekt, da phänotypische Merkmale bei den untersuchten Eichen oft nicht eindeutig ausgeprägt sind und Hybridisierungen häufig vorkommen.

Neben der Untersuchung von Eichenbeständen aus Zentraleuropa liegt ein Schwerpunkt des ACORN-Projektes auf dem Ostmittelmeergebiet. Dadurch wird das Wissen über räumliche genetische Strukturen erweitert, da diese Region in bisherigen Studien wenig repräsentiert war. Weiters wird untersucht, welche Umweltfaktoren für die Anpassung relevant und welche Gene dabei involviert sind. Durch die Anlage eines Feldversuchs sollen außerdem Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp mit Blick auf die Trockenstresstoleranz gefunden werden. Dazu werden Sämlinge verschiedener Herkunft auf jeweils einer Versuchsfläche pro Untersuchungsgebiet angezogen und morphologisch wie genetisch untersucht.

Im Rahmen dieses Projekts soll insbesondere das Potenzial des kleinräumigen Saatguttransfers aus regionalen Saatgutquellen im Vergleich zu weiträumigen Verbringungen erforscht werden. Mit diesem Ansatz könnten auf regionaler Ebene „vorausschauende“ Bestände gefunden werden, deren Saatgut zur Erhöhung der Anpassungsfähigkeit beiträgt, ohne regionale genetische Strukturen maßgeblich zu verändern.

In das ACORN-Projekt wird von Anfang an ein weites Netz an Interessensgruppen miteingebunden, um gesetzliche Regelungen, marktrelevante Aspekte oder Ansichten von NGOs in der Konzeptionierung zu berücksichtigen. Dies soll die praktische Relevanz der geplanten Forschung sicherstellen und die Schnittstelle zwischen Forschung und Praxis verstärken. Durch die Vernetzung von Grundlagenforschung (Genomik) mit Fragestellungen aus der forstlichen Praxis (Herkunftswahl) können die Ergebnisse aus ACORN sowohl wissenschaftliche, technische als auch wirtschaftliche Verwendung finden. Das Konzept zum Saatguttransfer soll ab Projektende eine wichtige Grundlage zur Erarbeitung von Herkunftsempfehlungen für Saatgut der Eiche bilden, in der das Fehlanpassungsrisiko minimiert ist. Die im Projekt entwickelten Methoden können zudem auch bei anderen Baumarten als Grundlage für die Erarbeitung ähnlicher Fragestellungen dienen (vgl. JANSEN und NEOPHYTOU 2021).

1.2 Die Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Die Stieleiche (*Quercus robur* L.) trägt ihren Namen aufgrund der lang gestielten Fruchtstände (2- 10 cm), während ihre Blätter im Unterschied zu denen der Traubeneiche (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) auf sehr kurzen Blattstielen sitzen (AAS 2008). Sie ist eine der wichtigsten mitteleuropäischen Laubbaumarten, die seit jeher eine bedeutende Rolle in der (Wert-) Holzproduktion, aber auch bei der Herstellung von Nischholzprodukten einnimmt. Ihr hartes und beständiges Holz wird für Konstruktionszwecke, in der Innenausstattung, für den Schiffsbau und für Weinfässer sehr geschätzt (AAS 2008). Auch der ökologische Stellenwert der Baumart ist hoch, da sich Eichenbestände im Vergleich zu anderen zentraleuropäischen Waldbaumarten wie der Buche, der Fichte und der Kiefer als diverser erweisen (ELLENBERG 1996).

Die Stieleiche rückt jedoch vor allem deshalb in den Fokus, weil sie – ähnlich wie andere heimische Eichenarten - als potenzieller „Gewinner des Klimawandels“ gilt und sich an zukünftige Klimabedingungen mit steigenden Dürre- und Hitzeperioden anpassen kann (HANEWINKEL et al. 2013). Sie besitzt eine breite Klimaamplitude und kommt sowohl in ozeanisch geprägten als auch in stärker kontinentalen, sommerwarmen Gebieten vor, wodurch sie ihre Anpassungsfähigkeit an variierende Umweltbedingungen beweist. In Europa reicht ihr Verbreitungsgebiet im Norden bis Irland, Schottland, Südkandinavien und Russland, im Osten bis an den Ural, im Südosten bis zu den Karpaten und zum Balkengebirge, im Süden bis nach Süditalien, Südfrankreich, Nordspanien und das mittlere Portugal (AAS 2008). Die Stieleiche ist eine Baumart der planaren (bis 150m) und kollinen (bis 300m) Ebene, wo sie in den typischen Eichen-Hainbuchenwäldern vorkommt. Wegen ihres hohen Lichtbedarfs kann sie sich hier in der Regel aber nicht gegen die Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) behaupten. In seltenen Fällen ist sie auch auf der montanen Höhenstufe (bis 600 m) anzutreffen (STINGLWAGNER et al. 2016). Im Großteil ihres Areals ist die Stieleiche sympatrisch mit der Traubeneiche verbreitet, wobei die unterschiedlichen ökologischen Ansprüche der beiden Arten die jeweiligen Habitate begrenzen. Der ausschlaggebende limitierende Faktor für die Etablierung der Traubeneiche sind gut drainierte Böden, wohingegen die Stieleiche sehr gut mit (Stau-) nässe im Boden zurechtkommt (AAS 2008). Aus diesem Grund findet man die Stieleiche oft in der Hartholzaue, wo sie produktive Bestände bildet, aber auch auf extrem trockenen Standorten, wo die Konkurrenz der Rotbuche aufgrund der Trockenheit sinkt (AAS 2008). Auf intermediären Standorten kommt es zwischen Stiel- und Traubeneiche, seltener der Flaumeiche (*Q. pubescens* WILLD.), zur Hybridisierung, da strikte Reproduktionsbarrieren fehlen (BACILIERI et al. 1995).

Die Hintergründe und Konsequenzen der Hybridisierung und Differenzierung, insbesondere zwischen Stiel- und Traubeneiche, gaben Anlass für zahlreiche wissenschaftliche Studien, weshalb die beiden Spezies als Modellarten in der Untersuchung von interspezifischem Genfluss und Adaption in einem evolutionären Kontext gelten (NEOPHYTOU 2010).

1.3 Zielsetzungen der Arbeit

„Genetische Vielfalt ist wertvoll und schützenswert, weil sie es den Arten erlaubt sich anzupassen: die Arten sind dann anpassungsfähig“ (HOLDEREGGER 2017) Aus diesem Grund liegt auch ein Hauptaugenmerk des ACORN-Projektes auf der Erhaltung der genetischen Diversität und dem Ausschöpfen der genetischen Potenziale der einzelnen Baumarten (Stiel-, Trauben- und Flaumeiche). In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des ACORN-Projektes vier ausgewählte Stieleichenbestände zu je 30 Individuen im Kamptal im Waldviertel (Niederösterreich) mithilfe molekularer Marker hinsichtlich ihrer Artidentität, genetischen Vielfalt und refugialen Herkunft untersucht. Ziel der Masterarbeit war es, folgende Forschungsfragen zu beantworten:

(1) Wie verhält sich die Artidentität von ausgewählten Stieleichen (*Quercus robur L.*) in von der Art dominierten Beständen an vier verschiedenen Standorten im Kamptal in Niederösterreich?

Gibt es unter den als Stieleichen identifizierten Bäumen auch Individuen mit intermediärem Genotyp, was auf Hybridisierung hindeuten würde?

(2) Wie groß ist die intraspezifische genetische Diversität sowie Differenzierung innerhalb und zwischen den einzelnen Populationen auf den unterschiedlichen Standorten (frisch vs. trocken)?

(3) Welchen refugialen Herkünften entstammen die untersuchten Bestände? Welche Haplotypen der Chloroplasten-DNA treten auf? Lässt sich eine Autochthonie der Populationen rückschließen?

(4) Wie verhalten und eignen sich zwei Maße der genetischen Differenzierung, der F_{ST} nach WEIR und COCKERHAM (1984) und D nach JOST (2008) zur Berechnung der populationsgenetischen Strukturen in dieser Arbeit?

Dies sind Fragen, die wichtige Hinweise über die genetische Ausstattung der dort vorkommenden Eichen und zukünftige Saatgutquellen liefern sollen.

2. Stand des Wissens

2.1 Literaturüberblick

Kaum eine andere Artengruppe erwies sich evolutionär so erfolgreich wie die der Eichen.

Die Gattung *Quercus* ist ausgestattet mit überdurchschnittlicher genetischer Diversität (PLOMION et al. 2018), einer hohen Migrationsgeschwindigkeit (BREWER et al. 2005, GIESECKE und BREWER 2018) und besitzt eine weitreichende ökologische Amplitude (ABBOTT et al. 2013). Vor allem aber die Fähigkeit zu rascher Anpassung, Hybridisierung und Introgression verleiht der Baumart Eiche einen außergewöhnlichen Charakter (KREMER und HIPPEL 2020). Die Entwicklung von molekularen Genmarkern trug wesentlich dazu bei, die Geschichte der heutigen mitteleuropäischen Eichen zu rekonstruieren, die vor etwa 9500 – 9000 Jahren (BREWER et al. 2002), nach Ende der letzten Eiszeit, erneut nach Zentraleuropa rückwanderten. KREMER et al. (1991) entdeckten als Erstes den hohen Grad gemeinsamer Chloroplasten-DNA (cpDNA) von Stiel- und Traubeneiche in sympatrischen Beständen, während sich ihre nukleare DNA eindeutig unterschied. Dies gab Anlass, die räumliche genetische Struktur der Eichen zu erforschen, die seit ihrer Migration nach Europa entstanden war. In der beeindruckend umfassenden Studie von PETIT et al. (2002a) wurden dafür acht nahverwandte europäische Eichenarten aus 2600 Populationen mithilfe von molekularen Markern der Chloroplasten-DNA (cpDNA) untersucht. Die Chloroplasten werden bei den Stieleichen über Samen mütterlich vererbt, wodurch die Spuren nacheiszeitlicher Migration über Generationen hinweg erhalten bleiben (DUMOLIN et al. 1995). Die Ergebnisse zeigten ein deutliches geographisches Verbreitungsmuster einzelner Abstammungslinien, die aus den drei eiszeitlichen (Haupt-) Refugien der Eichen, den südeuropäischen Halbinseln Iberien, Italien und (Ost-) Balkan hervorgingen und unabhängig von der Artzugehörigkeit waren (PETIT et al. 2002a). Diese Zuordnung stimmt einerseits mit den Pollendaten gemäß BREWER et al. (2002) und VAN DER KNAAP et al. (2005) überein und passt andererseits auch zu den von Ersteren modellierten Klimaverhältnissen während der letzten Eiszeit sowie zu den ökologischen Ansprüchen der Eichen.

Die Unabhängigkeit der jeweiligen Chloroplasten-DNA von der Artzugehörigkeit basiert auf der Fähigkeit des ‚Eichenkomplexes‘ Stiel-, Trauben- und Flaumeiche *sensu* PERNÈS (1984) zur Hybridisierung. Im Zuge der Wiederbesiedelung konnte zwischenartlicher Genfluss stattfinden, der zum Austausch der verschiedenen Chloroplasten-DNA Variationen (Chlorotypen, Haplotypen) führte. Einseitige, asymmetrische Hybridisierungsereignisse zwischen der wegbereitenden Pionierart Stieleiche (♀) und der mittels Pollen „eindringenden“

(Engl. „invading“) Schlusswaldbaumart Traubeneiche (♂), sowie anschließende wiederholte Rückkreuzungen, ermöglichten es der Traubeneiche mit der Stieleiche zu migrieren (Engl. „introgression-driven migration), beziehungsweise sich selbst an Standorten durch „Pollenüberschwemmung“ (Engl. „pollen swamping“) zu etablieren (PETIT et al. 2003, GUICHOUX et al. 2013, LEROY et al. 2020a).

Im Alpenraum sind heute zwei Verwandtschaftslinien der cpDNA mit Herkunft aus Italien und dem Balkan vorherrschend, die ihrem Ursprung entsprechend hauptsächlich in den westlichen, beziehungsweise östlichen Regionen des Alpenbogens zu finden sind (CSAIKL et al. 2002, MÁTYÁS und SPERISEN 2001). Die Einflüsse der iberischen Herkunft sind im Alpenraum hingegen sehr gering und dürften wohl eher auf menschlichen Samentransfer zurückzuführen sein (MÁTYÁS et al. 2002, NEOPHYTOU und MICHIELS 2013, NEOPHYTOU 2015).

Neueste Studien basierend auf Ganzgenomsequenzierungen konnten bestätigen, dass interspezifischer Genfluss den Fortbestand der unterschiedlichen morphologischen, ökologischen und genetischen Identitäten der Eichenarten nicht gefährdet (EATON et al. 2015, LEROY et al. 2017, 2020b), auch wenn nur ein begrenzter Teil des Genoms (auf dem die jeweiligen Genabschnitte weit auseinander liegen) für die Aufrechterhaltung von Reproduktionsbarrieren zwischen den Arten verantwortlich ist (KREMER et al. 2002a, SCOTTI-SAINTAGNE et al. 2004, LEXER et al. 2006, CURTU et al. 2007). Insbesondere präzygotische, aber auch postzygotische reproduktive Barrieren tragen maßgeblich zur Artbildung und -erhaltung bei (ABADIE et al. 2012, LEPAIS et al. 2013) und können durch das Einwirken divergierender Selektion genetisch aktiv zwischen den Arten aufrechterhalten, aber in jedem Lebensstadium angepasst werden (PERNÈS 1984, COYNE und ORR 2004, RIESEBERG und WILLIS 2007). Zu weiteren Gründen für die bestehende Differenzierung zwischen den Spezies zählen höhere Befruchtungserfolge einzelner Individuen einer Art (Pollenkonkurrenz) und Rückkreuzungen zum Vorteil der ‚artenreinen‘ Eltern in Folge von gerichteter Selektion (LEPAIS und GERBER 2011, GERBER et al. 2014). Ebenso spielen aber auch die Artenzusammensetzung im lokalen Bestand, der Einfluss vorherrschender Umweltbedingungen und die ökologischen Ansprüche der jeweiligen Arten eine Rolle im Artbildungsprozess (LEPAIS et al. 2009, ABADIE et al. 2012). Derzeitigen Erkenntnissen zufolge könnten anpassungsrelevante Gene, die in Zusammenhang mit Trockentoleranz stehen (ONEY-BIROL et al. 2018), oder Gene, die in die photoperiodische Kontrolle von Wachstum und Entwicklung involviert sind (LIND-RIEHL et al. 2014), überproportional für die genetische Differenzierung zwischen den Arten verantwortlich sein: natürliche Auslese in Arten mit unterschiedlichen ökologischen Ansprüchen mag ausreichend sein, um die

Artdivergenz in Angesicht von interspezifischem Genfluss zu erklären (KREMER und HIPPEL 2020). Dabei zeigen intermediäre Formen in den meisten Fällen dieselbe Fitness wie ihre ‚artenreinen‘ Eltern (PETIT et al. 2003, LEPAIS et al. 2009, LEPAIS und GERBER 2011) und werden an Randgebieten des natürlichen Verbreitungsareals, als auch in den nördlicheren Breitengraden sogar selektiv bevorzugt (KREMER et al. 2002b, OLSSON 1975a). In einer aktuellen Studie von LEROY et al. (2020a) wurde erstmals der genetische und phänotypische Beweis erbracht, dass Introgression in Eichen zum Austausch von anpassungsrelevanter genetischer Vielfalt beiträgt. So konnte nachgewiesen werden, dass die Introgression von Genen aus Stieleichen kühlerer und frischerer Gebiete die Anpassung der in die höheren Breiten und Höhen eindringenden Traubeneichen erleichterte (LEROY et al. 2020a). Genfluss zwischen sympatrisch vorkommenden Arten wirkt sich also unterstützend auf die Besiedelung neuer Areale aus, welche bedingt durch den Klimawandel (wieder) notwendig wird (PETIT et al. 2003). Diese Migrationen ermöglichen den Eichen einerseits Zutritt zu neuen Nischenplätzen, wie anhand von Korrelationen zwischen phänotypischer Variation und Umweltgradienten (Höhenlage, geografischen Breite) belegt wurde (SAVOLAINEN et al. 2007, ALBERTO et al. 2013). Andererseits führen sie aber auch zur Diversifizierung der Abstammung („lineage diversification“) (ABBOTT et al. 2013).

Auf Populationsebene gewährt eine hohe genetische und phänotypische Variation innerhalb der Arten Nischenkomplementarität sowie eine hohe Artenvielfalt innerhalb eines Bestandes (Anmerkung: also die Grundvoraussetzung dafür, dass Selektion zu lokaler Anpassung führen kann!), auch wenn sich die Arten im Durchschnitt nicht stark voneinander differenzieren (CLARK 2010, CLARK et al. 2011, HAUSCH et al. 2018). Die rasche Anpassungsfähigkeit innerhalb von Populationen (PETIT und HAMPE 2006) führt gleichsam aber auch zu rascher Differenzierung zwischen den Arten, weil sich die Konkurrenzfähigkeit in Ungleichgewicht befindet, wodurch insgesamt wiederum die Differenzierung und Koexistenz von Arten auf ökologischer und evolutionärer Ebene gefördert wird (HART et al. 2019). Diese Dynamiken beobachteten u.a. auch GUGERLI et al. (2007), NEOPHYTOU und MICHIELS (2013) sowie NEOPHYTOU (2015) in ihren populationsgenetischen Studien über die einheimischen Eichenarten Stieleiche, Traubeneiche und Flaumeiche. So konnten die Ergebnisse eine relativ hohe interspezifische genetische Differenzierung der Stieleiche von den beiden phylogenetisch näheren Eichenarten Trauben- und Flaumeiche nachweisen. Weiters wurde ein relativ hoher Anteil an Individuen mit intermediärem Genotyp festgestellt, was für Naturhybridisierung zwischen den Eichenarten spricht. Innerartlich waren die Stiel- und Traubeneichen Populationen im Gegensatz zu den Flaumeichen sehr homogen. Die ausgeprägte

Differenzierung zwischen Flaumeichenbeständen mag an den Folgen von Gendrift, aber auch an genetischer Introgression mit der Traubeneiche liegen (NEOPHYTOU und MICHIELS 2013, NEOPHYTOU 2015). Die Herkunftsanalyse der untersuchten Eichenbestände ergab, dass sich auch am Oberrhein (Deutschland, Frankreich) drei verschiedene postglaziale Rückwanderungswege aus den drei wichtigen Eiszeitrefugien (Iberische Halbinsel, Apennin und Balkan) trafen (NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Im Unterschied zur Kern-DNA, teilten bei der Chloroplasten-DNA alle drei Eichenarten die gleiche räumliche Struktur, was ein Beweis historischer Hybridisierung ist. Im Speziellen wies die Stieleiche die höchste haplotypische Diversität innerhalb und die niedrigste Differenzierung zwischen den Populationen auf. Dies kann auf die Ökologie der Art zurückgeführt werden, da die Stieleiche einen intensiveren Genfluss als die anderen beiden Arten fördert (NEOPHYTOU 2015).

Ein großes Thema der aktuellen Forschung ist die Abschätzung des Anpassungspotenzials der jeweiligen Waldbaumarten an veränderte Klimabedingungen. HOMOLKA et al. (2013) beispielsweise fanden mehrere Gene in der Trauben- und Stieleiche, die bei der Anpassung an Trockenheit eine Rolle spielen könnten. Überdies kam die Studie zu dem Ergebnis, dass die Traubeneiche im Vergleich zur Stieleiche eine höhere genetische Variation aufweist, was auf ein höheres Anpassungspotenzial bezüglich des zukünftig erwarteten, trockeneren Klimas hindeutet. SÁENZ-ROMERO et al. (2017, 2019) wiederum simulierten die genetische und phänotypische Plastizität von europäischen Traubeneichen aus unterschiedlichsten geographischen Breiten, die sie davor diversesten Klima- und Umweltbedingungen ausgesetzt hatten, in für die Jahre 2071-2100 prognostizierten Klimamodellen. Die Simulation ergab, dass die Traubeneiche über ein hohes Maß an genetischer und phänotypischer Plastizität in ihren Populationen verfügt, die es ihr ermöglichen dürfte, sich an ein breites Spektrum von Umweltbedingungen anzupassen und dem Klimawandel resilient gegenüberzustehen. Die adaptive genetische Variation von Stiel-, Trauben- und Flaumeiche wurde auch von RELSTAB et al. (2016) untersucht und mit einer Vielzahl von Umweltfaktoren (Topografie, Klima und Boden) in Bezug gesetzt. Eine Einschätzung der potenziellen Angepasstheit zeigte, dass die untersuchten Eichenprovenienzen und -arten nur in beschränktem Ausmaß bereits an zukünftige Umweltbedingungen angepasst sind. „Die gefundenen Korrelationen legen nahe, dass für gute Angepasstheit zum Teil beträchtliche Änderungen der Allelfrequenzen nötig sind, nämlich bis zu 50% in den einzelnen Provenienzen und bis zu durchschnittlich 30 % in den einzelnen Arten“ (RELSTAB et al. 2016). Daher ist anzunehmen, dass autochthone Eichenbestände von besser angepassten Provenienzen, zum Beispiel aus nahe gelegenen,

wärmeren oder trockeneren Gebieten, Konkurrenz bekommen werden. Eine Tatsache, die im ACORN-Projekt aufgegriffen und in Form von „Assisted-Gene-Flow“ als Maßnahme gegen den Klimawandel umgesetzt wird (siehe Kapitel 1.1).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Eichen über eine große potenzielle adaptive genetische Variation verfügen. Die Umweltfaktoren und Gene, die bei der Anpassung involviert sind, unterscheiden sich aber beträchtlich zwischen den Arten (RELLSTAB et al. 2016). Aufgrund von unterschiedlichen Standortvorlieben und Anpassungspotenziale von Stiel-, Trauben- und Flaumeiche ist davon auszugehen, dass sich ihre Areale verschieben werden. So wird beispielsweise bei zunehmender Trockenheit an bisherigen Stieleichenstandorten auf der Alpennordseite teilweise eine Artverschiebung Richtung Trauben- und Flaumeiche zu erwarten sein (HANEWINKEL et al. 2013). Aus diesem Grund ist ausgewiesenes, angepasstes Saatgut der Stieleiche umso dringender von Nöten, um alle eng miteinander verbundenen Eichenarten zu erhalten.

2.2 Relevante populations- und forstgenetische Grundlagen dieser Arbeit

Die Populationsgenetik befasst sich mit dem Vorkommen von Allelen in einer Population sowie deren Häufigkeiten und Veränderungen mit der Zeit. Dabei ist eine Population definiert als die Gesamtheit aller Individuen einer Gruppe, die sich fortpflanzen können und eine neue Generation bilden (SCHMIDT 2017). Um die Höhe der genetischen Variation in einzelnen Populationen zu quantifizieren und vergleichbar zu machen, werden verschiedene Parameter herangezogen. So wird die Anzahl der beobachteten Allele an einem Genort als *genetische Vielfalt* bezeichnet, während die relative Häufigkeit von Allelen in einer Population die *genetische Diversität* an einem bestimmten Genort widerspiegelt. Die genetische Differenzierung hingegen gibt an, wie sehr sich die genotypischen Strukturen mehrerer Populationen voneinander unterscheiden (WHITE et al. 2007). Alle Gene und Allele, die in dieser Population vorkommen, bilden den Genpool. Ein Genpool ist nicht stabil, da simultan einwirkende genetische und evolutionäre Faktoren wie Mutation, Migration und Rekombination einerseits eine Erhöhung der genetischen Variation bewirken, Isolation, Selektion und Gendrift hingegen eine Reduktion. Die zufällige Änderung von Allelhäufigkeiten im Genpool einer Population von Generation zu Generation wird genetische Drift genannt. Diese führt zur Abnahme von genetischer Vielfalt innerhalb von Populationen und Zunahme genetischer Differenzierung zwischen Populationen. Das kann sich besonders intensiv in kleinen Populationen auswirken. Ein Sonderfall ist der *Gründereffekt*. Dabei geht die

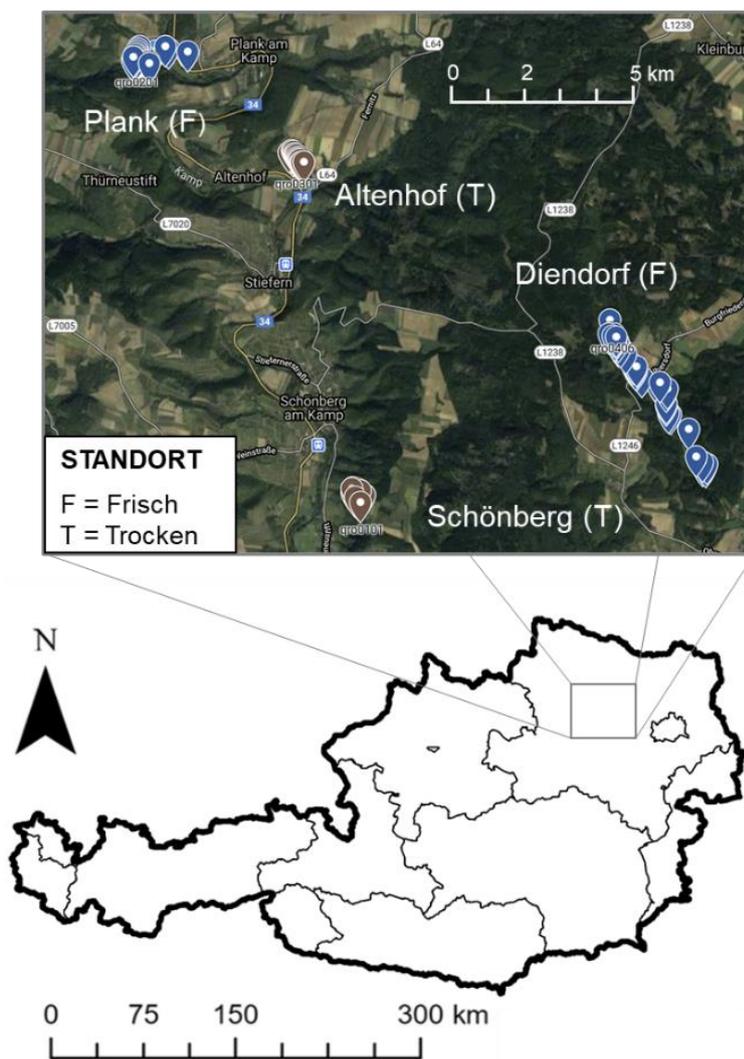
Ausbreitung eines Allels auf den Genotypen eines oder weniger Individuen während der Stammesgründung oder -etablierung zurück (SCHMIDT 2017, WHITE et al. 2007).

Das Hardy-Weinberg-Gesetz als zentrales Konzept zur Berechnung von Allelhäufigkeiten geht von idealisierten Bedingungen in einer sehr großen, *panmiktischen* Population aus, in der keine evolutionären Kräfte wie Mutation, Migration, Drift und Selektion wirken. Würde die Bedingung zufälliger Paarung erfüllt sein, sodass sich alle Individuen einer Population mit gleicher Wahrscheinlichkeit paaren (Panmixie), so könnte ausgehend von der Allelfrequenz die zu erwartende Verteilung aller Genotypen in der nächsten Generation berechnet werden (LOWE et al. 2004). In diesem Idealfall befinden sich die Allel- und Genotypenhäufigkeiten schon in der ersten Folgegeneration im sogenannten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG), wobei die tatsächlich *beobachtete Heterozygotie* (H_o) gleich der theoretischen, unter Hardy-Weinberg *erwarteten Heterozygotie* (H_e), ist. In Waldbäumen wird das HWG aufgrund großer Populationsgrößen, langer Lebensdauer, einem effizienten Paarungssystem und Genfluss zwischen den Populationen, Auskreuzung und ausgleichender Selektion oft (näherungsweise) erfüllt, wodurch die genetische Zusammensetzung beziehungsweise Vielfalt erhalten bleibt. Sollte es in einer Population über einen gewissen Zeitraum vermehrt zu Inzucht gekommen sein, ändern sich die Genotypenhäufigkeiten (*Heterozygotendefizit*), jedoch nicht die Allelhäufigkeiten und das HWG kann durch einmalige Zufallspaarung innerhalb einer Generation (wieder-) hergestellt werden. Dieser Effekt ist bezüglich der Verbreitung von Gendefekten allerdings von Nachteil, da rezessive, schädliche Allele durch Heterozygoten getragen werden und diese Erbkrankheiten so über Generation hinweg überleben können (ERIKSSON et al. 2006). Neben Abweichungen vom HWG aufgrund des Paarungssystems, üben die bereits erwähnten, allseits gegenwärtigen Evolutionsmechanismen den größten Einfluss auf einen Genpool aus und führen dazu, dass die genetische Variation innerhalb von Populationen viel größer als zwischen verschiedenen Populationen ist. So können Populationsstrukturen durch Untergliederung der Gesamtpopulation in (Sub-)Populationen mithilfe des *Fixierungsindex* F_{ST} (nach WRIGHT 1947) untersucht werden. Der Fixierungsindex F_{ST} misst das Heterozygotendefizit oder die Fixierung einzelner Allele in den Subpopulationen. Dabei ist die *erwartete Heterozygotie* (H_s) innerhalb der Subpopulationen im Durchschnitt immer niedriger als die *gesamte Heterozygotie* (H_T) des Genpools, auch wenn sich die Subpopulationen im HWG befinden. Dieser Effekt wird *Wahlund-Effekt* (nach WAHLUND 1928) genannt (ERIKSSON et al. 2006).

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgebiet

Das Untersuchungsgebiet befindet sich im Kampthal im Bezirk Krems in Niederösterreich, genau an der Grenze des forstlichen Wuchsgebietes 8.1. *Pannonisches Tief- und Hügelland* zum forstlichen Wuchsgebiet 9.2 *Waldviertel* (ENGLISCH und KILIAN 1999) (siehe Abbildung 1). Während das Klima des Waldviertels niederschlagsarm und kühl-boreal ist, ist das untersuchte Areal mehr von dem trocken-warmen Klima des Pannonischen Tief- und Hügellandes geprägt mit mäßig kaltem, schneearmem Winter und einer durchschnittlichen Jahrestemperatur von 9,2°C. Trockenperioden im Sommer treten in diesem Wuchsgebiet häufiger auf als in allen anderen Wuchsgebieten. Austrocknende Südostwinde sind ebenfalls keine Seltenheit. Die Jahresniederschläge sind mit 450-700mm die niedrigsten in Österreich, wobei das Sommermaximum ausgeprägt ist (BFW 2020). Geomorphologisch umfasst der Raum im Wesentlichen tertiäres Hügelland und Schotterterrassen, welche zum Teil mit Löss



oder kalkfreiem Flugstaub bedeckt sind. Im Untersuchungsgebiet überwiegen Braunerde auf Löß und tertiären Sedimenten (BFW 2020). Die vier Untersuchungsbestände liegen zwischen 261m Seehöhe (*Plank am Kamp, Altenhof*) und 344 - 367m Seehöhe (*Schönberg am Kamp, Diendorf am Walde*) auf kolliner bzw. submontaner Höhenstufe. In der submontanen Höhenstufe sind wärmeliebende Eichen-Hainbuchenwälder vorherrschend, an grundwasserfernen Standorten mit Traubeneiche, in Talsohlen und Muldenlagen mit Stieleiche (BFW 2020).

Abbildung 1: Untersuchungsgebiet Kampthal, Niederösterreich

3.1.1 Untersuchungsbestände

Ihre natürlichen Vorkommen und besten Wuchsleistungen weisen Stieleichen auf feuchten oder staunassen, nährstoffreichen Böden auf, insbesondere in ausgedehnten Auwäldern entlang größerer Flüsse, wie dem Kamp. Sie kommen jedoch auch mit trockenen Magerstandorten zurecht (AAS 2008). In Hinblick auf das ACORN Projekt (siehe Website: acorn-biodiversa.net) wurden zwei Paare räumlich benachbarter Bestände ausgewählt, die jeweils auf einem trockenen und einem gut wasserversorgten Standort wachsen, um eine Anpassung der Eichen an Trockenheit aus physiologischer und genetischer Sicht zu untersuchen. Die vier Stieleichenbestände befinden sich ausgehend von Richtung Nordwesten nach Südosten in *Plank am Kamp*, *Altenhof am Kamp*, *Diendorf am Walde* und *Schönberg am Kamp* (Abbildung 1). Beim Bodentyp des frischen Standortes *Plank am Kamp* handelt es sich um Braunen Auboden mit Schwemmmaterial als Ausgangsmaterial. Dieser Bodentyp ist tiefgründig und wechselfeucht, er weist eine hohe Durchlässigkeit auf und besitzt die Humusform Mull. Die Bodenart ist mittelhumoser, lehmiger Sand, der mit einem schwach sauren bis neutralen pH-Wert kalkfrei bis schwach kalkhaltig ist (eBOD2). Nach der *Anleitung zur Forstlichen Standortskartierung* (ENGLISCH und KILIAN 1999) wird dieser Standort dem Vegetationstyp „Auwaldtyp“ zugeordnet. Die mittlere Bestandesoberhöhe liegt zwischen 20 und 25m. Laut Auskunft der GUTSVERWALTUNG GRAFENEGER (2021) ist der zweite frische Bestand bei *Diendorf am Walde* ein feuchter bis nasser, skelettarmer Grabenstandort auf lößhaltigen Schwemmböden des Lungenkraut–Heckenkirsche–Immergrün–Kleblabkraut–Typs. Die Stieleichen sind an diesem Standort entlang des Baches in kleinen Gruppen angeordnet und weisen folgende Baumartenzusammensetzung auf (Tabelle 1):

Tabelle 1: Baumartenzusammensetzung des Bestandes *Diendorf am Walde*

Anteile	Baumart	Bonität	Alter	Oberhöhe (m)
0,50	Aspe (Zitterpappel)	6,0	120	17,4
5,00	Buche	4,5	120	21,5
0,50	Douglasie	9,0	120	29,7
3,00	Stieleiche	8,0	120	31,5
0,50	Tanne	8,4	120	28,0
0,50	Weißkiefer	4,9	120	24,6

Altenhof am Kamp und *Schönberg am Kamp* sind beide trockene Standorte, die sich jedoch sehr voneinander unterscheiden. Der Bestand *Diendorf am Walde* ist ein trocken bis mäßig

frischer, skelettreicher, süd- bis südwestexponierter Oberhang- und Rückenstandort auf seichtgründiger Braunerde des Landreitgras – Glockenblume – Heidelbeer- Typs (GUTSVERWALTUNBG GRAFENEGG 2021). Die Baumartenzusammensetzung ist wie folgt:

Tabelle 2: Baumartenzusammensetzung des Bestandes *Schönberg am Kamp*

Anteile	Baumart	Bonität	Alter	Oberhöhe (m)
2,50	Fichte	5,0	125	24,1
0,50	Lärche	4,1	125	23,5
3,50	Robinie	4,0	125	15,9
2,00	Schwarzkiefer	3,5	125	16,8
0,50	Stieleiche	4,2	125	21,5
1,00	Weißkiefer	3,5	125	21,2

Die Stieleichen bei *Altenhof* hingegen wachsen an einem felsigen Steilhang auf Silikatgestein mit dem Bodentyp Ranker. Charakteristisch für diesen Typ Boden sind Seichtgründigkeit, Trockenheit und hohe Durchlässigkeit sowie eine Mull Auflage. Die Bodenart ist lehmiger Sand, dessen Spektrum von schwach bis mittelhumos, kalkfrei bis stark kalkhaltig über alkalisch bis sauer reichen kann (eBOD2). Die mittlere Bestandesoberhöhe dieses Bestandes beträgt 7-10m. Laut der mündlichen Auskunft des Amtsleiters Peter Leopold der Gemeinde Schönberg am Kamp kommen die Stieleichen hier naturverjüngt auf, seit man vor geschätzt 20 Jahren begonnen hat, den vorhergehenden Föhrenwald abzuholzen. Eine Untersuchung mittels Bohrkerne im Zuge des ACORN-Projektes wird hingegen genauere Daten zum Alter des Bestandes liefern.

3.1.2 Probenahme

Für die populationsgenetischen Analysen wurde im Oktober und Dezember 2020 Blattmaterial inklusive Knospen (ca. 10 pro Baum) mithilfe einer Stangensäge in den vier Beständen gewonnen. Wenn das Blattmaterial unerreichbar war, wurde stattdessen Kambiumgewebe am Stammfuß mittels Lochbohrer entnommen. Zur Probengewinnung wurden 30 Bäume pro Bestand im Abstand von 25 – 30m ausgewählt, um eng verwandte Individuen zu vermeiden. Auf dem Steilhang bei *Altenhof* waren die Abstände zwischen den beprobten Individuen geringer (15 – 20m), weil die Bäume auf diesem trockenen Standort eine niedrigere Baumhöhe aufweisen und die horizontale, generative Verbreitung entsprechend geringer ist als bei höheren

Mutterbäumen mit breiterer Krone. Bei der Probenentnahme wurden die Bäume zufällig und nicht aufgrund besonderer phänotypischer Merkmale beerntet, um den Bestand möglichst unverzerrt und unvoreingenommen zu repräsentieren. Das Probenmaterial wurde zum Trocknen in beschriftete Säckchen mit Silicagel verpackt und so bis zur DNA-Extraktion gelagert. Zur Wiedererkennung wurde jeder Baum unter Zuhilfenahme eines GPS-Gerätes außerdem georeferenziert und mit einem Aluplättchen in der Borke mit einer spezifischen Nummer versehen.

3.2 Laborverfahren und Genotypisierung

3.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde nach dem Protokoll des DNeasy® Plant Mini Kits des Herstellers QIAGEN (2016) durchgeführt, welches alle benötigten Substanzen und Reaktionsgefäße bereits enthält. Bei der Verwendung dieses Kits wird das Probenmaterial im Zuge des DNA-Extraktionsvorganges zuerst mechanisch und chemisch aufgeschlossen, die RNA wird enzymatisch abgebaut, anschließend werden unerwünschte Zellbestandteile durch Salzfällung und Filtration entfernt und die DNA mittels Silica-Membranen aufgereinigt und aufkonzentriert (QIAGEN DNeasy Plant Handbook 2006). Um das Pflanzenmaterial mechanisch zu zerkleinern, wurden 20mg Knospen- oder 20mg Kambiumgewebe je Probe in einem 2ml EppendorfTube™ mit Hilfe zweier darin bereits enthaltenen Stahlkugeln in einer Labormühle geschreddert. Die äußeren, braunen Knospenschuppen wurden vorher mit Pinzette und Skalpell entfernt, doch vor allem das Kambiumgewebe musste für die optimale Verarbeitung mithilfe des Skalpells in sehr feine Streifen zerteilt werden. Die feingemahlene Probe wurde anschließend in einer Pufferlösung mit beigefügter *RNAse A* inkubiert, welche die Zellauflösung und den Verdau der RNA herbeiführte. Im nächsten Schritt wurden Polysaccharide und Proteine durch Aussalzen ausgefällt und gemeinsam mit anderen Zellteilen durch Zentrifugation entfernt. Die Zugabe eines Bindepuffers und Ethanol förderte die Anlagerung der DNA an die Silica-Membran. In den zwei darauffolgenden Waschschrritten wurden auch letzte Kontaminationen entfernt und die aufgereinigte DNA zu guter Letzt mit einem salzhaltigen Puffer von der Membran eluiert (QIAGEN DNeasy Plant Handbook 2006).

Adaptiertes DNA-Extraktionsprotokoll nach QIAGEN (2016) siehe Anhang A.

Im Anschluss an die Extraktion wurden die Konzentration (ng/μl) und Reinheit (optische Dichte OD) jedes Samples mit einem Spektrophotometer (NanoPhotometer®, Firma: Implen)

gemessen. Dafür wurde das Absorptionsvermögen aller Nukleotide (hier nur DNA, weil RNA bei diesem Kit enzymatisch entfernt wurde) bei 260nm (A260) und bei 280nm (A280) Wellenlänge gemessen. Ein akkurates Ergebnis sollte zwischen 0,1 und 1 fallen und die Verdünnung der Proben dementsprechend angepasst werden. Ein Absorptionsvermögen von 1 bei 260nm entspricht 50µg DNA per Milliliter ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$). Die Reinheit einer Probe wird anhand des Verhältnisses des Absorptionsvermögens von A260 zu A280 gemessen. Reine DNA besitzt ein Verhältnis von 1,7 – 1,9 (QIAGEN DNeasy Plant Handbook 2006). Die Proben hatten eine durchschnittliche Konzentration von 44ng/µl. Vor allem die Kambium Samples hatten eine sehr niedrige Konzentration von <10ng/µl und wurden deshalb unverdünnt für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (siehe Anhang B.1).

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in-vitro-Amplifikation (Vermehrung) spezifischer DNA-Fragmente (MÜLLER 2016, MULLIS 1994, RABINOW 1996). Dazu braucht es folgende Elemente:

- die zu untersuchenden DNA-Abschnitte (die so genannte *Template-DNA*)
- synthetische, möglichst spezifische *Primer* mit bekannter Sequenz (Oligonukleotide mit einer Länge von ~18 bis 30 Basen) als Andockstellen für die Polymerase. Die Spezifität ist wichtig, damit die Primer für das gewünschte Amplifikationsprodukt ausschließlich an der richtigen Stelle amplifizieren (MÜLHARDT 2009)
- eine *Polymerase* (klassisch ist die *Taq*-Polymerase, ein hitzebeständiges Enzym, das aus dem in Geysiren lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde). Sie katalysiert die Synthese eines komplementären DNA-Strangs ausgehend von den sich anlagernden Primern (MÜLHARDT 2009)
- eine Pufferlösung, welche die nötigen Basen, die Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) als Grundbausteine der DNA, sowie Tris-HCL und KCl enthält und der *Taq*-Polymerase ein geeignetes pH-Milieu schafft (MÜLLER 2016, MULLIS 1994, RABINOW 1996)
- Magnesiumchlorid (MgCl_2) für die Aktivität der Polymerase (MÜLHARDT 2009)
- einen Thermocycler, der für die einzelnen Schritte die jeweils erforderlichen Temperaturen erzeugt (MINOL 2021)

In den nacheinander folgenden Aufheizungs- und Abkühlungsphasen werden die Template-DNA-Doppelstränge aufgespalten (*Denaturierung*), die Primer an beiden Enden der einfachen DNA angelagert (*Primerhybridisierung*, oder *Primeranlagerung*, Engl.: *primer annealing*) und

so die DNA-Einzelstränge in Anwesenheit der dNTPs und der Polymerase komplementiert (*Elongation*). Durch erneutes Aufheizen werden diese neu gebildeten Doppelstränge ebenfalls in Einzelstränge zerlegt und der Replikationsprozess beginnt von vorne. In der Regel wird dieser Zyklus 20-40-mal wiederholt (NEWTON und GRAHAM 1994).

Es wurde eine Multiplex-PCR angewendet, bei der mehrere Primerpaare in einem Reaktionsansatz eingesetzt werden und so mehrere PCRs simultan mit einer zu untersuchenden Probe durchgeführt werden können (MÜLLER 2016, MULLIS 1994, RABINOW 1996). Da sich der Nachweis einzelner DNA-Fragmente mit steigender Zahl an Primerpaaren immer schwieriger gestaltet, wurden fluoreszierende Primer verwendet, die eine eindeutige Zuordnung der PCR-Produkte im Sequenzierer ermöglichen (MÜLHARDT 2009).

Die Multiplex-PCR wurde einerseits mit 15 Primerpaaren zur Untersuchung von 15 Kern-DNA-Mikrosatellitenorten für die (1) Artidentifizierung und interspezifische Differenzierung sowie (2) innerartliche genetische Struktur durchgeführt. Andererseits wurde eine PCR mit 10 Primerpaaren zur Analyse von 10 Chloroplasten-DNA-Mikrosatellitenorten für die (3) Bestimmung der refugialen Herkünfte der Bestände angewendet. Die Primer der nuklearen Kombination sowie der Chloroplasten-Kombination sind detailliert in Tabelle 3 und Tabelle 4 beschrieben. Für die PCR wurden die DNA-Proben aus dem Kamptal (*Plank, Altenhof, Diendorf* und *Schönberg*) 1:1 verdünnt (10µl DNA + 10µl destilliertes Wasser (dH₂O)), bis auf einige wenige (Kambiumgewebs)proben, die aufgrund ihrer niedrigkonzentrierten DNA unverdünnt für die PCR verwendet wurden (20µl DNA) (siehe Anhang B.1). Die DNA der Referenzproben war bereits in einer 1:10 Verdünnung vorhanden. Verwendet wurde ein Multiplex Kit des Herstellers QIAGEN (Type-it® Microsatellite PCR Kit (200)). Es enthielt einen PCR-Mastermix, dem nur mehr der Primer-Mix, PCR-H₂O und die Template-DNA beigefügt werden mussten. Die PCRs wurden mit dem Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurde für die nukleare Primer-Kombination eine touchdown-PCR (TD-PCR, Gradienten-PCR, Annealing-Temperaturen 58°C-55°C, siehe Anhang B.2) angewendet. Bei dieser Form der PCR werden die Primerpaare durch hohe Annealing-Temperaturen in den ersten Zyklen der Synthese sehr spezifisch an das Template gebunden. Dann wird diese Temperatur schrittweise gesenkt, die Primer binden weniger spezifisch, aber es sind bereits mehr spezifische Template-Moleküle im Ansatz vorhanden. Dadurch wird die Menge der unspezifischen PCR-Produkte erheblich reduziert (DON et al. 1991). Bei der Chloroplasten-Kombination hingegen wurde das PCR-Programm „Normal 52“ (Annealing-Temperatur von 52°C) verwendet (siehe Anhang B.2).

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten nuklearen Mikrosatellitenmarker, ihre minimalen und maximalen Fragmentlängen (bp) sowie die Fluoreszenzmarkierung der Primer

Marker- ID	Primersequenzen forward primer reverse primer	min. – max. Fragmentlängen (bp)	Floureszenz- farbstoff	Citation
QrZAG112*	TTCTTGCTTTGGTGCGCG GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC	69 - 137	FAM	Kampfer et al. (1998)
PIE227	TACCATGATCTGGGAAGCAAC AAGGGCTTGGTTGGGTTAGT	153 – 178	FAM	Durand et al. (2010)
PIE215	TACGAAATGGAGCTGTTGACC TCTCCTTCTCTCTGCCATGA	191 - 215	FAM	Durand et al. (2010)
QrZAG11	CCTTGAACCTCGAAGGTGTCC TGGTTGACTAAAGTATGAACTGTTTG	241 - 310	FAM	Kampfer et al. (1998)
QrZAG96	CCCAGTCACATCCACTACTGTCC GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	140 - 192	HEX	Kampfer et al. (1998)
GOT021	AGAAAAGTTCCAGGGAAAGCA CTTCGTCCCCAGTTGAATGT	95 - 101	Atto550	Durand et al. (2010)
FIR053	AGTTTCCCCACATTTGTTGC TACCATGCACCAAGCAATTC	136 - 150	Atto550	Durand et al. (2010)
QpZAG104	ATAGGGAGTGAGGACTGAATG GATGGTACAGTAGCAACATTC	179 - 255	Atto550	Steinkellner et al. (1997a)
GOT004	GGGCATATTGATCGCTTAGG TGAGCATTACATATCCATGAT	264 - 294	Atto550	Durand et al. (2010)
QpZAG15	CGATTTGATAATGACACTATGG CATCGACTCATTGTTAAGCAC	104 - 155	FAM	Steinkellner et al. (1997a)
PIE099	GGCTACCGACTACTACCACTTC CGGTGGACCCAATATGTAAC	178 - 202	FAM	Durand et al. (2010)
GOT009	CACCTACTAAGCAACCTGTCA TTTTGGAGGCGGAGATAATG	221 - 249	FAM	Durand et al. (2010)
WAG065	TCAGCACCTGTGAACATTC GTCCCTCCCTTTCAGAGTCC	268 - 280	FAM	Durand et al. (2010)
FIR039	GAGCCTCTTTCATCGCTCAC TCAACACCCCAAACTCCAT	111 - 132	HEX	Durand et al. (2010)
quru-GA-1F02	CCAATCCACCTTCCAAGTTCC TGGTTGTTTTGCTTTATTCAGCC	166 - 184	HEX	Aldrich et al. (2002)

* Bei den Primern in fettgedruckter Schrift handelt es sich um etablierte Mikrosatellitenloci der Stieleiche.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chloroplasten-Mikrosatellitenmarker, ihre minimalen und maximalen Fragmentlängen (bp) sowie die Fluoreszenzmarkierung der Primer

Marker- ID	Primersequenzen forward primer reverse primer	min. – max. Fragmentlängen (bp)	Floureszenz- farbstoff	Citation
μ dt1	ATCTTACACTAAGCTCGGA TTCAATAACTTGTGATCCC	84 - 87	FAM	Deguilloux et al. (2003)
ccmp6	CGATGCATATGTAGAAAGCC CATTACGTGCGACTATCTCC	101 - 102	FAM	Weising und Gardner (1999)
μ kk4	TTGTTTACCTATAATTGGAGC TAGCGGATCGGTTCAAAACTT	113 - 114	FAM	Deguilloux et al. (2003)
μ dt4	GATAATATAAAGAGTCAAAT CCGAAAGGTCCTATACCTCG	145 - 146	FAM	Deguilloux et al. (2003)
μ cd5	CCCCGGATCTCTGTCAACTG TAATAAACGAGAATCACATAA	77 - 79	HEX	Deguilloux et al. (2003)
μ kk3	TTAGATCGGGTAATCGTTCAA AAGTGAATAAATGGATAGAGC	102 - 103	HEX	Deguilloux et al. (2003)
ccmp2	GATCCCGGACGTAATCCTG ATCGTACCGAGGGGTTCGAAT	226 - 228	HEX	Weising und Gardner (1999)
μ cd4	TTATTTGTTTTTGGTTTCACC TTTCCCATAGAGAGTCTGTAT	97 - 99	Atto550	Deguilloux et al. (2003)
ccmp10	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	110 - 111	Atto550	Weising und Gardner (1999)
μ dt3	TGTTAGTAATCCTTTCGTTT AGGTATAAAGTCTAAGGTAA	121 - 123	Atto550	Deguilloux et al. (2003)

Die für diese Arbeit verwendeten nuklearen Primer *PIE227*, *PIE215* nach DURAND et al. (2010), sowie *QrZAG112*, *QrZAG11*, *QrZAG96* nach KAMPFER et al. (1998) wurden in der Stieleiche entwickelt. Die Primer *QpZAG104*, *QpZAG15* wurden in der Traubeneiche entwickelt (STEINKELLNER et al. 1997a), es stellte sich jedoch heraus, dass sie 1:1 auf die Stieleiche übertragbar sind (STEINKELLNER et al. 1997b). Die fettgedruckten Primer wurden in Studien von NEOPHYTOU et al. (2010), GUICHOUX et al. (2011b), NEOPHYTOU (2014) sowie RELLSTAB et al. (2016) erfolgreich angewendet und gelten als sehr gut funktionierende, etablierte Mikrosatellitenloci der Stieleiche. Die Primer *GOT021*, *FIR053*, *GOT004*, *PIE099*, *GOT009*, *WAG065*, *FIR039* nach DURAND et al. (2010), als auch *quru-GA-1F02* nach ALDRICH et al. (2002) wurden in populationsgenetischen Studien in der Rot-Eiche erfolgreich verwendet (NEOPHYTOU und KONNERT 2018, Tabelle 3, S. 123) und funktionieren ebenfalls gut in der Stieleiche, wie vorläufige Versuche im molekulargenetischen Labor des Waldbauinstituts zeigten.

Für die Chloroplasten-Kombination wurden die universellen Primer $\mu dt1$, $\mu kk4$, $\mu dt4$, $\mu cd5$, $\mu kk3$ und $\mu cd4$ nach DEGUILLOUX et al. (2003) sowie *ccmp2*, *ccmp6* und *ccmp10* nach WEISING und GARDNER (1999) verwendet. In einigen Testläufen wurde das PCR-Protokoll für die Chloroplasten-Kombination optimiert und die Primer $\mu dt4$ und *ccmp2* doppelt konzentriert eingesetzt, da in der einfachen Konzentration keine PCR-Produkte hergestellt werden konnten (siehe Anhang B.2, Tabelle B.2.5).

3.2.3 Mikrosatelliten

Genmarker sind erkenn- und messbare Merkmale des Genoms. Sie detektieren Variationen bestimmter Genorte, indem sie qualitativ die An- oder Abwesenheit bestimmter Allele indizieren oder quantitativ indem der Marker auf variierenden Levels exprimiert.

Mikrosatellitenmarker im Speziellen gehören zur Gruppe der molekularen Marker, die auf einer direkten Betrachtung von Längen- oder Sequenzunterschieden der DNA basieren (LOWE et al. 2004). Die „Simple Sequence Repeats“ (SSRs), wie sie auch genannt werden, sind kurze Tandemwiederholungen der DNA (z.B. (AC)_n oder (AGAT)_n) in der Länge von 1-6 Basenpaaren (bp), die einen bedeutenden Anteil des nichtkodierenden Genoms umfassen (AVVARU et al. 2020). So variiert die Länge eines Mikrosatellitenlocus zwischen 5 und 40 Wiederholungen, aber auch längere Ketten sind möglich (SELKOE und TOONEN 2006). Diese einfachen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen sind gleichmäßig über die Chromosomen verteilt und finden sich sowohl bei Eukaryoten (in der nuklearen, mitochondrialen sowie Chloroplasten-DNA) als auch bei Prokaryoten, wobei neuere Studien zeigten, dass die

Verteilung der Mikrosatelliten bei Eukaryoten nicht zufällig ist (BHARGAVA und FUENTES 2010, AVVARU et al. 2020). Die den Mikrosatellitenlocus flankierenden DNA-Sequenzen sind für gewöhnlich konserviert, d.h. sie sind ident bei Individuen derselben Art und manchmal auch bei Individuen verschiedener Arten. Sogenannte Oligonukleotide oder Primer, sind eigens konstruierte, kurze DNA-Abschnitte, die an die flankierenden Sequenzen des Mikrosatelliten andocken und dessen Amplifikation im Rahmen der PCR anleiten (SELKOE und TOONEN 2006). Im Gegensatz zu den Flankenregionen weisen Mikrosatelliten hohe Mutationsraten auf (vorzugsweise mit Verlängerung ihrer Sequenz), die den hohen Grad allelischer Diversität begründen (AVVUARA et al. 2020, SELKOE und TOONEN 2006). Diese Eigenschaft macht Mikrosatelliten zu wertvollen Markern und sehr beliebtem Werkzeug zur Untersuchung von populationsgenetischen Strukturen. Allel-Polymorphismen an Mikrosatellitengenorten wirken sich grundsätzlich nicht negativ auf die reproduktive Fitness und Anpassungsfähigkeit eines Individuums aus, deshalb gelten SSR-Mikrosatelliten als selektionsneutral und eignen sich besonders gut, um demographische Muster in Raum und Zeit und ihre zugrunde liegenden Prozesse zu beschreiben (SELKOE und TOONEN 2006). Neueste Studien weisen jedoch auf eine Reihe von funktionalen Rollen der Mikrosatelliten-DNA hin z.B. bei der Regulierung der Genaktivität und der Rekombination als auch in der Epigenetik und zeigen, dass Mikrosatelliten selbst unter dem Einfluss von Selektion stehen können (HANNAN 2012). So führt beispielsweise das Variieren der Mikrosatellitenlänge, besonders die Ausweitung, in für Protein kodierenden Regionen der DNA zu neurodegenerativen Krankheiten beim Menschen (SELKOE und TOONEN 2006, AVVARU et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit kamen Mikrosatelliten aus selektiv neutralen Genombereichen zum Einsatz (siehe z.B. ALDRICH et al. 2002, STEINKELLNER et al. 1997a), hauptsächlich aber aus exprimierenden Genombereichen, den sogenannten „Expressed Sequence Tags (ESTs) – derived Microsatellites“ (siehe DURAND et al. 2010). Die ESTs werden für Untersuchungen der genetischen Diversität, Assoziationsstudien und vergleichende Genomik eingesetzt, welche kombiniert Aufschluss über die Anpassung von Forstbäumen geben (DURAND et al. 2010). Die auch als „funktionale Marker“ bezeichneten ESTs sind deshalb besonders wertvoll, weil sie in der Lage sind, die anpassungsrelevante genetische Vielfalt durch Variationen in den betreffenden Genen direkt zu überprüfen (DURAND et al. 2010). Ein weiterer Vorteil von Mikrosatelliten ist, dass sie kodominante, aussagekräftige Single-Locus Marker sind, mit denen mehrere Genorte gleichzeitig, schnell und vergleichsweise kostengünstig im Genotypisierungsprozess repliziert und untersucht werden können (SELKOE und TOONEN 2006, GUICHOUX et al. 2011a).

2.3.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen und um ihre Größe durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe, der sogenannten DNA-Leiter, zu bestimmen. Agarosegele werden verwendet, wenn man große Poren für die Analyse von Molekülen über 10nm Durchmesser benötigt. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Sie wird durch Aufkochen in der Pufferlösung gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei bilden sich Doppelhelices aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden, dem Gel, zusammenlagern und als Sieb für die Moleküle funktionieren. Je höher die Konzentration der Agarose, desto kleiner sind die Poren des Gels. So werden Porengrößen von 150nm bis 500nm durch 1% (w/v) bzw. 0,16% (w/v) Agarose erzielt (JANSOHN und ROTHÄMEL 2012). Es wird ein elektrisches Feld angelegt, sodass die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle unter neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen durch die Gelmatrix in Richtung Anode wandern. Dabei können sich kleinere Fragmente mit geringerem Molekulargewicht schneller durch das Gel bewegen als höher gewichtige, längere Fragmente, wodurch die Auftrennung der DNA-Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird (ADKINS und BURMEISTER 1996). Für die Herstellung der Gele wurde die Agarose (Agarose, universal der Firma *VWR Life Science*) in 1x TBE-Elektrophoresepuffer (1:10 Verdünnung, Fa. *Carl Roth*) in der Mikrowelle aufgekocht. Für DNA-Proben wurden 1%ige Gele hergestellt (1g Agarose auf 100ml TBE), für PCR-Produkte 1,5%ige Gele (1,5g Agarose auf 100ml TBE). In das heiße Gemisch wurden 2µl GelRed® (Nucleic Acid Stain, 10,000X in Water der Firma *BIOTIUM*) pro 100ml TBE gegeben, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Dieses Gemisch wurde vorsichtig auf einen Gelschlitten gegossen. Durch vorher hineingesteckte Käbme im Gelschlitten blieben nach Erstarren des Gels sogenannte Geltaschen erhalten. Das festgewordene Gel wurde in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreskammer gegeben und noch einmal mit Puffer begossen, sodass es gut mit Puffer bedeckt war. Anschließend wurde die DNA mit 2µl Loading Dye (6X TriTrack DNA Loading Dye, Fa. *AppliedBiosystems by Thermo Fisher Scientific*) versetzt, um die Proben durch die erhöhte Dichte und die grüne Färbung exakt in die Geltaschen pipettieren zu können. Von den DNA-Eluaten wurden je 10µl, von den PCR-Produkten nur je 5µl mit 2µl Loading Dye vermischt. Zu guter Letzt wurden dem Gel 10µl der weiter oben bereits erwähnten DNA-Leiter (100 bp-DNA-Leiter, extended der Fa. *Carl Roth*) hinzugefügt. Der Marker für den Fragmentbereich zwischen 100 und 1000 Basenpaaren (bp) wurde in einer Konzentration von 0,1µg/µl hinzugegeben und ermöglichte die spätere Größenbestimmung der DNA-Fragmentstücke. Die Elektrophoreskammer wurde mit einem Deckel verschlossen, je nach Gelgröße eine Spannung

von 120-290 Volt zu 80-220mA angelegt und das Gel für eine bis maximal zwei Stunden laufen gelassen. Nach dem fertigen Run wurde das Gel in ein Imaging-System (Fa. BIORAD) unter UV-Licht gelegt und das Ergebnis fotografisch festgehalten. So konnte mithilfe der Gelelektrophorese überprüft werden, ob die DNA-Extraktion und PCR-Reaktionen erfolgreich abgelaufen waren (siehe Abbildung 2).

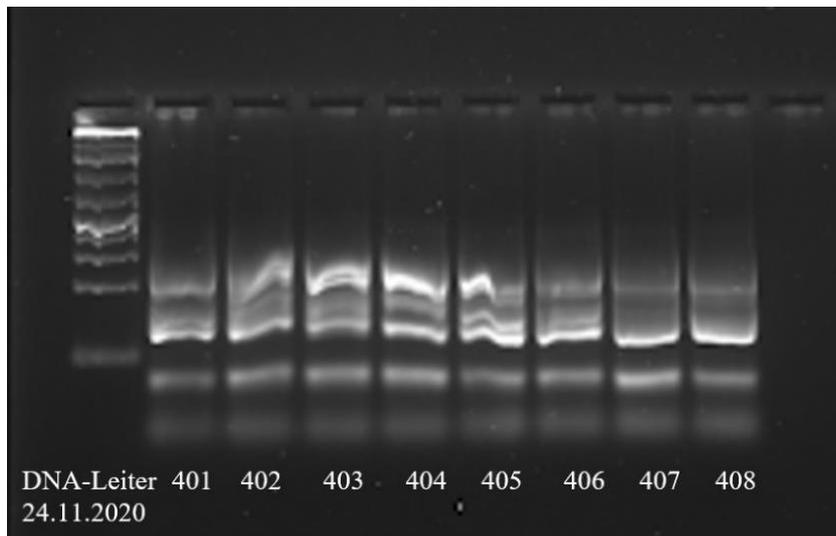


Abbildung 2: PCR-Produkte der nuklearen Primer-Kombination einer Multiplex-PCR auf 1,5%igem Agarose Gel (Laufrichtung von oben nach unten). Die PCR wurde als touchdown-PCR (Annealing-Temperaturen 58°C-55°C) in einer 1:30 Verdünnung der DNA-Eluate (26 -86 ng/μl) durchgeführt. Das Gel lief bei 120V und 80mA 60 Minuten lang. Mehrere Banden bedeuten, dass diese Proben mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge enthalten. Die DNA-Leiter (*Carl Roth* 100 bp-DNA-Leiter, extended) links zeigt 10 Fragmente von 100 bp – 1000 bp und die Fragmentlänge 1500 bp an.

3.2.5 Genotypisierung

3.2.5.1 Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentlängenanalyse findet in der Molekularbiologie breite Anwendung u.a. bei der Untersuchung des genetischen Fingerabdrucks, der Detektion von Mutationen, der Erstellung von Genkarten, bei Kopplungsanalysen (Linkage Analysis) oder bei der Genotypisierung APPLIED BIOSYSTEMS (2019). Für diese Arbeit wurde der Sequenzierer *SeqStudio Genetic Analyzer* von *AppliedBiosystems* by *Thermo Fisher Scientific* verwendet, um die Allellänge der amplifizierten Mikrosatellitengenorte für jedes Individuum zu bestimmen. Dieser Sequenzierer enthält vier Kapillare, in denen vier Proben in einem Lauf gleichzeitig analysiert werden können (APPLIED BIOSYSTEMS 2019). Das Anwendungsprinzip entspricht dem der Elektrophorese (siehe Kapitel 3.2.4). Hierbei erfolgt die Visualisierung und Detektion der einzelnen Fragmente durch die Zugabe von *GelRed*, einem fluoreszierenden Nukleinsäuren-Gel-Färbemittel, das nach der Elektrophorese in einem Imaging-System unter UV-Einstrahlung sichtbar wird. Bei

der Kapillarelektrophorese funktioniert dieser Schritt hingegen automatisch und die Trennung der Fragmente erfolgt mit einer weit höheren Auflösung und Genauigkeit (THERMO FISHER SCIENTIFIC 2015). Die bei der Multiplex-PCR durch die Primer mit fluoreszierendem Farbstoff markierten PCR-Produkte werden zusammen mit einem Größenstandard (GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard, Fa. *AppliedBiosystems*) elektrokinetisch in die Kapillaren injiziert. Der Größenstandard besteht aus DNA-Fragmenten bekannter Größe sowie einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich farblich von den unbekanntem DNA-Stränge unterscheidet (THERMO FISHER SCIENTIFIC 2012). Während der Elektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Anlegen einer großen Spannung zwischen den Elektroden von der Kathode durch eine Kapillare, die mit einer Polymer-Matrix gefüllt ist, zur positiv geladenen Anode (THERMO FISHER SCIENTIFIC 2015). Die Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 20-100µm besitzen im Vergleich zum Gelvolumen eine sehr große Oberfläche. So kann die bei der Elektrophorese entstehende Wärme schnell abgeführt werden und es können Spannungen von bis zu 800 V/cm angelegt werden, ohne das Polymergel zu überhitzen, während bei Standard-Agarosegelen maximal 10 – 40 V/cm möglich sind. Dadurch werden die Laufzeiten eines solchen Gels auf Minuten reduziert und es lassen sich fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente in geringsten Mengen detektieren (MÜHLHARDT 2009). Wie bei der Multiplex-PCR ist es mittels Fragmentlängenanalyse möglich, mehrere verschiedene DNA-Fragmente in einer einzigen Kapillare laufen zu lassen. Aus diesem Grund wurden für die verwendeten Primer i) drei verschiedene Farben und ii) keine überlappenden Allellängenbereiche innerhalb einer Farbe ausgewählt (siehe Tabellen 3 und 4). Kurz vor der positiven Anode passieren die nach Größe getrennten DNA-Fragmente einen Laser-Detektor. Der Laserstrahl regt die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente an, bei (farblich) unterschiedlichen Emissionswellenlängen zu fluoreszieren. Eine CCD (Charge Coupled Device) - Kamera detektiert die Fluoreszenz, die Fluoreszenzintensitäten werden digitalisiert und farblich gekennzeichnet und als Kurven („Peaks“) in einem Elektropherogramm dargestellt. Die Länge der einzelnen Fragmente ergibt sich aus deren Laufzeit bis zum Laser-Detektor und dem Abgleich der Laufzeit des Größenstandards (THERMO FISHER SCIENTIFIC 2012).

Vor der Fragmentlängenanalyse wurden die PCR-Produkte sowohl der nuklearen Kombination als auch der Chloroplasten-DNA 1:30 verdünnt (1µl PCR-Produkt + 29µl PCR H₂O). Zusätzlich wurde ein sogenannter HIDI-Mix hergestellt: für jede Probe wurden (inklusive ~10% Reserve) 10µl HIDI™ Formamid (*AppliedBiosystems*) und 0,25µl ROX™ interner Größenstandard berechnet und gemischt. Anschließend wurden 10µl des HIDI-Mix und 1µl

von den verdünnten PCR-Produkten in die Sequenzierplatten pipettiert, gevortext und so zur Analyse in den Sequenzierer gegeben. Für jede Probe und alle Fluoreszenzfarbstoffe wurden Elektropherogramme im Sequenzierer erzeugt (siehe Abbildung 3).

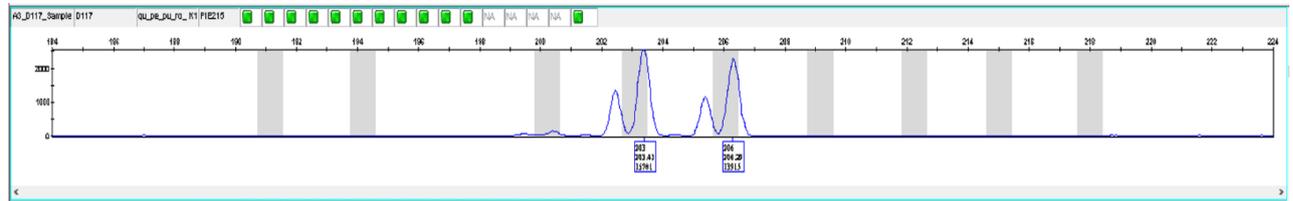


Abbildung 3: Elektropherogramm eines heterozygoten Genotypen am nuklearen Mikrosatellitenlocus *PIE215* (DURAND et al. 2010) mit den Allelen 203 und 206. Die (manuell) festgelegten Bins mit einer Breite von i.d.R. 0,8 bp werden als graue Balken dargestellt. Die Abbildung wurde der Software GeneMapper® Software 6 (*AppliedBiosystems*) entnommen.

3.2.5.2 Bestimmung der Allele mittels GeneMapper

Die Auswertung der bei der Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese erzeugten Elektropherogramme erfolgte mit der Software GeneMapper® Software 6 der Firma *AppliedBiosystems*. Dafür wurde in GeneMapper ein sogenanntes Panel erstellt, welches die Fluoreszenzfarbstoffe und erwarteten Fragmentlängen der verwendeten Primer und Loci enthielt. Mithilfe dieser Daten wurden die in einer Probe detektierten Fragmente den jeweiligen Primern zugeordnet und für jede Probe die Emissionsintensität (= Peaks) über den Fragmentlängenbereich an den einzelnen Genorten dargestellt. Zum Ermitteln der Allele wurden eindeutige Peaks herangezogen und anhand dieser für jeden Locus und jede Probe manuell sogenannte „Bins“ gesetzt. Beim Setzen der Bins wurden also Bereiche von Fragmentlängen bestimmt, in denen die vorkommenden Fragmentlängen einem Allel zugeordnet wurden. Aufgrund der Arbeit von MALASPINA (2020), in der dieselbe nukleare Primer-Kombination in der Stieleiche getestet und verwendet wurde, konnten sämtliche der dort bereits gesetzten Bins übernommen werden. Die Übrigen wurden für jeden Marker manuell angepasst. Ein Algorithmus in der GeneMapper-Software sucht automatisch alle Peaks, die als Allel in Frage kommen könnten und ordnet sie dem dazugehörigen Bin zu (APPLIED BIOSYSTEMS 2005). Diese automatische Bestimmung der Allele und Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Bins wurde für jede Probe an jedem Locus manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Jene Peaks, die nicht automatisch als Allele den Bins zugeordnet werden konnten, wurden manuell benannt und den entsprechenden Bins zugeordnet. Falsch erkannte Allele oder Heterozygote mit mehr als zwei Allele an einem Genort wurden manuell entfernt.

In den folgenden Kapiteln werden die Methoden zur Auswertung der Rohdaten detailliert erklärt. Die Auswertung basiert auf den für diese Arbeit selbstständig gewonnenen Daten der Proben aus dem Kamptal, Niederösterreich sowie auf drei mitteleuropäischen Referenzpopulationen der Stieleiche, Traubeneiche und Flaumeiche aus dem Oberrhein, Deutschland. Sowohl die PCRs, als auch die Fragmentlängenanalyse wurden mit den Referenzproben in Wien erneut durchgeführt, um identische Versuchsbedingungen für die Auswertung der populationsgenetischen Daten zu schaffen.

3.2.6 Artkennung und innerartliche Strukturierung der untersuchten Individuen anhand von Referenzproben mithilfe von STRUCTURE

3.2.6.1 Artkennung

Um die Artidentität jedes Individuums anzusprechen, wurde basierend auf den genotypischen Daten aus den Kernmikrosatelliten (gSSRs und EST-SSRs), eine Bayesische Clusteranalyse mithilfe der Software STRUCTURE v. 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000a, FALUSH et al. 2003a) durchgeführt. In dieser Analyse wurden die Eichen aus dem Kamptal gemeinsam mit Referenzproben der Stiel-, Trauben- und Flaumeiche aus dem Oberrhein untersucht (siehe NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Anhand dieser Methode wird die nichtpanmiktische Grundgesamtheit so in eine vordefinierte Anzahl an K Subpopulationen (*Cluster*) zerlegt, dass das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in diesen Subpopulationen näherungsweise erfüllt wird. Dabei ist eine Subpopulation charakterisiert als ein Set an auftretenden Allelhäufigkeiten an jedem (nicht gekoppelten) untersuchten Locus (PRITCHARD et al. 2000a, FALUSH et al. 2003a). Da Individuen einer Art in Paarungskontakt stehen, wird angenommen, dass diese Cluster den Arten entsprechen, daher ist K gleich die Anzahl der Arten. Anschließend wird für jedes Individuum seinem Genotypen entsprechend ein sogenannter *Koeffizient der Zugehörigkeit* (q) zu jedem Cluster ermittelt (NEOPHYTOU 2015). Zur Identifikation der Subpopulationen und für die Zuteilung der Individuen zu den Subpopulationen wird ein *Markov-Chain-Monte-Carlo* (MCMC) Algorithmus angewendet (PRITCHARD et al. 2000a, FALUSH et al. 2003a). Als Schwellenwert für die Charakterisierung von ‚reinen‘ Individuen wurde $q = 0,875$ festgelegt und Individuen mit niedrigeren Werten als potenzielle Hybriden bezeichnet. Der q -Wert wurde in der Annahme gewählt, nach der Hybride der ersten Generation (F1-Hybride) einen Zugehörigkeitskoeffizienten von 0,5 zum Vater- und zum Mutterbaum besitzen und Rückkreuzungen q -Werte von 0,75 bzw. 0,25. Deshalb weisen F1-Hybride erwartungsgemäß q -Werte zwischen 0,375 - 0,625 auf, Rückkreuzungen q -Werte zwischen 0,625–0,875 und ‚artenreine‘ Individuen über 0,875 (NEOPHYTOU 2014). Ein Schwellenwert

von 0,875 wurde auch in den Studien von GUICHOUX et al. (2013) oder BOHLING et al. (2013) zur Unterscheidung von artenreinen Bäumen mittels Bayesischer Clusteranalyse verwendet (siehe BOHLING et al. 2013, GUICHOUX et al. 2013)

3.2.6.2 Innerartliche Strukturierung mit Hilfe von STRUCTURE

Das Programm STRUCTURE wurde ebenso zur Ermittlung der innerartlichen genetischen Strukturierung der Stieleichen Bestände angewandt. Dafür wurden alle Individuen der vier Kamptaler Populationen, die $q > 0,875$ aufwiesen, dem Stieleichen-Cluster zugeordnet und gemeinsam mit der Stieleichen-Referenzpopulation aus dem Oberrhein in einer zweiten hierarchischen Ebene analysiert, während in der dritten hierarchischen Ebene ausschließlich die Kamptaler Populationen auf ihre genetischen Strukturen hin untersucht wurden. Demselben Prinzip wie oben folgend wurden die Populationen innerartlich in K hypothetische Subpopulationen unterteilt und den Individuen wurden Werte der Zugehörigkeit zu jedem Cluster zugeordnet. Diesbezüglich war die Anzahl der K Subpopulationen (Cluster) jedoch unbekannt und es wurden K -Werte zwischen $K = 1$ und 10 gewählt. Für alle Analysen (Artkennung sowie innerartliche genetische Strukturierung) wurde das „admixture model“ mit korrelierten Allelhäufigkeiten verwendet, welches die anteilige Zuordnung von Individuen zu mehreren Subpopulationen erlaubt. Für jeden K -Wert (K zwischen 1 und 10) wurden 10 Programmläufe mit 50.000 MCMC Iterationen und einer empfohlenen „Burn-in“ Periode von 100.000 ausgeführt.

Die Ergebnisse aus STRUCTURE wurden im nachfolgenden Schritt mit dem webbasierten *Python* Programm STRUCTURE HARVESTER (EARL und VON HOLDT 2012) aufbereitet. STRUCTURE HARVESTER kann die wahrscheinlichste Anzahl an K Subpopulationen durch die Auswertung der posterioren Wahrscheinlichkeit der Daten - $\ln P(D)$ – sowie mithilfe der Statistik ΔK nach EVANNO et al. (2005) benutzerfreundlich und schnell berechnen und graphisch darstellen. Außerdem werden die Ergebnisse für die weitere Verarbeitung z.B. mit der Visualisierungssoftware CLUMPAK (KOPELMAN et al. 2015) formatiert.

„Das erste Erreichen eines Plateaus von $\ln P(D)$ -Werten (*data likelihood probability* der STRUCTURE-Läufe) für einen gewissen K -Wert weist auf die Anzahl der Subpopulationen hin. Auf der Veränderung der $\ln P(D)$ -Werte mit zunehmendem K basiert auch die Berechnung des ΔK -Wertes“ (NEOPHYTOU 2015). Dieser Parameter beschreibt die Veränderungsrate des natürlichen Logarithmus der Wahrscheinlichkeit $P(D)$ für eine beobachtete genetische Komposition. Die Maximierung von ΔK für einen gewissen K -Wert entspricht der hierarchisch höchsten Stufe der Unterteilung und deutet an, dass die Population in K Gruppen geteilt ist

(EVANNO et al. 2005). In bestimmten Fällen ist es sinnvoll, höhere K -Werte zu berücksichtigen, da diese oft weitere Informationen über das Strukturmuster in einer feineren Unterteilung liefern (NEOPHYTOU 2014).

Die Visualisierung der STRUCTURE Analyseergebnisse erfolgte mit dem online verfügbaren Programm CLUMPAK (Clustering Markov Packager Across K) (KOPELMAN et al. 2015) und wurde in Excel bezüglich Anordnung, Farbgebung und Beschriftung adaptiert (siehe Abbildung 4 in Kapitel 4.1 „Hierarchische Bayesische Clusteranalyse der 15 Kern-DNA Mikrosatellitengenorte mittels STRUCTURE (nach PRITCHARD et al. 2000a, FALUSH et al. 2003a)“).

3.2.7 Innerartliche Diversität und Differenzierung

3.2.7.1 Genetische Diversität innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatellitengenorte

Die genetische Diversität beschreibt und quantifiziert die Verteilung der genetischen Variation, welche innerhalb und zwischen Populationen vorliegt (WHITE et al. 2007).

Mithilfe molekularer Marker (z.B. SSRs) kann die genetische Variation auf dem Level individueller Genorte (bzw. Loci) und exakter als für quantitative Merkmale (Engl. *traits*) bewertet werden. Da jeder individuelle Baum mehrere tausend Gene besitzt, kann sein Genotyp durch ein bestimmtes Set an Marker Genen oder durch quantitative Merkmale jedoch nur zum Teil charakterisiert werden. Aus diesem Grund ist es wichtig zu bedenken, dass das Niveau und Muster der errechneten genetischer Variation von den spezifischen, für die Untersuchung ausgewählten Markern oder quantitativen Merkmalen abhängt und nur einen gewissen Ausschnitt vom Gesamtbild wiedergibt (WHITE et al. 2007). Sowohl die Anzahl als auch der Polymorphismus der in dieser Arbeit verwendeten Kern-Mikrosatelliten entsprechen jedoch den Standards populationsgenetischer Analysen.

Zur Berechnung der genetischen Variation der Kernmikrosatellitengenorte wurden die Programme *GenAlEx* Version 6.5 (PEAKALL und SMOUSE 2006, 2012) und *ADZE (Allelic Diversity Analyzer)* Version 1.0 (SZPIECH et al. 2008) verwendet. Folgende Parameter wurden mit GenAlEx untersucht:

Allelhäufigkeiten

- **Allelfrequenz (p_A):** darunter versteht man die relative Häufigkeit p eines Allels an einem Locus in einer Population. Sie wird anhand folgender Formel berechnet (PEAKALL und SMOUSE 2012a):

$$p_A = \frac{2N_{AA}}{2N} + \frac{N_{AB}}{2N}$$

N_{AA} = Anzahl der Homozygoten für das Allel A (AA)

N_{AB} = Anzahl der Heterozygoten, die das Allel A enthalten (B ist ein anderes Allel)

N = Anzahl der Individuen der untersuchten Population

- **Effektive Anzahl der Allele (A_e) als Maß genetischer Diversität:** Mit der Häufigkeit der einzelnen Allele gewichtete genetische Vielfalt. Dieses Maß beschreibt, wie die Allele eines Genortes in einer Population verteilt sind. Dabei erreicht die Diversität den höchsten Wert, wenn alle vorhandenen Allele die gleichen Häufigkeiten aufweisen und sich damit auch in gleichen Anteilen an der Reproduktion beteiligen können. Die effektive Anzahl der Allele entspricht der durchschnittlichen Anzahl der Allele pro Genort, wenn alle Allele gleich häufig auftreten, und sie nähert sich dem Wert 1, wenn ein Allel dominiert und die übrigen Allele selten sind. Die genetische Diversität wird berechnet als (HATTEMER et al. 1993):

$$A_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

P_i = die Häufigkeit des i -ten Allels von k Allelen an einem Locus

Heterozygotie und Hardy-Weinberg- Gleichgewicht (HWG)

- **Beobachtete Heterozygotie (H_o):** ist der Anteil an Genotypen in einer Population, die an einem Genort zwei verschiedenen Allele tragen, d.h. heterozygot sind. Demgegenüber bezeichnet der Heterozygotiegrad die Eigenschaft des Multilocus-Genotyps von Individuen, indem er den Anteil Genorte misst, an dem das Individuum heterozygot ist (ROTACH 2001). Der mittlere Heterozygotiegrad der Population wird berechnet, indem die individuellen Heterozygotiegrade über die untersuchten Individuen gemittelt werden und wird wie folgt berechnet (PEAKALL und SMOUSE 2012a):

$$H_o = \frac{N_{AB}}{N} \text{ bzw. } \overline{H_o} = \frac{\sum_{i=1}^k H_{oi}}{k}$$

N_{AB} = Anzahl beobachteter heterozygoter Genotypen an einem Locus

N = Anzahl der beprobten Individuen

$\overline{H_o}$ = die gemittelte beobachtete Heterozygotie in Population i mit k = Anzahl der Populationen

- **Unvoreingenommene erwartete Heterozygotie ($\overline{uH_e}$) innerhalb der Populationen (nach NEI 1978) und durchschnittliche erwartete Heterozygotie über die (Sub-) Populationen (H_s)**

Die $\overline{uH_e}$ ist die erwartete Heterozygotie basierend auf dem HWG aller untersuchten Genorte und gemittelt über alle (Sub)populationen (= H_s), in denen die Individuen weder verwandt noch durch Inzucht entstanden sind (= Engl. „unbiased“) (HARRIS und DEGIORGIO 2017). Sie ist das meist verbreitetste Maß zur Untersuchung genetischer Variation zwischen Populationen mit genetischen Markern (WHITE et al. 2007). Der durchschnittliche Anteil beobachteter Heterozygoten (H_o) könnte ebenfalls als Maß genetischer Vielfalt herangezogen werden, allerdings ist die Größe von $\overline{H_o}$ vom Grad der Inzucht (F_{IS}) abhängig, wohingegen die $\overline{uH_e}$ als Schätzwert von höherer Präzision und Richtigkeit gilt (WHITE et al. 2007, PRUETT und WINKLER 2008). Deshalb ist der unvoreingenommene H_e - Mittelwert über die Subpopulationen (= H_s) für den Vergleich genetischer Variation zwischen den Arten und in Populationen derselben Art, in denen das Paarungssystem differiert, nützlicher (WHITE et al. 2007) und besonders für Populationen mit hoher Diversität geeignet (PRUETT und WINKLER 2008). Sie wird folgendermaßen ermittelt (PEAKALL und SMOUSE 2012a):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^h p_{i,s}^2 \quad \overline{H_e} = \frac{\sum_{i=1}^k H_e}{k}$$

$$\overline{uH_e} = \frac{2N}{2N-1} \times \overline{H_e}$$

Wobei H_e die erwartete Heterozygotie in der Subpopulation s ist, und $p_{i,s}$ die Häufigkeit des i -ten Allels in Subpopulation s . Die Aufsummierung der quadrierten Allelfrequenz ist über alle i -ten Allele nach h die maximale Anzahl an Allelen. k = Anzahl der Populationen

- **Totale erwartete Heterozygotie H_T über den gesamten Genpool:**

H_T wiederum ist die erwartete Heterozygotie des gesamten Genpools und p_{Ti} die Häufigkeit des Allels i gemittelt über alle (Sub)populationen. Besitzen die Subpopulationen dieselbe Stichprobengröße, dann entspricht $p_{Ti} = p_i$, wobei p_i the Häufigkeit des Allels i gemittelt über die Subpopulationen gleicher Größe ist (PEAKALL und SMOUSE 2012a).

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^h p_{Ti}^2$$

- **Populationsspezifischer Inzuchtkoeffizient F_{IS} :** ist ein Maß für die Inzucht in einer Population, d.h. er gibt den Grad der Abweichung der Population von der Panmixie an. Dafür wird die Differenz zwischen unter HWG erwarteter Heterozygotie und beobachteter Heterozygotie errechnet und ins Verhältnis zur erwarteten Heterozygotie gesetzt. Ist der Wert positiv, so ist die beobachtete Heterozygotie kleiner als die erwartete Heterozygotie

und es wird von einem Homozygotenüberschuss gesprochen (LOWE et al. 2004). Er ergibt sich aus folgender Gleichung (PEAKALL und SMOUSE 2012a):

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Standardisierte Anzahl der Allele pro Population (Allelreichtum)

Mit dem Programm *ADZE* wird die allelische Diversität der Populationen untersucht. Zwei fundamentale Größen spielen hierbei eine Rolle: die Anzahl unterschiedlicher Allele an einem Genort in einer Population, der Allelreichtum, (Engl. „allelic richness“) sowie die Anzahl an sogenannten „privaten“ Allele der Population (die nicht in den anderen Populationen gefunden werden, Engl. „privat allelic richness“). Der Allelreichtum wird sowohl für jeden Genort in einer Population als auch über alle (gegebenen) Genorte jeder Population hinweg kalkuliert. Das Ergebnis ist schließlich die über alle Genorte hinweg gemittelte „Allelic Richness“ in jeder der untersuchten Populationen samt Varianz und Standardabweichung. Die beobachtete Anzahl an Allelen in einer Population hängt stark von der Stichprobengröße ab (GOUDET 2003). Deshalb kommt im Programm *ADZE* zur Berechnung der Diversität zwischen den Populationen die „rarefaction method“ zur Anwendung, um den Allelreichtum zu standardisieren, wobei Unterschiede in der Stichprobengröße bereinigt und vergleichbare Werte zwischen den einzelnen Populationen produziert werden (SZPIECH et al. 2008, exakte Berechnung siehe Anhang C).

3.2.7.2 Genetische Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatelliten

AMOVA

Die Analyse der Molekularen Varianz (AMOVA) dient der Untersuchung der populationsgenetischen Struktur einer oder mehrerer Populationen. Die Methode der AMOVA in *Arlequin* Version 3.5.2 beruht auf den Berechnungen von EXCOFFIER et al. (1992), WEIR und COCKERHAM (1984) sowie WEIR (1996). Dabei zerlegt die AMOVA, wie auch die ANOVA, die genetischen Varianz in ihre Komponenten: innerhalb und zwischen den Populationen. Um die AMOVA durchzuführen, müssen die zu untersuchenden Populationen im Vorfeld als Gruppen definiert werden, wodurch dem Programm *Arlequin* eine Struktur vorgegeben wird, welche dann getestet wird. Eine anschließende hierarchische Analyse der Varianz teilt die Gesamtvarianz σ^2 in Kovarianz Komponenten (σ^2_c , σ^2_b , σ^2_a) anhand von intraindividuellen Differenzen (σ^2_c), interindividuellen Differenzen (σ^2_b) und den Differenzen

zwischen den G Populationen (σ_a^2) auf. Die Kovarianz Komponenten werden zur Berechnung der Fixierungsindizes für jede der hierarchischen Ebenen verwendet. Die Signifikanz der Fixierungsindizes wiederum wird mittels eines nicht-parametrischen Permutations-Ansatzes nach EXCOFFIER et al. (1992) überprüft. Für eine akkurate Wahrscheinlichkeitsberechnung sind viele zufällige Permutationen (1000 und mehr) nötig (EXCOFFIER und LISCHER 2015). Für die Kernmikrosatelliten wurde für jede der hierarchischen Ebenen aus STRUCTURE (interspezifisch, intraspezifisch und ausschließlich für die Kamptalproben) eine *Locus by Locus* AMOVA (EXCOFFIER und LISCHER 2010) mit 1000 Permutationen angewandt, bei der eine unabhängige AMOVA für jeden einzelnen Locus durchgeführt wird. Diese Form der AMOVA wird empfohlen, wenn der Datensatz „missing data“, also fehlende Allele aufweist. Die Ergebnisse der Locus by Locus AMOVA sind ein gewichteter Durchschnitt über alle Loci. So wurde der F_{ST} -Genpoolwert über alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Populationen und Loci ermittelt.

Fixierungsindex F_{ST}

Mit dem Programm *FSTAT* (GOUDET 2003) wurden die paarweisen F_{ST} -Werte nach WEIR und COCKERHAM (1984) für alle Populationspaare berechnet. Obwohl die Berechnung des F_{ST} -Wertes (Fixierungsindex) bei hoch variablen Genorten als Maß der genetischen Differenzierung weniger geeignet ist (JOST 2008), wurde er in dieser Arbeit dennoch mithilfe der Programme *Arlequin* Version 3.5.2 (EXCOFFIER und LISCHER 2010), *FSTAT* (GOUDET 2003) sowie dem R package *diveRsity* (KEENAN et al. 2013) nach WEIR und COCKERHAM (1984) ermittelt, da dieses Maß bisher sehr oft in ähnlichen populationsgenetischen Studien verwendet wurde. Der Fixierungsindex F_{ST} beschreibt die mittlere Reduktion der erwarteten Heterozygotie innerhalb der Subpopulationen relativ zur erwarteten Heterozygotie der Gesamtpopulation, des gesamten Genpools, die aus nach Stichprobengröße gewichteten Allelfrequenzunterschieden zwischen den Subpopulationen resultiert (GOUDET 2003). Dieser statistische Wert ist ein Maß der genetischen Differenzierung zwischen den Subpopulationen. Das ist jener Anteil der gesamten, totalen genetischen Diversität (Heterozygotie), welche über die Subpopulationen verteilt ist. Der F_{ST} kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen (PEAKALL und SMOUSE 2012), Stichwort *Wahlundeffekt* (siehe Kapitel 2.2 „Relevante populations- und forstgenetische Grundlagen dieser Arbeit“). Ein Wert von 0 bedeutet, dass alle Subpopulationen gleiche Allelfrequenzen aufweisen und sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium befinden, ein Wert von 1 hingegen bedeutet, dass keine Diversität innerhalb der Subpopulationen vorherrscht, wobei jede Subpopulation für ein anderes Allel fixiert ist. F_{ST} Werte $> 0,15$ gelten

als starke oder signifikante Differenzierung, während Werte $<0,05$ als geringe bzw. nicht signifikante Differenzierung angesehen werden (FRANKHAM et al. 2002).

D_{JOST}

Zusätzlich wurde D nach JOST (2008) als Maß der genetischen Differenzierung paarweise zwischen den Populationen mithilfe der Software *R* Version 1.2.5001 im Package *diveRsity* (KEENAN 2013) berechnet. Dabei misst D_{JOST} den eigentlichen, relativen Grad der Differenzierung basierend auf den Allelhäufigkeiten innerhalb der Demen (Populationen). Die genetische Differenzierung wird gänzlich von den aktuell auftretenden Allelfrequenzen in jeder der Subpopulationen zum Zeitpunkt der Messung bestimmt. Sie wird von multiplen Faktoren kontrolliert, nicht nur von Migration, sondern auch von Mutationsraten, Gründereffekten, genetischen Flaschenhälsen etc., wobei ein echtes Maß für die Differenzierung empfindlich für alle diese Einflüsse sein muss. Die allelische Differenzierung liefert die genetische Grundkomponente für die phänotypische Differenzierung und ist somit die relevante Größe, um die evolutionäre Kohärenz oder Divergenz von Subpopulationen zu verstehen (JOST 2009). Der für die genetische Differenzierung früher oft herangezogene G_{ST} -Wert (Äquivalent des Fixierungsindex, F_{ST} ; s.u.) erweist sich für hoch variable Mikrosatellitenmarker weitgehend inkompatibel, da diese negativ mit der Heterozygotie innerhalb der Subpopulationen korrelieren. Für Loci mit vielen Allelen (z.B. > 10) wird die Heterozygotie innerhalb der Subpopulationen unweigerlich groß sein und die „traditionellen“ F-Statistiken dementsprechend ein theoretisches Maximum weit unter dem erwarteten $F_{\text{ST}} = 1$ aufweisen (KEENAN et al. 2013). G_{ST} ist jedoch ein nützliches Instrument, um die Höhe der Migration zwischen den Demen, eine der Ursachen für die genetische Struktur, zu untersuchen (JOST 2009) (siehe Kapitel 3.2.8). D_{JOST} wird folgendermaßen berechnet (JOST 2008):

$$D_{\text{JOST}} = \frac{H_{\text{T}} - H_{\text{S}}}{1 - H_{\text{S}}} \times \frac{n}{n-1}$$

n = Anzahl der Subpopulationen

H_{T} = die Heterozygotie der gepoolten Subpopulationen

H_{S} = die durchschnittliche Heterozygotie der Subpopulationen

Hauptkoordinatenanalyse basierend auf der Genetischen Distanz nach NEI (1972, 1978)

Um das Muster der populationsgenetischen Beziehung zwischen allen in dieser Arbeit untersuchten Populationen graphisch darzustellen, wurde eine *Hauptkoordinatenanalyse* in *GenAlEx* Version 6.5 (PEAKALL und SMOUSE 2006, 2012) durchgeführt und mit der Software *R* Version 1.2.5001 geplottet. Die Hauptkoordinatenanalyse (Engl. *Principal Coordinate Analysis PCoA*) ist ein multivariates Verfahren basierend auf einer nach NEI (1972, 1978) berechneten paarweisen Distanzmatrix aller Loci und Samples. Die Genetische Distanz nach NEI (1972, 1978) misst die Ähnlichkeiten zwischen den Populationspaaren aufgrund des Vergleichs der Allelfrequenzen (PEAKALL und SMOUSE 2012a). Multivariate Verfahren zielen darauf ab, die in einem Datensatz enthaltene Zahl der Variablen und/oder Beobachtungen zu reduzieren, ohne die darin enthaltene Information wesentlich einzuschränken. Dazu werden die Individuen bei der Hauptkoordinatenanalyse räumlich so angeordnet, dass die Abstände (Distanzen) zwischen den Individuen im Raum möglichst exakt den erhobenen Un-/Ähnlichkeiten entsprechen. Je größer bzw. kleiner die Distanz zwischen den Individuen ist, desto unähnlicher bzw. ähnlicher sind sie. Es werden also Informationen über Paare von Individuen erhoben, um daraus metrische Informationen über diese zu ermitteln (HANDL und KUHLENKASPER 2017). Die Mathematik hinter der Erstellung einer Hauptkoordinatenanalyse ist komplex, aber zusammenfassend ist die PCoA ein Prozess, in dem das Koordinatensystem in das Zentrum der Daten gerückt und orthogonal rotiert wird, sodass die Hauptachsen der Variation innerhalb eines multidimensionalen Datensets platziert sind. Jede nachfolgende Achse erklärt proportional weniger von der totalen Variation, wodurch beim Auftreten verschiedener Gruppen die ersten zwei oder drei Achsen typischerweise die höchste Aussagekraft bezüglich der Differenzierung besitzen (MELCHER 2021, PEAKALL und SMOUSE 2012b).

3.2.8 Untersuchung der mütterlichen Abstammung und der refugialen Herkunft mithilfe von Chloroplasten-Mikrosatelliten

Um herauszufinden, welche nacheiszeitlichen Rückwanderungswege der Stieleiche im Kamptal aufeinandertreffen, wurden 10 Chloroplasten-Mikrosatellitengenorte untersucht (siehe Tabelle 4, Kapitel 3.2.2). Soweit bekannt, wird die Chloroplasten-DNA (cpDNA) bei allen hiesigen Laubbaumarten, so auch bei der Stieleiche, einzig von der Mutter über die Samen an ihre Nachkommen weitervererbt, wodurch ihr Erbgut über eine Vielzahl an Generationen unverändert bleibt. So zeugt der aktuelle Typ, der sogenannte *Haplotyp* oder *Chlorotyp* der Chloroplasten-DNA vom Ursprung der Vorfahren im heimischen Areal (GUGERLI und SPERISEN 2010, NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Eichen migrierten sehr bald nach dem Ende der letzten Eiszeit, vor ca. 9500-9000 Jahren, von ihren Refugien rund um das Mittelmeer nach Zentraleuropa (BREWER et al. 2002). In den letzten zwanzig Jahren erbrachten zahlreiche Studien, basierend auf der Chloroplasten-DNA in Ergänzung durch fossile Pflanzen- und Pollenfunde, die genetischen Beweise über die refugiale Herkunft und die nacheiszeitlichen Rückwanderungswege der mitteleuropäischen Eichen (z.B. PETIT et al. 1993, 2002a, DEGUILLLOUX et al. 2004, NEOPHYTOU und MICHIELS 2013, GUGERLI und SPERISEN 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Eichenpopulationen in Zentraleuropa ihre cpDNA Haplotypen (Chlorotypen) mit bestimmten Regionen des Mittelmeerraums teilen, in denen sich die Populationen während der letzten Eiszeit zurückzogen. Die nachweisliche genetische Differenzierung zwischen den jeweiligen Rückzugsorten bekräftigt die Hypothese, dass die mütterlichen Hauptabstammungslinien der cpDNA während der letzten Eiszeit (oder sogar früher) unter den Effekten der genetischen Drift und Mutation geformt wurden (KREMER und PETIT 1993, PETIT et al. 2002a in NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Die longitudinale Verbreitung der verschiedenen mütterlichen Abstammungslinien spiegelt einen generellen Trend der Ausbreitung der postglazialen Rückwanderungswege von Süden nach Norden wider (PETIT et al. 2002a, SLADE et al. 2008 in NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Als weiteres Detail unterstützt das Fehlen von zusätzlichen genetischen Varianten, die nicht aus Rückzugsorten stammen, die Annahme, dass keine signifikante Differenzierung in der derzeitigen Warmzeit stattgefunden hat (PETIT et al. 2002a in NEOPHYTOU und MICHIELS 2013).

Um die refugiale Herkunft der Kamptaler Stieleichen Bestände nachzuweisen, wurden diese zusammen mit Referenzproben von den Refugialgebieten sowie DNA-Proben von vorhergehenden Studien mit bekannten cpDNA-Haplotypen analysiert (CSAIKL et al. 2002).

Minimum Spanning Network (MSN)

Um die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Chlorotypen visualisieren zu können, wurde ein „Minimum Spanning Network“ (MSN) basierend auf der Berechnung von Allellängenunterschiede mithilfe der Software *Arlequin* Version 3.5.2 (EXCOFFIER und LISCHER 2010) erstellt. Die graphische Darstellung wurde anschließend manuell in PowerPoint ausgeführt.

PermutCpSSR

Die haplotypische Variation sowie Differenzierung innerhalb und zwischen den Beständen wurde mittels der Software *PermutCpSSR* Version 1.2.1 überprüft. Das Programm *PermutCpSSR* baut auf den Papers von PONS und PETIT (1996), von BURBAN et al. (1999), sowie von PETIT et al. (2002a) auf. Es berechnet Maße der Diversität und Differenzierung aus populationsgenetischen Daten von Haplotypen, wenn die Distanz zwischen den Allelen und die Anzahl der Wiederholungen zur Verfügung stehen und testet, ob die Maße der Differenzierung und Diversität von den äquivalenten Maßen abweicht, wenn die Distanz zwischen den Haplotypen nicht berücksichtigt wird (z.B., wenn alle Haplotypen als äquivalent divergierend angesehen werden). So wurde mithilfe des Programms die haplotypische Diversität innerhalb der Populationen (h_s) und über alle Populationen hinweg (h_T) ermittelt. Ebenso wurde die Differenzierung zwischen den Populationen durch den G_{ST} -Wert und einen äquivalenten Koeffizienten der Differenzierung (R_{ST}), welcher die mutationsbegründeten Unterschiede zwischen den Haplotypen miteinbezieht, berechnet.

Für die Analyse von Mikrosatelliten-Daten wurde von SLATKIN (1995) ein dem F_{ST} -Wert analoger Parameter, der R_{ST} -Wert, vorgeschlagen, dessen Berechnung auf der Annahme des stufenweisen Mutationsmodells (Engl. „stepwise mutation model“) gründet. Dieses stufenweise Mutationsmodell wurde von OHTA und KIMURA (1973) für die evolutive Dynamik von Mikrosatelliten ausformuliert, da Mutationen die Allellänge mit derselben Wahrscheinlichkeit entweder um eine Wiederholungseinheit erhöhen oder verringern können. Bei der Berechnung des R_{ST} -Wertes wird dies beachtet, sodass die Ergebnisse die evolutionäre Dynamik von Mikrosatelliten-Loci realistischer widerspiegeln (IMMEL 2007).

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse aus der populationsgenetischen Analyse dieser Arbeit gliedern sich in vier Abschnitte. Im ersten Abschnitt werden die Artzugehörigkeit sowie die innerartliche Strukturierung der Kamptaler Stieleichen basierend auf 15 Kern-Mikrosatellitengenorten anhand von Referenzproben graphisch dargestellt. Als zweites folgt die Darstellung der genetischen Diversität innerhalb und zwischen den untersuchten Populationen mittels Maßen der genetischen Diversität. Der dritte Abschnitt veranschaulicht die genetische Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen, während sich der vierte Abschnitt den Ergebnissen bezüglich der mütterlichen Abstammung und refugialen Herkunft mithilfe von 10 Chloroplasten-Mikrosatelliten widmet.

4.1 Artkennung und innerartliche Strukturierung der untersuchten Individuen anhand von Referenzproben mithilfe von STRUCTURE

BAYESISCHE CLUSTERANALYSE (K = 2) Kamptal (*Quercus robur*) - und Referenzproben (*Q. petraea* und *Q. pubescens*)

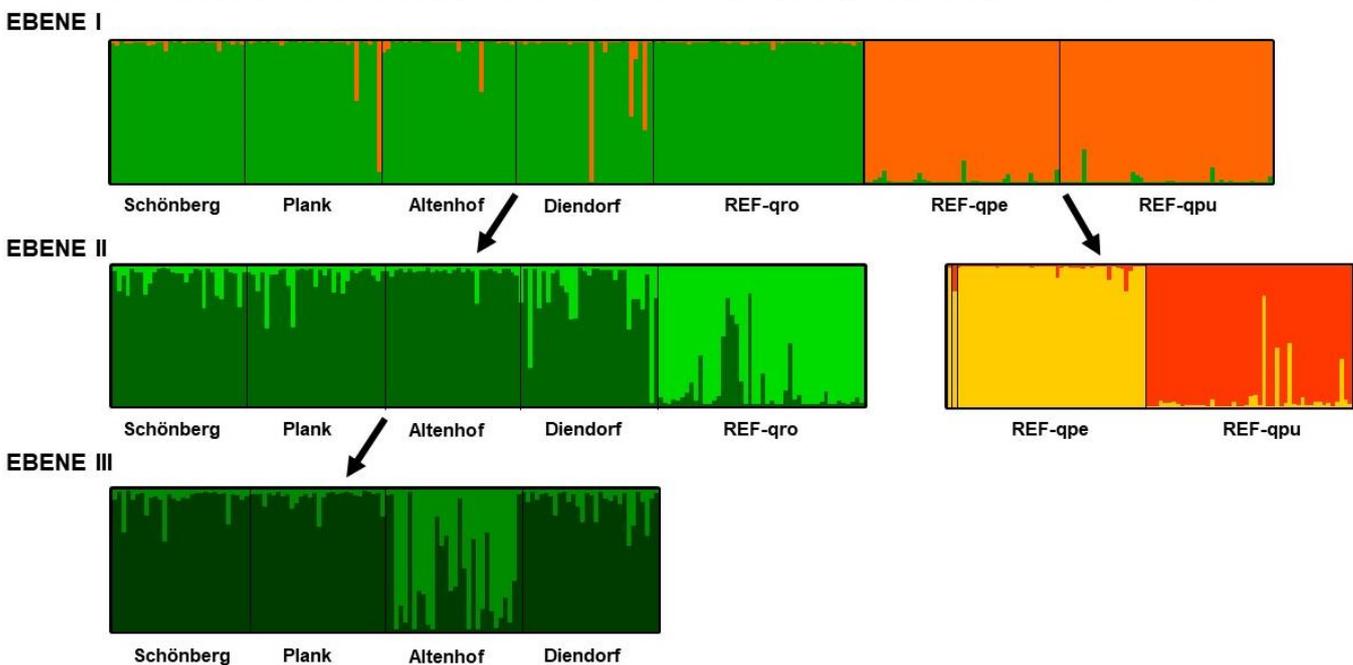


Abbildung 4: Hierarchische Bayesische Clusteranalyse der 15 Kern-DNA Mikrosatellitengenorte mittels STRUCTURE (nach PRITCHARD et al. 2000a, FALUSH et al. 2003a).

Graphische Darstellung der Ergebnisse der STRUCTURE-Clusteranalyse bei einem errechneten Zugehörigkeitskoeffizienten (q -Wert) von $K=2$. Die abgeleiteten Subpopulation (Cluster, K) sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet, wobei die vertikalen Balken den Individuen entsprechen. Die untersuchten Bestände werden durch schwarze Linien getrennt (Kamptaler Stieleichen: Schönberg, Plank, Altenhof, Diendorf; Referenzpopulationen: REF-qro = Stieleiche (*Q. robur*), REF-qpe = Traubeneiche (*Q. petraea*), REF-qpu = Flaumeiche (*Q. pubescens*) aus dem Oberrhein).

Insgesamt wurden 122 Bäume aus dem Kamptal gemeinsam mit Referenzproben der Stiel-, Trauben- und Flaumeiche aus dem Oberrhein einer Bayesischen Clusteranalyse unterzogen. Wie in Abbildung 4 in Ebene I ersichtlich, wurden dabei 118 Bäume der Stieleiche und zwei der Traubeneiche zugeordnet. Weitere zwei Individuen aus dem Bestand *Diendorf am Walde* wiesen einen intermediären Genotyp zwischen Stiel- und Traubeneiche auf. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Stieleichen aus dem Kamptal und die *Q. robur* Referenzpopulation auf der einen Seite genetisch deutlich von den zwei phylogenetisch zueinander näheren Referenzproben der Trauben- und Flaumeiche abgrenzen. Die errechnete Anzahl an Art-Clustern ergab $K=2$ und entsprach nicht der erwarteten Anzahl der Arten, nämlich $K=3$. Der als Maß der genetischen Differenzierung in der AMOVA (EXCOFFIER und LISCHER 2010) berechnete F_{ST} -Genpoolwert zwischen den beiden Clustern betrug $F_{ST} = 0,11098$, womit eine ausgeprägte Differenzierung gegeben ist.

Nach der Zuordnung zu Artgruppen und potenziellen Hybriden wurden die ‚reinen‘ Individuen (mit einem Zugehörigkeitskoeffizienten von $q > 0,875$) in Ebene II getrennt analysiert, um diese auf eine innerartliche genetische Struktur hin zu testen. „Einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein von genetischen Strukturen liefert ein zunehmender Wert der posterioren Wahrscheinlichkeit der Daten – $\ln P(D)$ – mit sich erhöhender Anzahl vordefinierter Cluster (K)“ (NEOPHYTOU 2015). Dies war sowohl in Ebene II als auch III der Fall und auch die Statistik ΔK nach EVANNO et al. (2005) wies bei beiden Ebenen einen eindeutigen Peak bei $K=2$ auf. Das Ergebnis von zwei Clustern im innerartlichen Vergleich verdeutlicht ein räumliches Muster zwischen den Kamptaler und den Oberrheinischen Stieleichen Populationen in Ebene II. Entsprechend wurde mittels AMOVA ein F_{ST} von 0,03975 ermittelt (siehe Kapitel 4.2.2, Tabelle 8).

Die Analyse innerhalb der Kamptaler Stieleichen Populationen in der dritten hierarchischen Ebene (Ebene III) ergab ebenso zwei Cluster, und zwar differenzierte sich hier einer der trockenen Standorte, *Altenhof am Kamp*. Die populationsgenetische Untersuchung innerhalb der vier Stieleichenbestände in Kapitel 4.2.2 zeigte, dass sich *Altenhof* auch im paarweisen Vergleich mit höheren F_{ST} -Werten tendenziell von den anderen drei Populationen unterscheidet (siehe Tabellen 9, 10 und 11).

4.2 Innerartliche Diversität und Differenzierung

4.2.1 Genetische Diversität innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatellitengenorte

Die effektive Anzahl der Allele (A_e) und die gemittelte, unvoreingenommene erwartete Heterozygotie (uH_e) über die 15 Kernmikrosatellitengenorte in Tabelle 5 zeigen, dass es sich bei den Kamptaler Stieleichen um hoch diverse Bestände handelt. Die Populationen unterscheiden sich in ihrer Diversität zwar nicht signifikant voneinander, es fällt jedoch auf, dass der Bestand *Plank* eine leicht geringere genetischen Variation als die übrigen Bestände aufweist. Weiters verdeutlicht der innerartliche Vergleich anhand von A_e und uH_e , dass die Stieleichen aus dem Kamptal eine höhere genetische Vielfalt besitzen als die Stieleichen-Referenzpopulation aus dem Oberrhein, wenn auch nicht signifikant höher (siehe Mann-Whitney-U-Test in Tabelle 6). Die Auswertung des Inzuchtkoeffizienten F_{IS} ergab, dass bis auf die Population in *Plank*, in allen Kamptaler Populationen und in der Referenzpopulation, ein minimaler (*Altenhof*) bis geringer (*Schönberg*) Homozygotenüberschuss herrscht, der jedoch nirgends signifikant ist.

Tabelle 5: Maße der genetischen Diversität mit Standardfehler (SE) bei den Kamptaler Stieleichen Populationen im Vergleich mit der Oberrheinischen Stieleichen-Referenzpopulation. Die Berechnungen erfolgten in *GenAlEx* (PEAKALL und SMOUSE 2006, 2012). N_{Ind} = Anzahl der Individuen in den Populationen, A_e = effektive Anzahl der Allele gemittelt über alle Loci für jede Population, H_o = beobachtete Heterozygotie, uH_e = unvoreingenommene erwartete Heterozygotie (nach NEI 1978), H_s = gemittelte, unvoreingenommene erwartete Heterozygotie innerhalb der Populationen, F_{IS} = populationspezifischer Inzuchtkoeffizient

Population	N_{Ind}	A_e	H_o	uH_e	H_s	F_{IS}
<i>Schönberg</i>	30	4,652 (\pm 0,744)	0,635 (\pm 0,051)	0,704 (\pm 0,053)		0,070 (\pm 0,035)
<i>Plank</i>	30	3,604 (\pm 0,468)	0,650 (\pm 0,057)	0,645 (\pm 0,054)	0,694	-0,022 (\pm 0,024)
<i>Altenhof</i>	30	4,139 (\pm 0,485)	0,684 (\pm 0,045)	0,709 (\pm 0,040)	(\pm 0,024)	0,007 (\pm 0,043)
<i>Diendorf</i>	30	4,911 (\pm 0,789)	0,676 (\pm 0,050)	0,717 (\pm 0,049)		0,041 (\pm 0,030)
<i>Oberrhein (Referenz)</i>	48	4,135 (\pm 0,705)	0,641 (\pm 0,041)	0,681 (\pm 0,040)		0,044 (\pm 0,030)

Tabelle 6: Mann-Whitney-U-Test zwischen den Kamptaler Populationen und der Oberrheinischen Referenzpopulation, welcher keinen signifikanten Unterschied bezüglich der uH_e ergab

Mann-Whitney-U-Test	
Population	<i>Oberrhein (Referenz)</i>
<i>Schönberg</i>	W = 130 p = 0,4679
<i>Plank</i>	W = 106 p = 0,7875
<i>Altenhof</i>	W = 120 p = 0,7557
<i>Diendorf</i>	W = 133 p = 0,3952

Die genetische Vielfalt kann auch anhand des Allelreichtums (Engl. „Allelic Richness“) gemessen werden. Die Berechnung der „Allelic Richness“ erfolgte unter Anwendung der „rarefaction method“ zur Bereinigung von Stichprobengrößenunterschieden und Erstellung von vergleichbaren Werten zwischen den einzelnen Populationen. Die Kalkulation wurde mit dem Programm ADZE (SZPIECH et al. 2008) durchgeführt. Wie die Darstellung des Allelreichtums (Abbildung 5) zeigt, weisen die Kamptaler Populationen, bis auf die Population *Plank*, eine teilweise viel höhere Diversität als die Referenzpopulation aus dem Oberrhein auf. Besonders interessant ist, dass ein Gradient der genetischen Vielfalt im Untersuchungsgebiet feststellbar ist, da der Allelreichtum von Richtung Südost nach Nordwest abnimmt (siehe Abbildung 5).

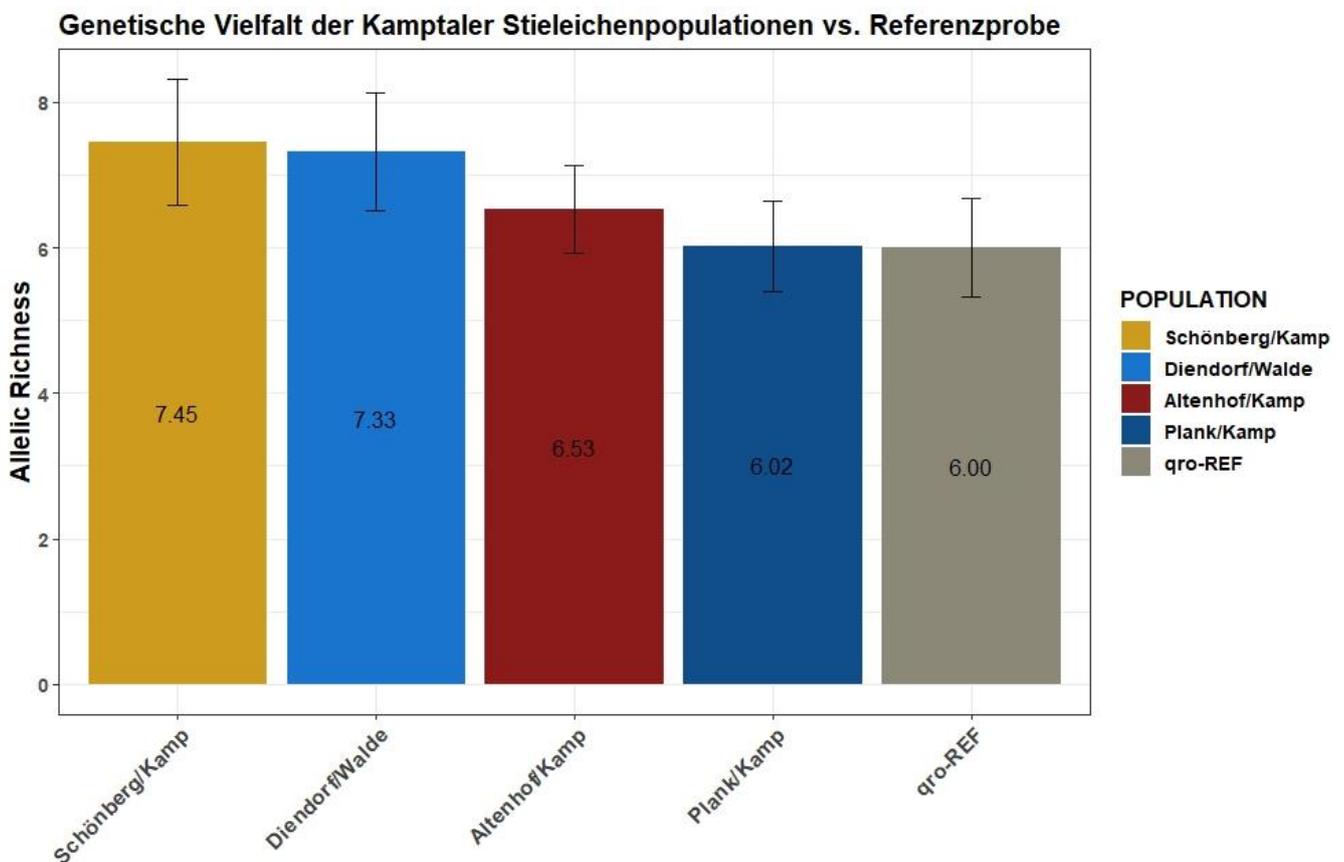


Abbildung 5: Allelreichtum der Stieleichen Bestände des Kamptals im Vergleich zur Referenzpopulation aus dem Oberrhein. Die Untersuchung des Allelreichtums (Engl. „Allelic Richness“) als Maß genetischer Vielfalt zeigt ebenso wie die Ergebnisse in Tabelle 5, dass die Kamptaler Stieleichenbestände eine hohe Diversität aufweisen und sich im Vergleich mit der Oberrheinischen Stieleichen-Referenzpopulation von dieser teilweise klar unterscheiden. Die Anordnung der abgebildeten Bestände ist paarweise nach Standort (trocken vs. frisch) und von Südosten Richtung Nordwesten orientiert.

4.2.2 Genetische Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen der Kernmikrosatellitengenorte

In diesem Abschnitt wird die genetische Differenzierung innerhalb der vier Kamptaler Bestände sowie zwischen den Kamptaler Populationen und der Oberrheinischen Referenzpopulation untersucht. Dafür werden einerseits die global ermittelten Fixierungsindizes F_{ST} aus der AMOVA (Analyse der molekularen Varianz) herangezogen, andererseits die Ergebnisse der paarweise berechneten Fixierungsindizes F_{ST} und D nach JOST (2008). Die Eignung des vielfach verwendeten F_{ST} - Wertes als Maß der genetischen Differenzierung für hoch polymorphe Mikrosatellitengenorte ist in der Literatur nicht unumstritten (siehe z.B. JOST 2008, HELLER 2009, JOST 2009), weshalb D nach JOST (2008) in dieser Arbeit vergleichend dazu berechnet wurde (siehe Tabellen 9, 10, 11).

AMOVA

Tabelle 7: In *Arlequin* (EXCOFFIER und LISCHER 2010) berechnete globale AMOVA Ergebnisse für die Kamptaler Populationen (*Schönberg, Plank, Altenhof, Diendorf*) gewichtet und gemittelt über die 15 Kernmikrosatellitengenorte

F_{ST} – Genpoolwert Locus by Locus AMOVA	Variation	Quadratsumme	Varianz Komponenten	Prozentsatz Variation
0,0260	zwischen Populationen	41,146	0,13932	2,60570
	zwischen Individuen innerhalb der Populationen	627,149	0,24808	4,63996
	innerhalb der Individuen	590,000	4,95928	92,75435
	<i>Gesamt</i>	1258,294	5,34668	

Tabelle 8: In *Arlequin* (EXCOFFIER und LISCHER 2010) berechnete globale AMOVA Ergebnisse für die Kamptaler Populationen gemeinsam mit der Oberrheinischen Referenzprobe gewichtet und gemittelt über die 15 Kernmikrosatellitengenorte

F_{ST} – Genpoolwert Locus by Locus AMOVA	Variation	Quadratsumme	Varianz Komponenten	Prozentsatz Variation
0,03975	zwischen Populationen	78,021	0,21436	3,97451
	zwischen Individuen innerhalb der Populationen	878,579	0,26341	4,88399
	innerhalb der Individuen	818,500	4,91562	91,14150
	<i>Gesamt</i>	1775,100	5,39339	

Fixierungsindex F_{ST} **Tabelle 9:** Ergebnisse der in FSTAT (GOUDET 2003) berechneten paarweisen F_{ST} -Werte nach WEIR und COCKERHAM (1984). (*) Differenzierung = signifikant; (NS) = nicht signifikant

paarweiser F_{ST} FSTAT				
Population	Schönberg	Plank	Altenhof	Diendorf
<i>Schönberg</i>				
<i>Plank</i>	0,0179 (*)			
<i>Altenhof</i>	0,0345 (*)	0,0581 (*)		
<i>Diendorf</i>	-0,0005 (NS)	0,0175 (*)	0,0278 (*)	
<i>Oberrhein (Referenz)</i>	0,0433 (*)	0,0551 (*)	0,0769 (*)	0,0334 (*)

Tabelle 10: Ergebnisse der im R package *divRsity* (KEENAN et al. 2013) berechneten paarweisen F_{ST} -Werte nach WEIR und COCKERHAM (1984) mit zugehörigem Konfidenzintervall in []

paarweiser F_{ST} <i>divRsity</i>				
Population	Schönberg	Plank	Altenhof	Diendorf
<i>Schönberg</i>				
<i>Plank</i>	0,0110 [0,0015; 0,0223]			
<i>Altenhof</i>	0,0152 [0,0033; 0,0306]	0,0280 [0,0131; 0,0471]		
<i>Diendorf</i>	0,0023 [-0,0054; 0,0125]	0,0090 [0,0004; 0,0201]	0,0151 [0,0050; 0,0277]	
<i>Oberrhein (Referenz)</i>	0,0254 [0,0149; 0,0381]	0,0252 [0,0132; 0,0394]	0,0380 [0,0257; 0,0535]	0,0145 [0,0046; 0,0279]

 D_{JOST} **Tabelle 11:** Ergebnisse der im R package *divRsity* (KEENAN et al. 2013) berechneten paarweisen Werte von D_{JOST} (2008) mit zugehörigem Konfidenzintervall in []

paarweiser D_{Jost} <i>divRsity</i>				
Population	Schönberg	Plank	Altenhof	Diendorf
<i>Schönberg</i>				
<i>Plank</i>	0,0019 [-0,0093; 0,0213]			
<i>Altenhof</i>	0,0075 [-0,0102; 0,0340]	0,0246 [-0,0015; 0,0619]		
<i>Diendorf</i>	-0,0013 [-0,0073; 0,0131]	0,0018 [-0,0088; 0,0186]	0,0072 [-0,0089; 0,0324]	
<i>Oberrhein (Referenz)</i>	0,0198 [0,0007; 0,0460]	0,0200 [0,0027; 0,0414]	0,046 [0,0209; 0,0794]	0,0073 [-0,0075; 0,0276]

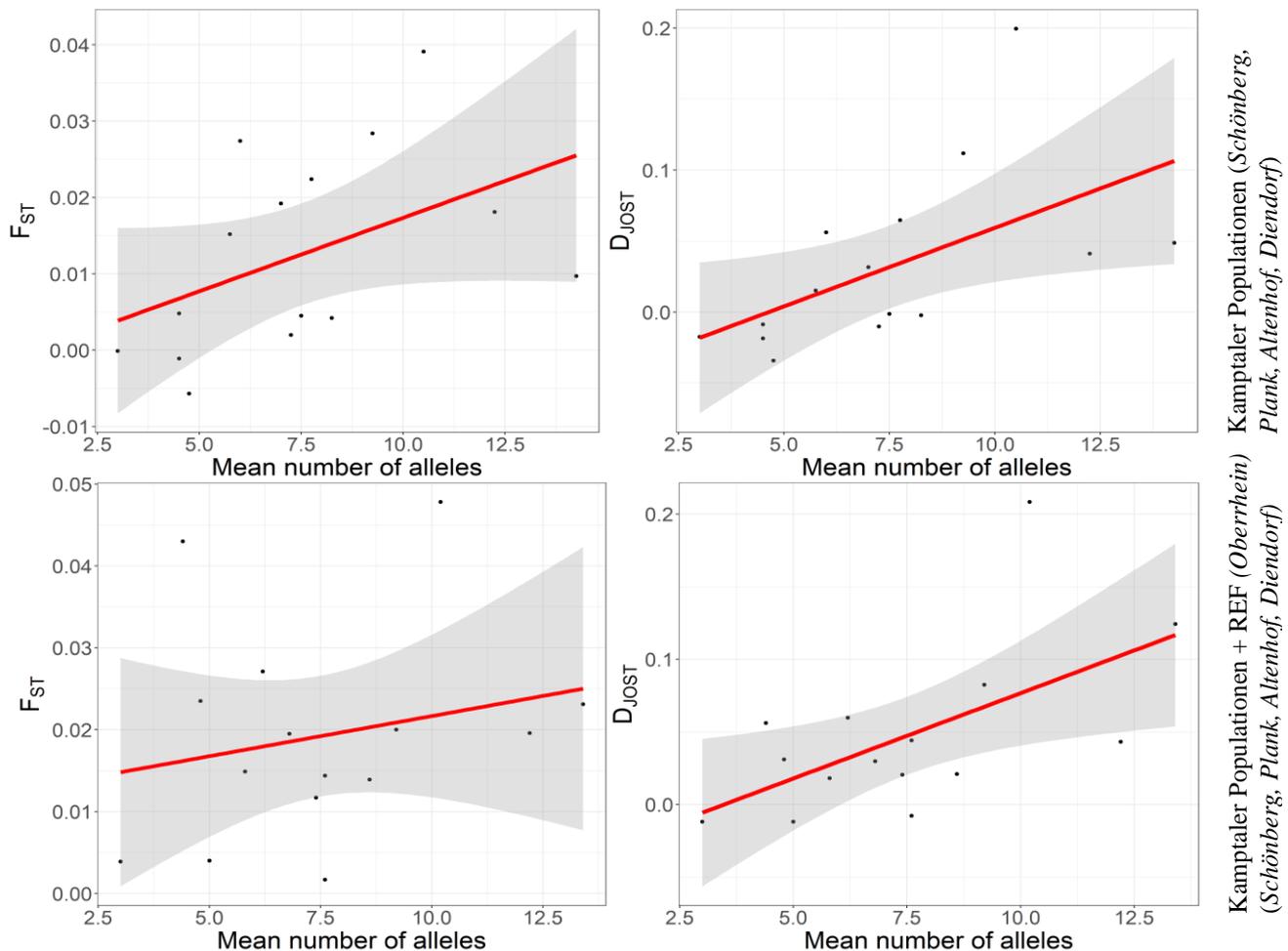


Abbildung 6: Gegenüberstellung des F_{ST} nach WEIR und COCKERHAM (1984) und D nach JOST (2008) in Abhängigkeit von der $\bar{\alpha}$ Anzahl der Allele/Locus für die 15 Kernmikrosatellitengenorte. Die Werte des F_{ST} und D_{JOST} stimmen in etwa überein bei einer $\bar{\alpha}$ Anzahl von 7,5 Allelen pro Locus, divergieren jedoch deutlich bei $< 7,5$ Allelen/Locus und noch mehr an hoch polymorphen Genorten > 10 Allele/Locus. F_{ST} und D_{JOST} basierend auf den Daten der Kamptaler Populationen (oben) und gemeinsam mit der Oberrheinischen Referenzpopulation (unten).

Der Vergleich der paarweisen F_{ST} -Werte mit den D_{JOST} -Werten in den Tabellen 9, 10 und 11 zeigt, dass die paarweise berechnete Differenzierung bei D_{JOST} wesentlich geringer ausfällt als bei den paarweisen F_{ST} -Werten. Die Abbildung 6 verdeutlicht, dass die Werte des F_{ST} und D_{JOST} in etwa übereinstimmen bei einer durchschnittlichen Anzahl von 7,5 Allelen an einem Locus. Bei einer geringeren $\bar{\alpha}$ Anzahl von 2,5 Allelen, als auch bei den hoch polymorphen Genorten (> 10 Allele/Locus) ist die Divergenz zwischen F_{ST} und D_{JOST} jedoch sehr hoch. Bei den stark variablen Genorten ist die Differenzierung nach den Berechnungen von D_{JOST} dann viel höher als bei dem respektiven F_{ST} -Wert (Abbildung 6). Da die meisten in dieser Arbeit untersuchten Mikrosatellitengenorte zwischen 5 und 10 Allele besitzen, sind die berechneten paarweisen F_{ST} - und D_{JOST} -Werte vergleichbar und geben im Großen und Ganzen dasselbe Verhältnis zwischen den paarweisen Differenzen wieder.

Hauptkoordinatenanalyse

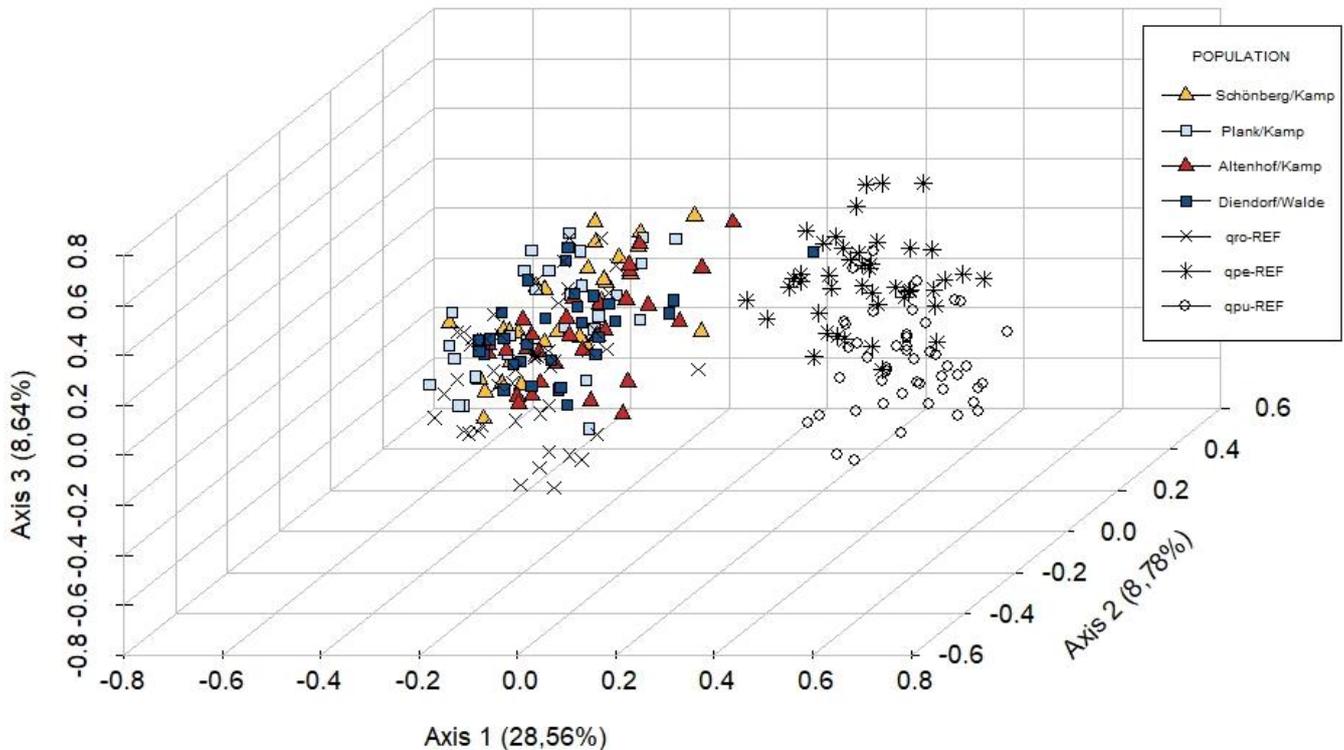
PCoA Kamptal and Reference Samples
Quercus robur

Abbildung 7: Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) zur Darstellung der genetischen Strukturierung der Kamptaler Populationen (*Schönberg*, *Plank*, *Altenhof*, *Diendorf*) und der Oberrheinischen Referenzproben der Stiel- (qro-REF), Trauben- (qpe-REF) und Flaumeiche (qpu-REF).

In der PCoA werden die vier Kamptaler Bestände an und für sich recht homogen dargestellt, wobei sich der Trockenstandort *Altenhof* (rot) jedoch tendenziell von den anderen drei Populationen differenziert.

Die Analyse der molekularen Varianz der Kamptaler Bestände gemeinsam mit dem Referenzbestand resultierte in einen wesentlich höheren AMOVA F_{ST} -Genpoolwert von 0,03975 im Vergleich zu einem F_{ST} -Genpoolwert von 0,026 innerhalb der vier Kamptaler Populationen (siehe Tabellen 7 und 8). Auch die paarweisen F_{ST} -Werten zwischen den jeweiligen Populationen liegen über denen der Kamptaler F_{ST} -Werte, womit eine eindeutige Differenzierung der Kamptaler Samples von der Oberrheinischen Referenzpopulation belegt wird (siehe Tabellen 9, 10 und 11). Dies ist auch sehr gut in der Hauptkoordinatenanalyse (Engl. „*Principal Coordinates Analysis*“, PCoA) in Abbildung 7 erkennbar, in der die Referenzpopulation sichtlich räumlich distanziert von den Kamptaler Populationen dargestellt wird. Die Hauptkoordinatenanalyse ist ein multivariates Verfahren basierend auf der genetischen Distanz nach NEI (1972, 1978), welche die Ähnlichkeiten zwischen allen

Populationspaaren aufgrund des Vergleichs der Allelfrequenzen (PEAKALL und SMOUSE 2012a) misst.

Die Untersuchung der genetischen Differenzierung innerhalb der vier Kamptaler Stieleichenbestände deutet darauf hin, dass es sich im Kamptal mit einem AMOVA F_{ST} -Genpoolwert von 0,026 um doch recht heterogene Populationen handelt. Deshalb wurde zusätzlich eine komparative Analyse mit dem veröffentlichten Datensatz von NEOPHYTOU (2014a) durchgeführt. Die AMOVA von 1600 Stieleichen des Oberrheins über 21 Mikrosatellitenloci ergab einen F_{ST} -Genpoolwert von 0,00006. Im Vergleich zu diesem Ergebnis erscheint der F_{ST} -Genpoolwert von 0,026 der Kamptaler Stieleichenpopulationen bedeutend höher. In der Hauptkoordinatenanalyse (Abbildung 7) werden die Kamptaler Stieleichen relativ homogen dargestellt, es fällt jedoch auf, dass sich die Individuen des Trockenstandortes *Altenhof* etwas mehr von den anderen distanzieren. Im paarweisen Vergleich (siehe Tabellen 9, 10 und 11) stellte sich tatsächlich heraus, dass sich *Altenhof* mit höheren paarweisen F_{ST} -Werten tendenziell von den anderen drei Populationen unterscheidet, wenn auch nicht signifikant.

4.3 Untersuchung der mütterlichen Abstammung und der refugialen Herkunft mithilfe von Chloroplasten-Mikrosatelliten

Minimum Spanning Network (MSN)

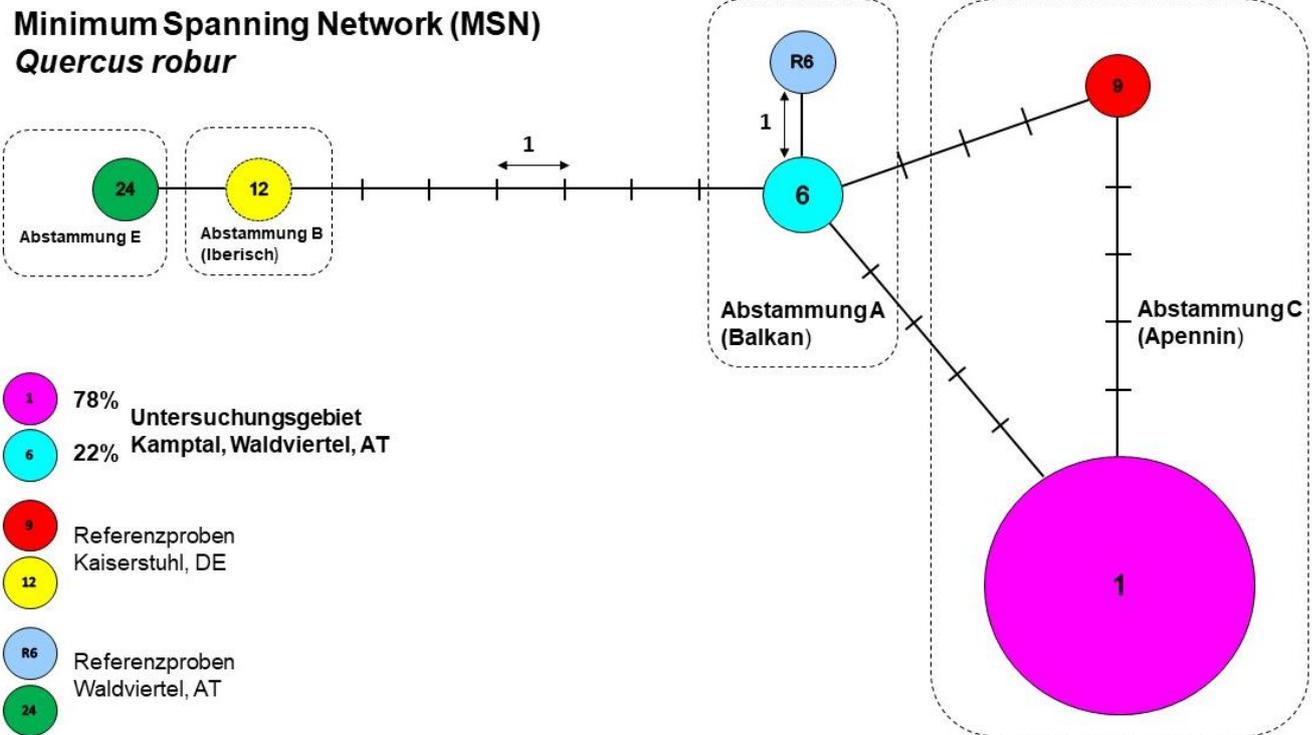


Abbildung 8: Minimum Spanning Network (MSN) von Haplotypen. Jeder Kreis repräsentiert einen Haplotypen, siehe NEOPHYTOU und MICHIELS (2013). In den vier Versuchspopulationen im Kamptal wurden ausschließlich die Haplotypen 1 und 6 gefunden. Die Größe der Kreise 1 und 6 entspricht der Häufigkeit des Haplotypen im gesamten Untersuchungsgebiet. Die Referenzproben (9, 6, 12, R6, 24) sind bis auf den Haplotypen 12 alle in Österreich vertreten. Der MSN basiert auf Allellängenunterschiede zwischen den Haplotypen und soll phylogenetische Verwandtschaftsgrade verdeutlichen.

PermutCpSSR

Tabelle 12: Maße haplotypischer Diversität innerhalb der vier Kamptaler Populationen. N_{Ind} = Anzahl der für die Analyse verwendeten Individuen, h_s = haplotypische Diversität innerhalb der Populationen, h_T = gesamte haplotypische Diversität, G_{ST} = Differenzierung zwischen den Populationen, R_{ST} = äquivalenter Koeffizient der Differenzierung (Miteinbezug mutationsbegründeter Unterschiede zwischen den Haplotypen)

Population	N_{Ind}	h_s	h_T	G_{ST}	R_{ST}
Schönberg	8				
Plank	8				
Altenhof	8	0,063 (± 0,0625)	0,438 (± 0,2461)	0,857	0,857
Diendorf	8				

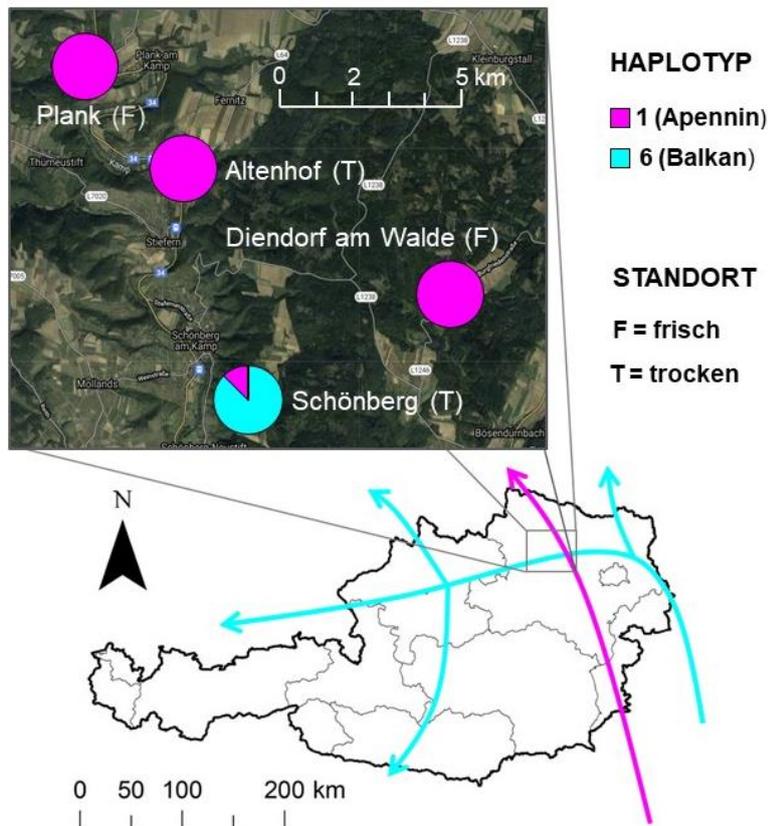


Abbildung 9: Nacheiszeitlichen Rückwanderungswege der im Kamptal auftretenden Haplotypen der Chloroplasten-DNA in Österreich (unten) sowie Häufigkeit der Haplotypen der Chloroplasten-DNA in den einzelnen Beständen (europaweiter Farbecode nach FAIROAK 2021).

Bei der Untersuchung der Chloroplasten-DNA konnten alle Stieleichenpopulationen im Kamptal anhand der Referenzproben von NEOPHYTOU und MICHIELS (2013) den bekannten Haplotypen 1 und 6 aus den phylogenetischen Gruppen C und A nach PETIT et al. (2002b) zugeordnet werden (siehe Abbildung 8). Diese gingen aus zwei wichtigen eiszeitlichen Refugien des europäischen Kontinents hervor, nämlich aus dem Apennin und dem Balkan. Die Kombination aus Haplotyp 1 und 6 ist aus umliegenden Gebieten bekannt (FAIROAK 2021). Europaweit sind die Haplotypen der Abstammungslinie C in einer Linie von der italienischen bis zur dänischen Halbinsel verbreitet, während sich die Haplotypen der Abstammungslinie A von Mitteleuropa bis zum Balkan erstrecken (PETIT et al. 2002a). Österreich wird von Haplotyp 1 aus dem Apennin und Haplotyp 6 aus dem Balkan durchquert, bis es schließlich zu einem Aufeinandertreffen der beiden Abstammungslinien im Untersuchungsgebiet im Kamptal kommt (Abbildung 9). Die Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft mittels eines *Minimum Spanning Networks (MSN)* (Abbildung 8) und Referenzproben aus Österreich, erlaubte die Aufteilung der Kamptaler Populationen in die zwei Abstammungslinien und ihre dazugehörigen Haplotypen, benannt nach NEOPHYTOU und MICHIELS (2013). Das MSN

zeigt, dass sich die Allellängen der Haplotypen 1 und 6 durch fünf Mutationsschritte voneinander unterscheiden. Dieser Unterschied ist vergleichsweise genauso groß wie zwischen den beiden Haplotypen 1 und 9 aus der Abstammungslinie C.

Weiters ergab die Untersuchung, dass der italienische Haplotyp 1 die Populationen *Plank*, *Altenhof* und *Diendorf* dominiert und im Untersuchungsgebiet mit ca. 78% am häufigsten vorkommt, wohingegen der balkanische Haplotyp 6 nur in der Population *Schönberg* vorherrscht und insgesamt mit ca. 22% vertreten ist (siehe Abbildung 8). In dem statistischen Test des Programms *PermutCpSSR* wurden die Kamptaler Population auf das Vorhandensein einer phylogeographischen Struktur in den beiden Abstammungslinien durch den Vergleich der G_{ST} - und R_{ST} -Werte hin überprüft. Es konnte jedoch kein phylogeographisches Muster festgestellt werden, da der Test einen gleich großen G_{ST} – und R_{ST} – Wert (0,857) ergab (LYNCH und CREASE 1990, PONS und PETIT 1996).

Die Betrachtung der Maße der haplotypischen Diversität und Differenzierung (siehe Tabelle 12) zeigte, dass nur wenig Variation innerhalb der Bestände herrscht ($h_S = 0,063 (\pm 0,0625)$). Dass die haplotypische Diversität innerhalb der Populationen auch deutlich geringer ausfällt als die gesamte haplotypische Diversität ($h_T = 0,438 (\pm 0,2461)$) bedeutet, dass die einzelnen Bestände sehr homogen sind, sich jedoch in ihrer haplotypischen Zusammensetzung unterscheiden (NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in dem hohen Wert der Differenzierung zwischen den Populationen wider ($G_{ST} = 0,857$).

5. Diskussion

5.1 Deutliche Abgrenzung des Genpools der Stieleiche von der Trauben- und Flaumeiche

Mithilfe der 15 Kern-Mikrosatelliten und der Bayesischen Clusteranalyse wurden die Stieleichen aus dem Kamptal und die Trauben- und Flaumeichen-Referenzproben aus dem Oberrhein als solche erkannt und die Individuen den Artgruppen (Clustern) zugeordnet. Wie auch die Ergebnisse der Studien von NEOPHYTOU (2014, 2015) zeigten, war die Abgrenzung zwischen den Arten jedoch unterschiedlich scharf. In den 10 Läufen in der ersten hierarchischen Ebene unterschieden sich die Individuen und Populationen der Stieleiche deutlich vom Cluster der Trauben- und Flaumeiche. Die Stieleiche differenziert sich genetisch von den phylogenetisch zueinander näher verwandten Trauben- und Flaumeichen (NEOPHYTOU 2014), weshalb die letzteren beiden Arten demselben Cluster zugeordnet wurden, was zu einer Reduktion der Schärfe der Bayesischen Clusteranalyse führte.

In der Analyse wurden nur zwei Bäume mit einem intermediären Genotyp zwischen Stiel- und Traubeneiche gefunden, die bei der Probennahme im Gelände aufgrund ihrer Morphologie als Stieleichen charakterisiert wurden. Aufgrund von prä- und postzygotischen reproduktiven Barrieren, kommen Kreuzungen zwischen der Stieleiche und den anderen beiden heimischen Eichenarten in der Natur auch nur relativ selten vor, verglichen z.B. mit Kreuzungen zwischen Trauben- und Flaumeiche (LEPAIS et al. 2009, ABADIE et al. 2012).

Die Klärung der Artidentität von Beständen oder Individuen ist für die Ausweisung erhaltenswerter genetischer Ressourcen von grundlegender Bedeutung (HÖLTKEN et al. 2012). So ist auch im ACORN-Projekt die Möglichkeit der Zuordnung zu den jeweiligen Arten sowie die Schätzung des Hybridanteils wichtig, da die Trockenanpassung im Projekt getrennt bei Stiel-, Trauben- und Flaumeiche untersucht wird. In zugelassenen Saatgut-Erntebeständen soll eine Beimischung nah verwandter Arten nämlich möglichst ausgeschlossen werden, um die Artreinheit des Vermehrungsgutes gewährleisten zu können (HÖLTKEN et al. 2012).

Auch die Anpassungspotenziale im Klimawandel unterscheiden sich je nach Art. So ergab die genomische Untersuchung von RELSTAB et al. (2016) zur Fehlanpassung bei Stiel-, Trauben- und Flaumeiche in Hinblick auf den Klimawandel in der Schweiz dazu folgendes (siehe auch Kapitel 2.1): Die Stieleiche war zwar im Vergleich zur Trauben- und Flaumeiche potenziell am besten an die steigenden Temperaturen angepasst, aber am schlechtesten an die abnehmende Wasserverfügbarkeit. Dieses Resultat spiegelt die ökologischen Bedürfnisse der drei Eichenarten wider: Die Stieleiche ist hauptsächlich in warmen, tiefer gelegenen und feuchten Lagen des Mittellandes vertreten und potenziell am besten an die steigenden

Temperaturen, aber am schlechtesten an die zunehmende Bodentrockenheit angepasst. Trauben- und Flaumeiche findet man hingegen in trockeneren Lebensräumen und sie scheinen am besten für die zunehmende Trockenheit gewappnet zu sein (RELLSTAB et al. 2017). Die Studie verdeutlicht einerseits die dringende Notwendigkeit, Waldökosysteme langfristig für veränderte ökologische Bedingungen zu rüsten, um eine Anpassung zu gewährleisten. Andererseits ist es wichtig, eine große genetische Variation innerhalb der Baumarten zu fördern, aber auch zwischen den Arten zu unterscheiden, um sie auf den unterschiedlichen Standorten optimal einsetzen zu können.

5.2 Kamptal: ein Treffpunkt von Migrationsrouten der Eiche

Mittels der Genmarker aus der Chloroplasten-DNA wiederum konnte nachgewiesen werden, dass die Vorfahren der Kamptaler Stieleichen sowohl aus dem Apennin als auch aus dem Balkan stammen, aber nur wenig Variation innerhalb der Bestände herrscht. Aus dem *Minimum Spanning Network* (MSN) geht hervor, dass der phylogenetische Verwandtschaftsgrad (Abstand) zwischen den Haplotypen 1 und 6 genauso groß ist wie der zwischen den Haplotypen 1 und 9, die derselben Abstammungslinie angehören.

Die haplotypische Diversität in den einzelnen Populationen (h_S) ist mit einem Wert von 0,063 ($\pm 0,0625$) sehr gering. Im Vergleich dazu ergab beispielsweise die paneuropäische Studie von PETIT et al. (2002b), in der 2600 Stieleichen Populationen untersucht wurden, einen h_S -Wert von 0,183. Auch in der Studie von KÖNIG et al. (2002), in der 231 zentraleuropäische Stieleichen Populationen auf regionaler Ebene untersucht wurden, war die haplotypische Variation mit einem h_S -Wert von 0,239 um einiges größer. In der Studie von HOMOLKA (2013) betrug die gesamte haplotypische Diversität (h_T) der acht untersuchten Stieleichen Populationen im nördlichen Waldviertel 0,687. Vergleichsweise dazu war die gesamte haplotypische Vielfalt der vier Populationen der vorliegenden Studie mit einem h_T -Wert von 0,438 ($\pm 0,2461$) viel geringer. Allerdings ist anzumerken, dass sich der kleinere Stichprobenumfang dieser Arbeit im Kamptal mit nur vier, im Gegensatz zu acht Populationen, negativ auf die Gesamtdiversität (h_T) auswirkt. Wäre die Anzahl an untersuchten Populationen größer, so wäre höchstwahrscheinlich auch die gesamte haplotypische Vielfalt höher.

Die Untersuchungsbestände *Schönberg*, *Plank*, *Altenhof* und *Diendorf* unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Haplotypen, was man daran erkennt, dass die gesamte haplotypische Diversität über alle Populationen (h_T) größer als die haplotypische Diversität in den einzelnen Populationen (h_S) ist ($h_T = 0,438 (\pm 0,2461) > h_S = 0,063 (\pm 0,0625)$). So ist der Haplotyp 1 aus dem Apennin in allen Beständen vertreten, wobei er in den drei Beständen *Plank*, *Altenhof* und

Diendorf ausschließlich nachgewiesen wurde. Haplotyp 1 macht insgesamt etwa 78% in den vier untersuchten Beständen aus. Der Haplotyp 6 aus dem Balkan hingegen war nur bei den untersuchten Individuen des Bestandes in *Schönberg* zu finden und ergänzt die restlichen 22% in den vier Kamptaler Populationen. Aufgrund der Vererbung der Chloroplasten-DNA durch die Mutter sind die Varianten der Chlorotypen (Haplotypen) allein von der Ausbreitung der Samen abhängig. Das hohe Gewicht der Eicheln beschränkt die räumliche Ausbreitung der Haplotypen, wenn man von Verbringung des Saatguts durch den Menschen oder beispielsweise des Eichelhäfers absieht. Dadurch kann das haplotypische Muster, das nach einer ursprünglichen Migration entsteht, z.B. dass in *Plank*, *Altenhof* oder *Diendorf* nur Haplotyp 1 vorherrscht, über mehrere Generationen erhalten bleiben, weil der Haplotyp nur lokal von einer Generation auf die nächste weitergegeben wird (PETIT et al. 2002a).

Der G_{ST} -Wert von 0,857 weist auf den hohen Grad an Differenzierung zwischen den Populationen hin, welche durch die unterschiedliche Haplotypenzusammensetzung in den Beständen zustande kommt. Der G_{ST} -Wert ist ein Maß für die Migration zwischen den untersuchten Populationen, welche eine der Ursachen für die genetische Struktur ist (JOST 2009). Die Untersuchung mit dem Programm *PermutCpSSR* bekräftigte, dass das Erbgut der Chloroplasten der Kamptaler Stieleichen kein ausgeprägtes räumliches Muster aufweist. Vom Fehlen einer weniger ausgeprägten phylogeographischen Struktur in der Sektion der Europäischen Weiß-Eichen in Mitteleuropa (zu denen die Stiel- und Traubeneiche gehören) berichten auch andere Studien (GRIVET et al. 2006, NEOPHYTOU und MICHIELS 2013). Es wird angenommen, dass sich nach der letzten Eiszeit in einer zweiten Wiederbesiedelungsphase der Eichen (vor ca. 9000 Jahren) nur eine begrenzte Anzahl an Chlorotypen in Europa ausgebreitet hat. Diese Tatsache, sowie die Durchmischung, die während dieses Prozesses stattgefunden hat, dürften zu einem breitgefächerten räumlichen Muster und dem Fehlen einer distinktiven phylogeographischen Struktur geführt haben, während die phylogeografischen Strukturen in den Refugien ausgeprägter sind (PETIT et al. 2002a, NEOPHYTOU und MICHIELS 2013, TEKPINAR et al. 2021). In den Refugien ist die Verbreitung der Haplotypen eher punktuell („patchy“), wohingegen in den wiederbesiedelten Gebieten im Norden die Rückwanderungswege das räumliche Muster geprägt haben (OLALDE et al. 2002).

Das gemeinsame Auftreten von Haplotyp 1 und 6 im Kamptal ist auch aus umliegenden Gebieten bekannt (FAIROAK 2021). So zeugt das Vorkommen dieser zwei Abstammungslinien von der Migration aus zwei verschiedenen refugialen Herkünften – dem Apennin (Haplotyp 1) und dem Balkan (Haplotyp 6). Die Verbreitungsgebiete der auftretenden Chlorotypen im Kamptal spiegeln damit wichtige nacheiszeitliche Rückwanderungswege

wider, die sich in diesem Raum trafen. Der Nachweis, dass die Kamptaler Stieleichen noch die Spuren der nacheiszeitlichen Rückwanderung in sich tragen, ist ein Beweis ihrer Autochthonie.

5.3 Innerartlich sind die Stieleichenbestände hoch divers

Im Gegensatz zur Chloroplasten-DNA, weist die Kern-DNA der Kamptaler Stieleichen Bestände eine hohe genetische Variation auf. Ein Vergleich von Maßen der genetischen Diversität anhand der effektiven Anzahl der Allele (A_e) und der durchschnittlichen unvoreingenommenen, erwarteten Heterozygotie (uH_e) zeigt, dass die Kamptaler Populationen, bis auf den Standort *Plank*, eine höhere, wenngleich nicht signifikant höhere, genetische Vielfalt als die Stieleichen-Referenzpopulation aus dem Oberrhein besitzen. Aus dem zusätzlichen Vergleich des Allelreichtums geht außerdem hervor, dass jener Bestand, welcher die beiden Haplotypen der Abstammungslinien aus dem Apennin und dem Balkan vereint, die größte Diversität aufweist. Bemerkenswerterweise nimmt die Diversität ausgehend von diesem Bestand im Südosten in Richtung Nordwesten, in der die Bestände nurmehr einen Haplotypen in sich tragen, ab. Diese Tatsache bekräftigt die Annahme, dass das Aufeinandertreffen von Apennin- und Balkanroute im Kamptal zu einer erhöhten Diversität des lokalen Genpools geführt hat.

Betrachtet man die paarweise Differenzierung zwischen den Beständen genauer, so stellt man fest, dass sich die benachbarten Populationen *Schönberg* und *Diendorf* genetisch auch am wenigsten voneinander unterscheiden ($F_{ST} = -0,0005$ (FSTAT)). Diese genetische Homogenität kann auf den intensiven Genfluss zwischen den in Paarungskontakt stehenden Populationen zurückgeführt werden. Vaterschaftsanalysen in den Studien von STREIFF et al. (1999), BUSCHBOM et al. (2011) oder GERBER et al. (2014) haben nachgewiesen, dass der weiträumige Pollenflug für einen Großteil der Paarungen sorgt und zu einer niedrigen genetischen Differenzierung innerhalb von umliegenden Stieleichen Populationen führt. Somit ist auch die größere paarweise genetische Differenzierung ($F_{ST} = 0,0179$), zwischen den weiter auseinander gelegenen Beständen *Schönberg* und *Plank* zu erklären.

5.4 Deutliches räumliches Muster der genetischen Struktur bei den Kamptaler Populationen im innerartlichen Vergleich

Wie der Nachweis einer höheren genetischen Vielfalt in den Kamptaler Populationen bereits andeutet, unterscheiden sich die vier Bestände des Kamptals auch in ihrer genetischen Struktur von der Oberrheinischen Referenzpopulation. Der mittels der Bayesischen Clusteranalyse durchgeführte innerartliche Vergleich resultierte in zwei abgegrenzte Cluster. Dieses Ergebnis verdeutlicht eine distinkte genetische Struktur, welche die räumliche Lage und Distanz vom Oberrhein zu den Kamptaler Stieleichen widerspiegelt. Zudem ergab die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) für die Stieleichen aus dem Kamptal zusammen mit der Oberrheinischen Referenzpopulation einen höheren F_{ST} -Genpoolwert von 0,03975 als für die vier Kamptaler Stieleichen Bestände allein (F_{ST} -Genpoolwert = 0,0260). Das bedeutet, dass sich die Populationen innerhalb des Kamptals weniger voneinander unterscheiden als von der Oberrheinischen Referenzpopulation, da die Verwendung der Oberrheinischen Bestände in der Analyse den globalen F_{ST} -Wert aufbläht. Ergänzend dazu ergab der paarweise Vergleich der vier Kamptaler Bestände mit der Oberrheinischen Referenzpopulation in jedem Fall höhere F_{ST} -Werte als der paarweise Vergleich innerhalb der Kamptaler Populationen, wodurch sich die Referenzpopulation klar von den Kamptaler Beständen differenziert. Dieses räumliche Muster in der genetischen Struktur der Kamptaler Populationen ist besonders gut in der Hauptkoordinatenanalyse erkennbar, in der die Oberrheinische Population im Raum distanziert von den vier Beständen des Kamptals dargestellt wird (siehe Abbildung 7).

Eine Erklärung für die zwei differenzierten Muster in der genetischen Struktur liegt in der räumlichen Isolation der Untersuchungsgebiete Oberes Rheintal in Deutschland und dem Kamptal in Österreich. Der Genfluss zwischen zwei Populationen nimmt mit zunehmender Entfernung ab. So konnte genetische Drift zur Differenzierung zwischen den entsprechenden Genpools geführt haben, weil der nivellierende Effekt des Genflusses nicht ausreichte, um die Drifteffekte auszugleichen. Der Einfluss von Evolution, aber auch das Auftreten von „Gründereffekten“ im Kamptal, worauf im übernächsten Kapitel näher eingegangen wird, sind Gründe, die zu einer Auseinanderdifferenzierung der lokalen Genpools beigetragen haben.

5.5 Eignung und Vergleich des F_{ST} -Wertes mit D_{JOST} zur Berechnung der genetischen Differenzierung der populationsgenetischen Daten dieser Studie

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Maße der genetischen Differenzierung, nämlich der paarweise F_{ST} -Wert nach WEIR und COCKERHAM (1984) in FSTAT (GOUDET 2003) sowie D_{JOST} nach JOST (2008) in *R* im package *diversity* (KEENAN et al. 2013) miteinander verglichen. Die „traditionellen“ F-Statistiken (F_{ST} -Wert) stehen in der Kritik, für hoch polymorphe Mikrosatellitenmarker nicht geeignet zu sein, da diese negativ mit der Heterozygotie innerhalb der Subpopulationen korrelieren und dadurch die Berechnung der tatsächlichen genetischen Differenzierung verfälschen, insbesondere dann, wenn ein Genort hoch variabel ist (was in der Regel zu einer Erhöhung der Heterozygotie führt (JOST 2008)).

Der Vergleich der paarweise berechneten F_{ST} -Werte und der paarweise berechneten D_{JOST} -Werte ergab, dass die Differenzierung nach D_{JOST} wesentlich geringer ausfällt als es bei den F_{ST} -Werten der Fall ist. Ferner konnte durch die graphische Gegenüberstellung des F_{ST} und des D_{JOST} gezeigt werden, dass die Werte des F_{ST} und D_{JOST} bei einer durchschnittlichen Anzahl von 7,5 Allelen an einem Locus in etwa übereinstimmen. Bei einer geringeren durchschnittlichen Anzahl von 2,5 Allelen pro Locus, vor allem aber bei den hoch polymorphen Genorten, welche mehr als 10 Allele pro Locus besitzen, divergieren der F_{ST} und D_{JOST} beträchtlich. Bei den hoch variablen Genorten ist die Differenzierung nach den Berechnungen von D_{JOST} viel höher als bei den respektiven F_{ST} -Werten.

Die meisten untersuchten Mikrosatellitengenorte dieser Arbeit besitzen jedoch eine durchschnittliche Anzahl zwischen 5 und 10 Allelen. Aus diesem Grund eignet sich die Berechnung des paarweisen F_{ST} für die Daten dieser Arbeit, weil der F_{ST} und D_{JOST} vergleichbar sind und summa summarum dasselbe Verhältnis zwischen den paarweisen Differenzen wiedergeben.

5.6 Abweichendes Muster der genetischen Struktur an Trockenstandort im Kamptal

Ein besonders interessantes Ergebnis dieser Arbeit stellen die paarweisen Differenzierungen der einzelnen Kamptaler Bestände zueinander, und im Speziellen die Differenzierung des Bestandes in *Altenhof* von den übrigen Beständen, dar. Die Untersuchung der genetischen Differenzierung über alle vier Kamptaler Stieleichenbestände verdeutlichte, dass es sich insgesamt doch um recht heterogene Populationen handelt, wie der relativ hohe AMOVA F_{ST} -Genpoolwert von 0,026 zeigt. Im Vergleich dazu ist der AMOVA F_{ST} -Genpoolwert von 1600 Stieleichen Individuen am Oberrhein über 21 Mikrosatellitenloci, welcher mit dem Datensatz aus der Studie von NEOPHYTOU (2014a) in einer eigenständigen Analyse durchgeführt wurde, mit einem Wert von 0,00006 bedeutend niedriger. Auch die paarweisen Vergleiche der vier Kamptaler Bestände ergaben verhältnismäßig hohe F_{ST} -Werte im hundertstel Dezimalstellenbereich, wohingegen die paarweisen F_{ST} -Werte in einer weiteren Arbeit von NEOPHYTOU et al. (2015) am Oberrhein im Durchschnitt 0,008 bei der Stieleiche betragen. Darüber hinaus wies die Population *Altenhof* in der Bayesischen Clusteranalyse ein von den übrigen Populationen verschiedenes genetisches Muster auf. In den paarweisen Vergleichen stellte sich ebenso wie in der Bayesischen Clusteranalyse heraus, dass sich der Trockenstandort *Altenhof* mit höheren paarweisen F_{ST} -Werten tendenziell von den anderen drei Populationen unterscheidet. Dieses Ergebnis ist auch sehr gut in der Hauptkoordinatenanalyse nachvollziehbar, in der die Individuen des Bestandes *Altenhof* distanzierter von den übrigen Individuen dargestellt werden. Laut der mündlichen Auskunft des zuständigen Amtsleiters Peter Leopold der Gemeinde Schönberg am Kamp, kommen die Stieleichen auf dem Steilhang in *Altenhof* naturverjüngt auf, seit man vor geschätzt 20 Jahren begonnen hat, den vorhergehenden Föhrenwald abzuholzen. In Anbetracht der mittleren Bestandesoberhöhe von ca. 7 m, würde diese Angabe auch zutreffen. Eine Bohrkernentnahme im Zuge des ACORN-Projektes wird jedoch exakte Daten zum Alter des Bestandes liefern können. Die Annahme, dass die Population *Altenhof* durch Naturverjüngung entstanden ist, könnte darauf hindeuten, dass die abweichende genetische Struktur dem sogenannten „Gründereffekt“ zuzuschreiben ist. So können das räumliche Muster in der Bayesischen Clusteranalyse sowie die tendenziell höheren paarweisen F_{ST} -Werte damit erklärt werden, dass die Population durch einige wenige Individuen begründet wurde. Das Ergebnis einer „Neubesiedelung“ steht in keinerlei Widerspruch zur Autochthonie des Bestandes, denn auch bei einer erneuten Ansiedelung waren scheinbar autochthone Eichen aus dem Kamptal beteiligt.

Zudem sind die Bäume an diesem Standort trotz felsigem Untergrund und geringer Wasserversorgung etabliert, was ein wichtiger Hinweis auf Trockenadaption sein könnte.

Bestände, welche eine hohe genetische Vielfalt wie die Kamptaler Stieleichen aufweisen, insbesondere die „Trockenpopulationen“, sind von großer Bedeutung für zukünftige Anpassung und könnten sich daher als eine wichtige Saatgutquelle erweisen, um die Klimafitness zukünftiger Eichenwälder zu erhöhen. Ihre erhöhte Diversität bedeutet mehr Möglichkeiten für ein flexibleres sowie resilienteres Agieren gegenüber unvorhersehbaren Umwelteinflüssen.

6. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des internationalen BiodivERsA Projektes „ACORN“ durchgeführt. Ziel des Projektes ist, Saatgutquellen für zukünftige klimafitte Eichenwälder zu selektieren und diese auf andere Standorte zu transferieren, um die Anpassungsfähigkeit für Wälder in der Zukunft zu erhöhen. Dafür wurden in dieser Arbeit vier ausgewählte, benachbarte Stieleichenbestände zu je 30 Individuen im Kamptal (Niederösterreich), mithilfe molekularer Marker der Kern- und Chloroplasten-DNA in Bezug auf (1) ihre Artidentität, (2) refugiale Herkunft und (3) genetische Vielfalt hin untersucht. Zusätzlich wurden zwei Maße der genetischen Differenzierung, der F_{ST} nach WEIR und COCKERHAM (1984) und D nach JOST (2008) (4) auf ihre Eignung zur Berechnung der populationsgenetischen Strukturen dieser Arbeit miteinander verglichen.

Die molekulargenetische Analyse der Kern-DNA bestätigte (1) die Artzugehörigkeit von 118 der insgesamt 120 phänotypisch identifizierten Stieleichen, wobei zwei einen intermediären Genotyp zwischen Stiel- und Traubeneiche aufwiesen. Die Möglichkeit der Zuordnung zu den jeweiligen Arten, sowie die Schätzung des Hybridanteils sind für die Ausweisung erhaltenswerter genetischer Ressourcen von grundlegender Bedeutung.

Die Abstammung der Bestände wiederum wurde aus Genmarkern der mütterlich vererbten Chloroplasten-DNA ermittelt, in der die Spuren der postglazialen Rückwanderung über Generationen erhalten sind. Es konnte nachgewiesen werden, (2) dass die Vorfahren der Kamptaler Stieleichen sowohl aus dem Apennin als auch aus dem Balkan stammen, aber nur wenig Variation innerhalb der Bestände herrscht. Diese Kombination ist auch aus umliegenden Gebieten bekannt (FAIROAK 2021) und lässt auf die Autochthonie der Populationen rückschließen.

Die populationsgenetische Untersuchung innerhalb der vier Stieleichenbestände ergab, (3) dass es sich im Kamptal um verhältnismäßig heterogene Bestände handelt, wenn man den relativ hohen F_{ST} -Genpoolwert mit Ergebnissen von Studien aus dem Oberrhein (Deutschland) vergleicht, in der sich die Stieleichenbestände wesentlich geringer voneinander differenzieren. Das Aufeinandertreffen von zwei verschiedenen nacheiszeitlichen Migrationsrouten im Kamptal, der Einfluss von Evolution- vor allem Gendrift- nach der Rückwanderung, sowie potenzielle „Gründereffekte“ könnten mögliche Erklärungen für die vergleichsweise hohe Differenzierung zwischen den Beständen sein. Es stellte sich nämlich zudem heraus, dass sich einer der Trockenstandorte tendenziell von den anderen drei Populationen unterscheidet. Die Annahme, dass dieser Bestand durch Naturverjüngung entstanden ist, lässt darauf schließen,

dass die abweichende genetische Struktur auf den sogenannten „Gründereffekt“ zurückzuführen ist und die Population aus einigen wenigen Individuen hervorgeht. Trotz felsigem Untergrund und geringer Wasserversorgung sind die Bäume dort etabliert, was ein Hinweis auf Trockenadaptation sein könnte.

Des Weiteren erwiesen sich die Kamptaler Bestände im innerartlichen Vergleich mit einer Stieleichen-Referenzpopulation aus dem Oberrhein (Deutschland) zum Teil als deutlich diverser. Ein Grund dafür könnte das Zusammentreffen von Apennin- und Balkanroute im Kamptal sein, was zu einer erhöhten Diversität des lokalen Genpools führte.

Bestände, welche eine hohe genetische Vielfalt wie die Kamptaler Stieleichen aufweisen, insbesondere die „Trockenpopulationen“, sind von großer Bedeutung für zukünftige Anpassung und könnten sich daher als eine wichtige Saatgutquelle erweisen, um die Klimafitness zukünftiger Eichenwälder zu erhöhen.

Der Vergleich des F_{ST} nach WEIR und COCKERHAM (1984) mit dem D nach JOST (2008) zeigte, dass die Eignung des F_{ST} von der Polymorphie der verwendeten Mikrosatelliten und untersuchten Genorte abhängt. Da die meisten untersuchten Loci dieser Arbeit zwischen 5 und 10 Allele aufweisen, also mäßig und nicht hoch variabel sind, bleiben der F_{ST} und D_{JOST} vergleichbar, wodurch beide gleichermaßen als Maß für die Differenzierung geeignet sind.

Blick in die Zukunft

Die Information über die Artidentität der einzelnen Bäume ist wichtig, da im ACORN-Projekt Trockenanpassung getrennt bei Stiel-, Trauben- und Flaumeiche untersucht wird. Auch aufgrund unterschiedlicher bevorzugter Habitatsansprüche ist es relevant, zwischen den Arten zu unterscheiden, um diese auf den verschiedenen Standorten bestmöglich einsetzen zu können. Von Bedeutung ist ebenso die Erkenntnis über die Autochthonie, denn diese geht mit der Anpasstheit der Bestände einher. Die essenzielle Hypothese des Projektes basiert nämlich darauf, dass natürliche Auslese über mehrere Generationen zur Etablierung trockenstresstoleranter Varianten an den entsprechenden Standorten geführt hat. Um zu überprüfen, ob es tatsächlich zu einer genetischen Anpassung gekommen ist, sind im Projekt zwei verschiedene Ansätze geplant. Einerseits wird eine genomweite Sequenzierung von Altbäumen durchgeführt, die zeigen soll, ob und welche Genvarianten mit ariden Standortsbedingungen assoziiert sind. Andererseits werden die physiologischen und morphologischen Eigenschaften der Nachkommen zwischen trockenen und gut wasserversorgten Standorten in Feldversuchen verglichen. Zusammenhänge zwischen Merkmalausprägungen und genetischer Variation sollen zusätzliche Hinweise der Anpassung

liefern. Da 2020 ein Vollmastjahr war, wurden bereits im Herbst 2020 in Zusammenarbeit mit dem *Bundesforschungszentrum für Wald* (BFW) Samen aus den vier Kamptaler Beständen sowie aus weiteren acht Eichenbeständen in Deutschland und der Schweiz gewonnen. Nun erwarten die Projektpartner mit Spannung die ersten Ergebnisse der Feldversuche mit den Nachkommen der Kamptaler Eichen, die einen weiteren wichtigen Beitrag im ACORN-Projekt zur Untersuchung von Saatgutquellen für klimafitte Eichenwälder leisten.

7. Danksagung

Besonderer Dank gilt meinen Betreuern Ao.Univ.Prof. DI Dr. Eduard Hochbichler und Dr. Charalambos Neophytou. Danke Charalambos für deine professionelle fachliche Anleitung und sehr gute Betreuung, dass du dir trotz vollem Terminkalender immer Zeit für Feedback und Fragen genommen hast oder um mir bei einem Programm weiterzuhelfen und mich mit deiner Begeisterung für das Thema angesteckt hast.

Ευχαριστώ an meine beiden griechischen Kolleginnen, Alexia Malaspina und Alik Papadopoulou für die motivierende, tolle Zusammenarbeit und eure große Unterstützung!

Vielen herzlichen Dank an Dr. Renata Milčevićova, für deine Expertise und unglaubliches Engagement im Labor für uns bis spät in die Nacht, die Wertschätzung und Fürsorge für deine drei Mädels, sodass die Diplomarbeit nicht nur fachlich für mich sehr bereichernd war.

Dem ganzen Team des Instituts für Waldbau (BOKU) ein herzliches Danke für die gute Zusammenarbeit!

Weiters möchte ich mich bei den zuständigen Forstbetrieben, Bezirksoberförster Ing. Martin Koppensteiner und Lukas Kerschbaum (Gutsverwaltung Grafenegg, Tassilo Metternich – Sandor) bedanken, dass sie diese Studie ermöglicht und bei der Suche nach geeigneten Beständen geholfen haben.

Dank gebührt auch Gerald Golesch (BFW) sowie Dipl.-Ing. Matthias Steinparzer, die große Hilfe bei der Beerntung der Bäume leisteten.

Schließlich danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern, dass ihr mir mein Studium ermöglicht und mich auf dem Weg immer unterstützt (und Papa angespornt 😊) habt. Danke liebe Andi für das Korrekturlesen!

DANKE an alle meine Freunde, die mich während des Studiums und der Diplomarbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben und mit denen ich so viele schöne Erlebnisse und Erfahrungen teilen durfte.

8. Literaturverzeichnis

Aas, G. (2008). *Quercus robur*. In: Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U.M., Stimm, B. (2008). *Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie*. 30. Erg.Lfg. 12/02: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA.

Abadie, P., Roussel, G., Dencausse, B., Bonnet, C., Bertocchi, E., Louvet, J.-M., Kremer, A., Garnier, Géré P. (2012). Strength, diversity and plasticity of postmating reproductive barriers between two hybridizing oak species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl.). *J. Evolutionary Biology*, 25, 157–73.

Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J. W., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R. et al. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26, 229–246.

Adkins, S., Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Analytical Biochemistry*, 240, 17-23. PMID 8811874.

Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. A., Wang, T. L., Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, 1 (1), 95–111.

Aitken, S.N., Bemmels, J.B. (2016). Time to get moving: assisted gene flow of forest trees. *Evolutionary Applications*, 9 (1), 271–290.

Alberto, F. J., Aitken, S. N., Alía, R., González-Martínez, S. C., Hänninen, H., Kremer, A., Lefèvre, F., Lenormand, T., Yeaman, S., Whetten, R., Savolainen, O. (2013). Potential for evolutionary responses to climate change – evidence from tree populations. *Global Change Biology*, 19, 1645–1661.

Aldrich, P. R., Michler, C. H., Sun, W., Romero-Severson, J. (2002). Microsatellite markers for northern red oak (*Fagaceae: Quercus rubra*). *Molecular Ecology Notes*, 2, 472-474.

Alfaro, R., Fady, B., Vendramin, G. G., Dawson, I. K., Fleming, R. A., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R.A., Murdock, T., Vinceti, B., Navarro, C. M., Skrøppa, T., Baldinelli, G., El-Kassaby, Y.A., Loo, J. (2014). The role of forest genetic resources in responding to biotic and abiotic factors in the context of anthropogenic climate change. *Forest Ecology and Management*, 333, 76-87.

Applied Biosystems (2005). GeneMapper® Software Version 4.0 Microsatellite Analysis Getting Started Guide. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042039.pdf [abgerufen am 10.06.2021]

Applied Biosystems (2019). SeqStudio™ Genetic Analyzer GETTING STARTED GUIDE. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017464_SeqStudio_v1_1_GSG.pdf&title=R2V0dGl uZyBTdGFy dGVkIE d1aWRlOiBTZXFTdHVkaW8gR2VuZXRpYyBBbmFseXplcg== [abgerufen am 9.6.2021]

- Avvaru, A. K., Sharma, D., Verma, A., Mishra, R. K., Sowpati, D. T. (2020). MSDB: a comprehensive, annotated database of microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 48, Database issue D155–D159. doi: 10.1093/nar/gkz886
- Bacilieri, R., Ducouso, A., Kremer, A. (1995). Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of northwest of France. *Silvae Genetica* 44, 1-9.
- BFW (2020). Die forstlichen Wuchsgebiete Österreichs. <https://www.bfw.gv.at/die-forstlichen-wuchsgebiete-oesterreichs/> [zuletzt abgerufen am: 05.04.2021]
- Bhargava, A., Fuentes, F. F. (2010). Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44, 250–266. doi: 10.1007/s12033-009-9230-4.
- Bohling, J. H., Adams, J. R., Waits, L. P. (2013). Evaluating the ability of Bayesian clustering methods to detect hybridization and introgression using an empirical red wolf data set. *Molecular Ecology*, 22, 74–86.
- Brewer, S., Hely-Alleaume, C., Cheddadi, R., De Beaulieu, J. L., Laurent, J.M., Cuziat, J. (2005). Postglacial history of Atlantic oakwoods: context, dynamics and controlling factors. *Botanical Journal of Scotland*, 57, 41–57.
- Brewer, S., Cheddadi, R., De Beaulieu, J. L., Reille, M. (2002). The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management*, 156, 27–48.
- Burban, C., Petit, R. J., Carcreff, E., Jactel, H. (1999). Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology*, 8, 1593-1602. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00739.x> [zuletzt abgerufen am 20.07.2021]
- Buschbom J., Yanbaev Y., Degen B. (2011). Efficient long-distance gene flow into an isolated relict oak stand. *Journal of Heredity*, 102, 464–472.
- Clark, J. S. (2010). Individuals and the variation needed for high species diversity in forest trees. *Science*, 327, 1129–1132.
- Clark, J. S., Bell, D. M., Hersh, M.H., Kwit, M. C., Moran, E., Salk, C., Stine, A., Valle, D., Zhu, K. (2011). Individual-scale variation, species-scale differences: inference needed to understand diversity. *Ecology Letters*, 14, 1273–1287.
- Coyne, J. A., Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sinauer Associates, Inc. <http://www.joelvelasco.net/teaching/2890/coyneorr04-speciationch1.pdf> [abgerufen am 10.10.2021]
- Csaikl, U.M., Burg, K., Fineschi, S., König, A.O., Mátyás, G., Petit, R.J. (2002). Chloroplast DNA variation of white oaks in the Alpine region. *Forest Ecology Management*, 156, 131-145.
- Curtu, A. L., Gailing, O., Leineman, L., Finkeldey, R. (2007). Genetic Variation and Differentiation Within a Natural Community of Five Oak Species (*Quercus* spp.). *Plant Biology*, 9, 116 – 126.

Deguilloux, M. F., Dumolin-Lapègue, S., Gielly, L., Grivet, D., & Petit, R. J. (2003). A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* 3 (1), 24-27.

Deguilloux, M.F., Pemonge, M.H., Petit, R.J., (2004). Use of chloroplast microsatellites to differentiate oak populations. *Annals of Forest Science*, 61, 825–830.

Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., Mattick, J. S. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. In: *Nucleic Acids Research*, 19 (14), 4008.

Dumolin, S, Demesure, B, Petit R. J. (1995). Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 1253–1256.

Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J. M., Vendramin, G., Sebastiani, F., Plomion, C. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC genomics*, 11 (1), 1-13.

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

Eaton, D. A. R., Hipp, A. L., Gonzalez-Rodriguez, A., Cavender-Bares, J. (2015). Historical introgression among the American live oaks and the comparative nature of tests for introgression. *Evolution*, 69, 2587–2601.

eBOD2 <https://bodenkarte.at/#/center/15.7047,48.5015/zoom/13.8/1/br,false,78,kb> [abgerufen am 18.05.2021]

Ellenberg, H. (1996). *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer, dynamischer und historischer Sicht*. 2. Auflage. Ulmer, Stuttgart, 1095pp.

Englisch, M., Kilian, W. (Hrsg.) (1999). *Anleitung zur Forstlichen Standortskartierung in Österreich*. In Kooperation mit dem Österreichischen Forstverein. FBVA-Berichte, Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Wien, 1999, Nr. 104, 114 Seiten. 2. erweiterte Auflage.

Eriksson, G., Ekberg, I., Clapham, D. (2006). *An Introduction to Forest Genetics*. Genetic Center Department of Plant Biology and Forest Genetics, SLU. Uppsala, Sweden.

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software *STRUCTURE*: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.

Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010). *Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows*. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.

Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2015). Arlequin Ver 3.5.2 USER MANUAL. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>.

Fairoak (2021). <http://www.pierroton.inra.fr/Fairoak/>. [zuletzt abgerufen am 13.08.2021]

Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2003a). Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.

Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. Hartl DL, Clark AG (1997). *Principles of Population Genetics*, 3. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.

Gerber, S., Chadoeuf, J., Gugerli, F., Lascoux, M., Buiteveld, J., Cottrell, J., Dounavi, A., Fineschi, S., Forrest, L. L., Fogelqvist, J., Goicoechea, P., Jensen, J.S., Salvini, D., Vendramin, G. G., Kremer, A. (2014). High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe. *PLoS One* 9(1), e85130. doi:10.1371/journal.pone.0085130

Giesecke, T., Brewer, S. (2018). Notes on the postglacial spread of abundant European tree taxa. *Vegetation History and Archaeobotany*, 27, 337–349.

Goudet, J. (2003). Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet [1995].

Grivet, D., Deguilloux, M., Petit, R.J., Sork, V.L. (2006). Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus* spp.) in California and Europe. *Molecular Ecology*, 15, 4085–4093.

Gugerli, F., Walser, J. C., Dounavi, K., Holderegger, R., Finkeldey, R. (2007). Coincidence of small-scale spatial discontinuities in leaf morphology and nuclear microsatellite variation of *Quercus petraea* and *Q. robur* in a mixed forest. *Annals of Botany*, 99(4), 713–722.

Gugerli, F., C. Sperisen (2010). Genetische Struktur von Waldbäumen im Alpenraum als Folge (post)glazialer Populationsgeschichte. *Schweiz Z Forstwesen*, 161 (6), 207–215.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. J. (2011a). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11, 591–611. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x.

Guichoux, E., Garnier-Géré, P., Lagache, L., Lang, T., Boury, C., Petit, R.J. (2013). Outlier loci highlight the direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology*, 22, 450–462.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Léger, P., Petit, R. J. (2011b). Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology Resources*, 11 (3), 578–585.

Gutsverwaltung Grafenegg. Tassilo Metternich – Sandor. A-3485 Haitzendorf, Grafenegg 1. e-mail: kerschbaum@grafenegg.at, <http://www.forst-grafenegg.at>

Handl, A., Kuhlenkasper, T. (2017). *Multivariate Analysemethoden. Theorie und Praxis mit R*. Berlin: Springer Spektrum. 3. Auflage.

- Hanewinkel, M., Cullmann, D., Schelhaas, M. J. et al. (2013). Climate change may cause severe loss in the economic value of European forest land. *Nature Climate Change*, 3, 203–207.
- Hannan A. J. (2012). Tandem Repeat Polymorphisms. In: Hannan A.J. (eds) *Tandem Repeat Polymorphisms. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY. https://doi-org-1001628q41943.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-1-4614-5434-2_1
- Harris, A. M., DeGiorgio, M. (2017). An Unbiased Estimator of Gene Diversity with Improved Variance for Samples Containing Related and Inbred Individuals of any Ploidy. *Genes Genomes Genetics*, 7 (2), 671-691.
- Hart, S.P., Turcotte, M. M., Levine, J. M. (2019). Effects of rapid evolution on species coexistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 116, 2112–2117.
- Hattemer, H., Bergmann, F., Ziehe, M. (1993). *Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft*. J.D. Sauerländer's Verlag. Frankfurt am Main.
- Hausch, S., Vamosi, S. M., Fox, J. W. (2018). Effects of intraspecific phenotypic variation on species coexistence. *Ecology*, 99, 1453–1462.
- Heller, R., Siegismund, H. R. (2009). Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , $DEST$ and G^*_{ST} : How wrong have we been? *Molecular Ecology*, 18, 2080–2083.
- Holderegger, R. (2017). Genetik im Naturschutz: Eine Übersicht. *WSL Berichte* 60, 7–13.
- Homolka, A. (2013). Stress gene-based diversity of Austrian oak populations. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Universität für Bodenkultur Wien, Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie.
- Höltken, A.K., Buschbom, J., Kätzel, R. (2012). Die Artintegrität unserer heimischen Eichen *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. und *Q. pubescens* Willd. aus genetischer Sicht. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 183 (5/6), 100-110.
- Immel, U.D. (2007). Ausgewählte Aspekte und Anwendungen Y-chromosomaler Short Tandem Repeats (YSTRs). Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) vorgelegt an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Verfügbar unter: <https://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/07H096/prom.pdf> [zuletzt abgerufen am 11.07.2021]
- Jansen, S., Neophytou C. (2021). Lokales Eichensaatgut: Fit für den Klimawandel? *Forstzeitung.at* 2021, 10-12.
- Jansohn, M., Rothhämel S. (Hrsg.) (2012). *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2012. 5. Auflage. S.69.
- Jost, L. (2009). D vs. G_{ST} : Response to Heller and Siegismund (2009) and Ryman and Leimar (2009). *Molecular Ecology*, 18, 2088–2091.
- Jost, L. (2008). G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17, 4015–4026.

- Kampfer, S., Lexer, C., Glossl, J., Steinkellner, H. (1998). Brief report characterization of (GA)n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, 129 (183), 1-86.
- Keenan, K., McGinnity, K., Cross, T.F., Crozier, W.W., Prodöhl, P.A. (2013). *diveRsity*: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 782–788. doi: 10.1111/2041-210X.12067 [zuletzt abgerufen am 10.07.2021]
- König, A. O., Ziegenhagen, B., van Dam, B. C., Csaikl, U. M., Coart, E., Degen, B., Burg, K., de Vries, S. M. G., Petit, R. J. (2002). Chloroplast DNA variation of oaks in Western Central Europe and genetic consequences of human influences. *Forest Ecology Management*, 156, 147–166.
- 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. *Molecular Ecology Resources*, 15 (5), 1179-1191, doi: 10.1111/1755-0998.12387
- Kremer, A., Petit, R. (1993). Gene diversity in natural populations of oak species. *Annales des Sciences Forestières*, 50, 186–202.
- Kremer, A., Kleinschmit, J., Cottrell, J., Cundall, E. P., Deans, J. D., Ducouso, A., König, A. O., Lowe, A. J., Munro, R. C., Petit, R. J. et al. (2002a). Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? *Forest Ecology and Management*, 156, 75–87.
- Kremer, A., Dupouey, J., Deans, J. D., Cottrell, J., Csaikl, U. et al. (2002b). Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western Eumixed oak stands. *Annals of Forest Science*, 59 (7), 777-787.
- Kremer, A., Petit, R. J., Zanetto, A., Fougère, V., Ducouso, A., Wagner, D., Chauvin, C. (1991). Nuclear and organelle gene diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Genetic variation in European populations of forest trees*, 141 – 166.
- Kremer, A., Hipp, A. L. (2020). Oaks: an evolutionary success story. *New Phytologist*, 226, 987 – 1011.
- Lepais, O., Gerber, S. (2011). Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex. *Evolution*, 65, 156–170.
- Lepais, O., Petit, R.J., Guichoux, E., Lavabre, J.E., Alberto, F., Kremer, A., Gerber, S. (2009). Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology*, 18, 2228–2242.
- Lepais, O., Roussel, G., Hubert, F., Kremer, A., Gerber, S. (2013). Strength and variability of postmating reproductive isolating barriers between four European white oak species. *Tree Genetics and Genomes*, 9, 841–853.
- Leroy, T., Louvet, J. M., Lalanne, C., Le Provost, G., Labadie, K., Aury, J. M., Delzon, S., Plomion, C., Kremer, A. (2020a). Adaptive introgression as a driver of local adaptation to climate in European white oaks. *New Phytologist*, 226, 1171–1182.

Leroy, T., Roux, C., Villate, L., Bodénès, C., Romiguier, J., Paiva, J. A. P., Dossat, C., Aury, J.M., Plomion, C., Kremer, A. (2017). Extensive recent secondary contacts between four European white oak species. *New Phytologist*, 214, 865–878.

Leroy, T., Rougemont, Q., Dupouey, J. L., Bodénès, C., Lalanne, C., Belser, C., Labadie, K., Le Provost, G., Aury, J. M., Kremer, A. et al. (2020b). Massive postglacial gene flow between European white oaks uncovered genes underlying species barriers. *New Phytologist*, 226, 1183–1197.

Lexer, C., Kremer, A., Petit, R. J. (2006). Shared alleles in sympatric oaks: recurrent gene flow is a more parsimonious explanation than ancestral polymorphism. *Molecular Ecology*, 15, 2007–2012.

Lind-Riehl, J. F., Sullivan, A. R., Gailing, O. (2014). Evidence for selection on a CONSTANS-like gene between two red oak species. *Annals of Botany*, 113: 967–975.

Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. (2004). *Ecological Genetics – Design, Analysis and Application*. Blackwell Publishing, 326 Seiten.

Lynch, M., Crease, T. J. (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, 7, 377–394.

Malaspina, A. (2020). Genetic identification and genetic variation analysis of native Austrian oak species based on nuclear microsatellites and chloroplast DNA markers (SSRs). Erasmus Traineeship. University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna 2020.

Mátyás, G., Bonfils, P., Sperisen, C. (2002). Autochthon oder allochthon? Ein molekulargenetischer Ansatz am Beispiel der Eiche (*Quercus* spp.) in der Schweiz. *Schweiz Z Forstwesen*, 153, 91–96. DOI: 10.3188/szf.2002.0091.

Mátyás, G., Sperisen, C. (2001). Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial recolonisation of oaks (*Quercus* spp.) across the Swiss Alps. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 12–20.

Melcher, M. (2021). Introduction to Statistical Learning with R. LV-Nr. 851401. Principal Component Analysis PCA. Institute of Statistics (STAT). University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna.

Minol, K. (2021). Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Verfügbar unter: <https://www.pflanzenforschung.de/de/pflanzenwissen/lexikon-a-z/polymerase-kettenreaktion-pcr-227> [abgerufen am 28.05.2021]

Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum, 84-120.

Müller, H.-J., Prange, D. R. (2016). *Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Das Methodenbuch*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 149 Seiten. 2. Auflage. DOI: 10.1007/978-3-662-48236-0. [abgerufen am: 28.05.2021]

Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (Hrsg.) (1994). *The polymerase chain reaction*. Birkhäuser Basel 1994. 1. Auflage. 458 Seiten. DOI: 10.1007/978-1-4612-0257-8. [abgerufen am: 28.05.2021]

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 (3), 583-590. <https://www.genetics.org/content/genetics/89/3/583.full.pdf> [zuletzt abgerufen am 28.07.2021]

Nei, M. (1972). Genetic Distance between Populations. *American Naturalist*, 106, 283-292. <http://dx.doi.org/10.1086/282771> [zuletzt abgerufen am 28.07.2021]

Neophytou, C., Michiels, H.G. (2013). A migration crossroads of middle European oaks. *Forest Ecology and Management*, 304, 89–98.

Neophytou, C. (2010). A study of genetic differentiation and hybridization among oak species with divergent ecological and evolutionary profiles (Doctoral dissertation, Ph.D. thesis.-Rer. Nat., Faculty of Forest and Environmental Sciences, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Germany).

Neophytou, C. (2014). Bayesian clustering analyses for genetic assignment and study of hybridization in oaks: effects of asymmetric phylogenies and asymmetric sampling schemes. *Tree Genetics and Genomes*, 10, 273–285. DOI 10.1007/s11295-013-0680-2.

Neophytou, C. (2014a). Data from: Bayesian clustering analyses for genetic assignment and study of hybridization in oaks: effects of asymmetric phylogenies and asymmetric sampling schemes, Dryad, Dataset, <https://doi.org/10.5061/dryad.b64b4>.

Neophytou, C., Aravanopoulos, F. A., Fink, S., Dounavi, A. (2010). Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecology and Management*, 259 (10), 2026-2035.

Neophytou, C., Konnert, M. (2018). Technical guidelines for molecular genetic analysis in non-native forest tree species of Europe / [chapters edited by Charalambos Neophytou and Monika Konnert]. -1st ed. – Ljubljana : Slovenian Forestry Institute, Silva Slovenica Publishing Centre, 2018. – (Studia Forestalia Slovenica, ISSN 0353-6025; 160). <http://dirros.openscience.si/IzpisGradiva.php?id=9194&lang=slv> [zuletzt abgerufen am: 14.06.2021]

Neophytou, C. (2015). Wirkt sich menschliche Bewirtschaftung auf das Erbgut der Eichen am Oberrhein aus? *Forstarchiv*, 86, 183-193. DOI 10.4432/0300-4112-86-183.

Newton C. R., Graham A., Beginnen K. (Übers.) (1994). PCR. Spektrum, 223pp.

Ohta, T., Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research*, 22, 201-204.

Olalde, M., Ana Herrán, A., Espinel, S., Goicoechea P.G. (2002). White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*, 156, 89–102. Verfügbar unter: http://www.pierroton.inra.fr/Fairoak/Papers2001/fem156_2_1.pdf

Olsson, U. (1975a) A morphological analysis of phenotypes in populations of *Quercus* (Fagaceae) in Sweden. *Bot. Not.* 128, 55–68.

Oney-Birol, S., Fitz-Gibbon, S., Chen, J.-M., Gugger, P. F., Sork, V. L. (2018). Assessment of shared alleles in drought-associated candidate genes among southern California white oak species (*Quercus* sect. *Quercus*). *BMC Genetics*, 19: e88.

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.

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. (2012a). GenAIEx Tutorial 1. Introduction to Population Genetic Analysis. Verfügbar unter: <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Tutorials.html> [zuletzt abgerufen am 08.07.2021]

Peakall, R. and Smouse P.E. (2012b). GenAIEx Tutorial 3. Spatial Genetic Analysis. Verfügbar unter: <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Tutorials.html> [zuletzt abgerufen am 14.07.2021]

Pernès, J. (1984). *Gestion Des Ressources Génétiques. Tome 2: Manuel*. Paris, France: Agence de Coopération Culturelle et Technique.

Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S. König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M.-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B., Kremer, A. (2002a). Chloroplast DNA variation in European white oaks: Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, 156 (1/3), 5-26.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00645-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00645-4). [zuletzt abgerufen am 20.07.2021]

Petit, R.J., Kremer, A., Wagner, D.B. (1993). Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 122–128.

Petit, R.J., Bodénès, C., Ducouso, A., Roussel, G., Kremer, A. (2003). Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*, 161, 151–164.

Petit, R.J., Brewer, S., Bordács, S., Burg, K., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csaikl, U.M., Van Dam, B., Deans, J.D., et al. (2002b). Identification of refugia and postglacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, 156, 49–74.

Petit, R. J., Hampe, A. (2006). Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37, 187–214.

Plomion, C., Aury, J. M., Amselem, J., Leroy, T., Murat, F., Duplessis, S., Faye, S., Francillon, N., Labadie, K., Le Provost, G. et al. (2018). Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nature Plants*, 4, 440–452.

Pons, O., Petit, R. (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered vs. unordered alleles. *Genetics*, 144, 1237-1245. https://www.researchgate.net/publication/14292870_Pons_O_Petit_RJ_Measuring_and_testing_genetic_differentiation_with_ordered_vs_unordered_alleles_Genetics_144_1237-1245 [zuletzt abgerufen am 20.07.2021]

Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000a). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.

Pruett, Ch., Winkler, K. (2008). The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *Journal of Avian Biology*, 39, 252-256. doi: 10.1111/j.2008.0908-8857.04094.x.

QIAGEN (2006): verfügbar unter: <http://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2013/12/DNeasy-Plant-Handbook-for-DNA-purification-Qiagen.pdf> [abgerufen am 26.05.2021]

Rabinow, P. (1996). Making PCR: A Story of Biotechnology. Chicago IL 1996. in: Lexikon der Biologie (Spektrum): <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/polymerasekettenreaktion/52909> [abgerufen am: 28.05.2021]

Rellstab, C., Fischer, M.C., Csencsics, D., Gugerli, F., Holderegger, R. (2017). Bedeutung der lokalen Anpassung in der Naturschutzgenetik. *Forum für Wissen*, 2017, 31-37.

Rellstab, C., Zoller, S., Walthert, L., Bodénès, C., Lesur, I., Pluess, A., Sperisen, C., Kremer, A., Gugerli, F. (2016). Signatures of local adaptation in candidate genes of oaks (*Quercus* spp.) with respect to present and future climatic conditions. *Molecular Ecology*, 25 (23), 5907–5924.

Rieseberg, L. H., J. H. Willis. (2007). Plant speciation. *Science*, 317, 910–914.

Rotach, P. (2001). Skript Forstgenetik. Teil D: Populationsgenetik. Gruppe Waldmanagement – Waldbau. ETH Zürich.

Sáenz-Romero, C., Lamy, J. B., Ducouso, A., Much, B., Ehrenmann, F., Delzon, S., Cavers, S., Chalupka, W., Dagdas, S., Hansen, J. K. et al. (2017). Adaptive and plastic responses of *Quercus petraea* populations to climate across Europe. *Global Change Biology*, 23, 2831–2847.

Sáenz-Romero, C., Kremer, A., Nagy, L., Újvári-Jármay, É., Ducouso, A., Kóczán-Horváth, A., Hansen, J. K., Mátyás, C. (2019). Common garden comparisons confirm inherited differences in sensitivity to climate change between forest tree species. *PeerJ*, 7: e6213.

Savolainen, O., Pyhäjärvi, T., Knürr, T. (2007). Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38, 595–619.

Schmidt, O. (2017). Genetik und Molekularbiologie. Kompaktwissen Biologie. Olaf Fritsche (Hrsg.). Springer Spektrum, Heidelberg.

Scotti-Saintagne, C., Mariette, S., Porth, I., Goicoechea, P. G., Barreneche, T., Bodénès, C., Burg, K., Kremer, A. (2004). Genome Scanning For Interspecific Differentiation Between Two Closely Related Oak Species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics*, 168, 1615-1626.

- Selkoe, K. A., Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615–629.
- Slade, D., Skvorc, Z., Ballian, D., Gracan, J., Papes, D. (2008). The chloroplast DNA polymorphisms of White Oaks of section *Quercus* in the Central Balkans. *Silvae Genetica*, 57, 4–5.
- Slatkin M., (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139 (1), 457-62.
- Stauffer S., Gardner A., Duprez W., Ungu D.A.K., Wismer P. (2018). Mendelian Inheritance. In: Labster Virtual Lab Experiments: Basic Genetics. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. https://doi-org-1001628q41943.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-662-57999-2_1
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., Glössl, J. (1997b). Conservation of (GA) n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6(12), 1189-1194.
- Steinkellner, H., Fluch, S., Turetschek, E., Lexer, C., Streiff, R., Kremer, A., Burg, K., Glössl, J. (1997a). Identification and characterization of (GA/CT) n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*, 33(6), 1093-1096.
- Stinglwagner, G., Haseder, I., Erlbeck R. (2016). Das Kosmos Wald- und Forstlexikon. 5. Auflage. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart.
- Streiff R., Ducouso A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J., Kremer A. (1999). Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology*, 8, 831–841.
- Szpiech, Z.A., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. (2008). ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, 24 (21), 2498–2504.
- Tekpinar, A. D., Aktaş, C., Kansu, Ç., Duman, H., & Kaya, Z. (2021). Phylogeography and phylogeny of genus *Quercus* L. (Fagaceae) in Turkey implied by variations of trnT (UGU)-L (UAA)-F (GAA) chloroplast DNA region. *Tree Genetics & Genomes*, 17(5), 1-18.
- Thermo Fisher Scientific (2012). Fragment Analysis - The Other Half of your Applied Biosystems' Genetic Analyzer. https://www.youtube.com/watch?v=43-OQTLtrwQ&list=PLB17loIhxJk5syYdCGbg5jein8VExvcsl&ab_channel=ThermoFisherScientific [abgerufen am 10.06.2021]
- Thermo Fisher Scientific (2015). How does Fragment Analysis work? <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis.html> [abgerufen am 09.06.2021]
- Van der Knaap, W.O., van Leeuwen, J. F. N., Finsinger, W., Gobet, E., Pini, R., Schweizer, A., Valsecchi, V., Ammann, B. (2005). Migration and population expansion of *Abies*, *Fagus*, *Picea*, and *Quercus* since 15 000 years in and across the Alps, based on pollen-percentage threshold values. *Quaternary Science Reviews*, 24, 645–680.

Weir, B.S., Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.

Weir, B. S. (1996). *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA, USA.

Weising, K., Gardner, R. C. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42 (1), 9-19.

White, T., L., Adams, W., T., Neale, D., B. (Hrsg.) (2007). *Forest Genetics*. CABI. London.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Baumartenzusammensetzung des Bestandes <i>Diendorf am Walde</i>	19
Tabelle 2: Baumartenzusammensetzung des Bestandes <i>Schönberg am Kamp</i>	20
Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten nuklearen Mikrosatellitenmarker, ihre minimalen und maximalen Fragmentlängen (bp) sowie die Fluoreszenzmarkierung der Primer	24
Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chloroplasten-Mikrosatellitenmarker, ihre minimalen und maximalen Fragmentlängen (bp) sowie die Fluoreszenzmarkierung der Primer	24
Tabelle 5: Maße der genetischen Diversität mit Standardfehler (SE) bei den Kamptaler Stieleichen Populationen im Vergleich mit der Oberrheinischen Stieleichen-Referenzpopulation. Die Berechnungen erfolgten in <i>GenAlEx</i> (PEAKALL und SMOUSE 2006, 2012). N_{Ind} = Anzahl der Individuen in den Populationen, A_e = effektive Anzahl der Allele gemittelt über alle Loci für jede Population, H_o = beobachtete Heterozygotie, uH_e = unvoreingenommene erwartete Heterozygotie (nach NEI 1978), H_s = gemittelte, unvoreingenommene erwartete Heterozygotie innerhalb der Populationen, F_{IS} = populationspezifischer Inzuchtkoeffizient	44
Tabelle 6: Mann-Whitney-U-Test zwischen den Kamptaler Populationen und der Oberrheinischen Referenzpopulation, welcher keinen signifikanten Unterschied bezüglich der unvoreingenommene erwartete Heterozygotie (uH_e) ergab	44
Tabelle 7: In <i>Arlequin</i> (EXCOFFIER und LISCHER 2010) berechnete globale AMOVA Ergebnisse für die Kamptaler Populationen (<i>Schönberg, Plank, Altenhof, Diendorf</i>) gewichtet und gemittelt über die 15 Kernmikrosatellitengorte	46
Tabelle 8: In <i>Arlequin</i> (EXCOFFIER und LISCHER 2010) berechnete globale AMOVA Ergebnisse für die Kamptaler Populationen gemeinsam mit der Oberrheinischen Referenzprobe gewichtet und gemittelt über die 15 Kernmikrosatellitengorte	46
Tabelle 9: Ergebnisse der in FSTAT (GOUDET 2003) berechneten paarweisen F_{ST} -Werte nach WEIR und COCKERHAM (1984). (*) Differenzierung = signifikant; (NS) = nicht signifikant	47
Tabelle 10: Ergebnisse der im R package <i>divResity</i> (KEENAN et al. 2013) berechneten paarweisen F_{ST} -Werte nach WEIR und COCKERHAM (1984) mit zugehörigem Konfidenzintervall in []	47
Tabelle 11: Ergebnisse der im R package <i>divResity</i> (KEENAN et al. 2013) berechneten paarweisen Werte von D_{JOST} (2008) mit zugehörigem Konfidenzintervall in []	47
Tabelle 12: Maße haplotypischer Diversität innerhalb der vier Kamptaler Populationen. N_{Ind} = Anzahl der für die Analyse verwendeten Individuen, h_s = haplotypische Diversität innerhalb der Populationen, h_T = gesamte haplotypische Diversität, G_{ST} = Differenzierung zwischen den Populationen, R_{ST} = äquivalenter Koeffizient der Differenzierung (Miteinbezug mutationsbegründeter Unterschiede zwischen den Haplotypen)	51

Tabellen im Anhang

Tabelle B.1: Konzentrationen der insgesamt 122 Kamptaler DNA-Proben *Schönberg* (qro01), *Plank* (qro02), *Altenhof* (qro03), *Diendorf* (qro04) auf zwei 96-er Mikrotiterplatten. Masterplatte 1 (MP1-qro) beinhaltet 96 Proben, Masterplatte 2 (MP2-qro) 26 Proben. Alle Proben wurden 1:1 (10µl DNA + 10µl dH₂O) verdünnt, außer die mit **undiluted!** markierten Samples88

Tabelle B.2.1: TOUCHDOWN-PCR der nuklearen Kombination GeneAmp® PCR System 9700 (AB)89

Tabelle B.2.2: PCR PROGRAMM der Chloroplasten-Kombination GeneAmp® PCR System 9700 (AB)89

Tabelle B.2.3: touchdown-PCR Kombination 1*, Masterplatten 1 und 2 (122 [96 + 26] Proben)
* Die insgesamt 122 Proben wurden auf zwei 96-er Mikrotiterplatten (Masterplatte 1 [96 Proben] und Masterplatte 2 [26 Proben]) aufgeteilt. Die nukleare Kombination wurde aus praktischen Gründen außerdem in Kombination 1 und 2 unterteilt und die PCRs auf mehrere Tage aufgeteilt. Zugehörige Primer siehe Tabellen B.2.3 und B.2.4; Primer quru-GA-1F07 funktionierte nicht und wurde deshalb gestrichen89

Tabelle B.2.4: touchdown-PCR Kombination 2*, Masterplatten 1 und 2 (122 [96 + 26] Proben)90

Tabelle B.2.5: PCR der Chloroplasten-Kombination*, Masterplatte cp (32 Proben)90

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Untersuchungsgebiet Kamptal, Niederösterreich18

Abbildung 2: PCR-Produkte der nuklearen Primer-Kombination einer Multiplex-PCR auf 1,5%igem Agarose Gel (Laufrichtung von oben nach unten). Die PCR wurde als touchdown-PCR (Annealing-Temperaturen 58°C-55°C) in einer 1:30 Verdünnung der DNA-Eluate (26 - 86 ng/μl) durchgeführt. Das Gel lief bei 120V und 80mA 60 Minuten lang. Mehrere Banden bedeuten, dass diese Proben mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge enthalten. Die DNA-Leiter (*Carl Roth* 100 bp-DNA-Leiter, extended) links zeigt 10 Fragmente von 100 bp – 1000 bp und die Fragmentlänge 1500 bp an28

Abbildung 3: Elektropherogramm eines heterozygoten Genotypen am nuklearen Mikrosatellitengenort *PIE215* (DURAND et al. 2010) mit den Allelen 203 und 206. Die (manuell) festgelegten Bins mit einer Breite von i.d.R. 0,8 bp werden als graue Balken dargestellt. Die Abbildung wurde der Software GeneMapper® Software 6 (*AppliedBiosystems*) entnommen30

Abbildung 4: Hierarchische Bayesische Clusteranalyse der 15 Kern-DNA Mikrosatellitengenorte mittels STRUCTURE (nach PRITCHARD et al. 2000a, FALUSH et al. 2003a). Graphische Darstellung der Ergebnisse der STRUCTURE-Clusteranalyse bei einem errechneten Zugehörigkeitskoeffizienten (q-Wert) von K=2. Die abgeleiteten Subpopulation (Cluster, K) sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet, wobei die vertikalen Balken den Individuen entsprechen. Die untersuchten Bestände werden durch schwarze Linien getrennt (Kamptaler Stieleichen: *Schönberg*, *Plank*, *Altenhof*, *Diendorf*; Referenzpopulationen: *REF-gro* = Stieleiche (*Q. robur*), *REF-qpe* = Traubeneiche (*Q. petraea*), *REF-qpu* = Flaumeiche (*Q. pubescens*) aus dem Oberrhein)42

Abbildung 5: Allelreichtum der Stieleichen Bestände des Kamptals im Vergleich zur Referenzpopulation aus dem Oberrhein. Die Untersuchung des Allelreichtums (Engl. „Allelic Richness“) als Maß genetischer Vielfalt zeigt ebenso wie die Ergebnisse in Tabelle 5, dass die Kamptaler Stieleichenbestände eine hohe Diversität aufweisen und sich im Vergleich mit der Oberrheinischen Stieleichen-Referenzpopulation von dieser teilweise klar unterscheiden. Die Anordnung der abgebildeten Bestände ist paarweise nach Standort (trocken vs. frisch) und von Südosten Richtung Nordwesten orientiert45

Abbildung 6: Gegenüberstellung des F_{ST} nach WEIR und COCKERHAM (1984) und D nach JOST (2008) in Abhängigkeit von der \emptyset Anzahl der Allele/Locus für die 15 Kernmikrosatellitengenorte. Die Werte des F_{ST} und D_{JOST} stimmen in etwa überein bei einer \emptyset Anzahl von 7,5 Allelen pro Locus, divergieren jedoch deutlich bei $< 7,5$ Allelen/Locus und noch mehr an hoch polymorphen Genorten > 10 Allele/Locus. F_{ST} und D_{JOST} basierend auf den Daten der Kamptaler Populationen (oben) und gemeinsam mit der Oberrheinischen Referenzpopulation (unten)48

Abbildung 7: Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) zur Darstellung der genetischen Strukturierung der Kamptaler Populationen (*Schönberg*, *Plank*, *Altenhof*, *Diendorf*) und der Oberrheinischen Referenzproben der Stiel- (*gro*-REF), Trauben- (*qpe*-REF) und Flaumeiche (*qpu*-REF). In der PCoA werden die vier Kamptaler Bestände an und für sich recht homogen dargestellt, wobei sich der Trockenstandort *Altenhof* (rot) jedoch tendenziell von den anderen drei Populationen differenziert.....49

Abbildung 8: Minimum Spanning Network (MSN) von Haplotypen. Jeder Kreis repräsentiert einen Haplotypen, siehe NEOPHYTOU und MICHIELS (2013). In den vier Versuchspopulationen im Kamptal wurden ausschließlich die Haplotypen 1 und 6 gefunden. Die Größe der Kreise 1 und 6 entspricht der Häufigkeit des Haplotypen im gesamten Untersuchungsgebiet. Die Referenzproben (9, 6, 12, R6, 24) sind bis auf den Haplotypen 12 alle in Österreich vertreten. Der MSN basiert auf Allellängenunterschiede zwischen den Haplotypen und soll phylogenetische Verwandtschaftsgrade verdeutlichen51

Abbildung 9: Nacheiszeitlichen Rückwanderungswege der im Kamptal auftretenden Haplotypen der Chloroplasten-DNA in Österreich (u. li.) sowie Häufigkeit der Haplotypen der Chloroplasten-DNA in den einzelnen Beständen (europaweiter Farbencode nach FAIROAK 2021)52

11. Glossar

®	eingetragenes Warenzeichen
™	„trade mark“; für eingetragene und nicht eingetragene Waren
°C	Grad Celsius
~	circa
%	Prozent
A	Adenin
Allel	Oft kommt ein Gen an einem bestimmten genetischen Locus bei Organismen in verschiedenen Erscheinungsformen vor, dann spricht man von Allelen. Unterschiedliche Allele können zu unterschiedlichen beobachtbaren, aber auch unsichtbaren Eigenschaften führen, wie beispielsweise Trockenstresstoleranz. Hierbei gibt der Genotyp an, welche Allele bei einem Individuum vorliegen (SCHMIDT 2017, STAUFFER et al. 2018).
AMOVA	Analyse der molekularen Varianz
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cm	Centimeter
dH ₂ O	destilliertes Wasser
diploid	Die meisten multizellulären Organismen sind diploid. Das bedeutet, dass sie zwei Allele für jedes Gen des Kerngenoms besitzen, von jedem Elternteil je eines vererbt. Sind die beiden Allele gleich, ist der Organismus <i>homozygot</i> , sind die Allele unterschiedlich, ist er <i>heterozygot</i> in Bezug auf dieses Gen (SCHMIDT 2017, STAUFFER et al. 2018).
D _{JOST}	<i>D</i> nach JOST (2008) als Maß der genetischen Differenzierung
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESTs	Expressed-Sequence-Tags
et al.	und alii (lat. „und weitere“)
F _{IS}	Inzuchtkoeffizient
F _{ST}	Fixierungsindex
g	Gramm
G	Guanin

Gen	Gene sind der Ausgangspunkt für genetische Variation und Biodiversität in der Welt (WHITE et al. 2007). Die charakteristische Ausprägung von Merkmalen, die jeden Organismus und jedes Individuums auszeichnen, ist in den Genen kodiert und wird durch die Umwelt mitbeeinflusst (SCHMIDT 2017). Ein Gen ist definiert als „die Einheit der Weitergabe genetischer Information von Eltern an ihre Nachkommen“ (sogenanntes „Mendelgen“ nach der Lehre von Gregor Mendel 1866) und noch präziser formuliert, „die Einheit auf der DNA, welche ein bestimmtes Polypeptid kodiert“ („Funktionsgen“) (HATTEMER et al. 1993).
Genetik	Die Wissenschaft der Genetik als Zweig der Biologie widmet sich also der Natur der Gene, ihrer Vererbung und Expression. Sie beschäftigt sich mit der hereditären Variation innerhalb verwandter Organismen und untersucht die Unterschiede und Ähnlichkeiten von Individuen gleicher Abstammung. Die Forstgenetik ist speziell auf Forstbaumarten ausgerichtet (WHITE et al. 2007).
gSSRs	genic Simple-Sequence-Repeats
H_e	erwartete Heterozygotie
H_o	beobachtete Heterozygotie
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
K	Anzahl der Subpopulationen (in STRUCTURE)
kb	Kilobasen
m	Meter
mA	Milliampere
mM	Millimolar
MCMC	Makov Chain Monte Carlo Algorithmus
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
N	Anzahl Individuen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
Phänotyp	Der Phänotyp ist das Resultat des Genotyps, das äußere Erscheinungsbild des Organismus ¹ .

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SSR	Simple-Sequence-Repeats
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, auch Tromethamin, Trometamol
TRIS-HCl	TRIS-Chlorwasserstoff
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic average
UV	ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/w	Massenteile pro Volumen

¹ Merkmale lassen sich in zwei Kategorien einordnen. Bei qualitativen Merkmalen kann man Eigenschaften klar gegeneinander abgrenzen, z.B. durch die weiße oder rote Blütenfarbe. Bei quantitativen Merkmalen findet man einen kontinuierlichen, stetigen Übergang. Sie sind mess- oder zählbar und werden oft von mehreren Allelen oder sogar von mehreren Genen und/oder der Umwelt bestimmt. Die Reaktionsnorm ist der genetisch festgelegte Bereich, in dem sich das Merkmal ausprägen kann, beispielsweise die Größe von Individuen (SCHMIDT 2017).

12. Anhang

Anhang A

Quick-Start Protocol DNeasy[®] Plant Mini Kit

March 2016

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year if not otherwise stated on label.

Further information

- *DNeasy Plant Handbook*: www.qiagen.com/HB-1166
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrates.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor[®], the TissueLyser II or a mortar and pestle.
2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.

Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130 μ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.
4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.

6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.
7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$. Discard the flow-through.
9. Add another 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at $20,000 \times g$.
Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$.
12. Repeat step 11.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, TissueRuptor® (QIAGEN Group). 1101205 03/2016 HB-0542-003 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

Adaptiertes DNA-Extraktionsprotokoll nach QIAGEN (2016):

- 4-maliges Mörsern des vorbereiteten Probenmaterials in der Schwingmühle zu je 2 Minuten mit 30.000 rpm (Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur. Dabei wurden die Plätze der Eppendorf-Röhrchen in der Halterung bei jedem Mahlvorgang gewechselt, da die Proben am Rand besser gemahlen werden als diejenigen in der Mitte.
- Zugabe von 400µl *API* Puffer zu den gemahlten Proben.
- Zugabe von 4µl *RNase A*, um vorhandene RNA enzymatisch zu verdauen und zu entfernen. Vortexen und 20-minütige Inkubation bei 65°C im Wasserblock, zwei- bis dreimaliges Invertieren der Proben während der Inkubationszeit.
- Zugabe von 130µl *P3* Puffer (3,0 Mol Kaliumacetat, pH 5,5) und 5-minütige Inkubation auf Eis, wodurch eine Proteinausfällung bewirkt wird.
- 5-minütiges Zentrifugieren des Lysats bei 14.000 rpm (20.000 x g), wobei sich ein Pellet mit dem Großteil der festen Gewebebestandteile und den ausgefällten Proteinen am Boden des Eppendorf-Röhrchen bildet.
- Pipettieren des Lysats in eine QIAshredder Spinsäule (Silica-Membran), die sich in einem 2ml Sammelröhrchen befindet und zweiminütiges Zentrifugieren bei 14.000 rpm.
- Überführung des Überstandes in ein neues Röhrchen, ohne das Pellet aufzumischen, das sich am Boden gebildet hat. Hinzufügen des 1,5-fachen Volumens an *AW1* Puffer und mischen durch Pipettieren. Die Zugabe von Ethanol in Verbindung mit einem monovalenten Salz führt zur Ausfällung der DNA.
- Überführung von 650µl der Mischung in eine DNeasy Mini Spinsäule (Silica-Membran) in einem 2ml Sammelröhrchen. Einminütiges Zentrifugieren bei 8000 rpm (6000 x g) und anschließendes Wegwerfen des Überstandes. Wiederholung dieses Schrittes mit der verbliebenen Probe.
- Platzierung der Spinsäule in einem neuen Sammelröhrchen. Zugabe von 500µl *AW2* Waschpuffer, um die an die Silica-Membran angelagerte DNA zu reinigen. Einminütiges Zentrifugieren bei 8000 rpm und Wegwerfen des Überstandes.
- Nochmaliges Hinzufügen von 500µl *AW2* Waschpuffer. Zweiminütiges Zentrifugieren bei 14.000 rpm und dabei sehr vorsichtig sein, dass die Silica-Membran mit der aufgereinigten DNA nicht mit dem Überstand in Berührung kommt.
- Transfer der Spinsäule mit der Membran in ein neues 1,5ml EppendorfTube™.
- Hinzufügen von 100µl *AE* Puffer (10 mM Tris-Cl + 0,5 mM EDTA; pH 9,0) zur Elution der an die Silica-Membran gebundenen DNA. 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (15-25°C) und einminütiges Zentrifugieren mit 8000 rpm, Wiederholung dieses letzten Schritts.

Anhang B.1

Tabelle B.1: Konzentrationen der insgesamt 122 Kamptaler DNA-Proben *Schönberg* (qro01), *Plank* (qro02), *Altenhof* (qro03), *Diendorf* (qro04) auf zwei 96-er Mikrotiterplatten. Masterplatte 1 (MP1-qro) beinhaltet 96 Proben, Masterplatte 2 (MP2-qro) 26 Proben. Alle Proben wurden 1:1 (10µl DNA + 10µl dH₂O) verdünnt, außer die mit **undiluted!** markierten Samples

ACORN_Sophia_MP1-qro															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	qro0101 45 ng/µl	qro0109 54,0 ng/µl	qro0117 50,0 ng/µl	qro0125 94,5 ng/µl	qro0203 32,0 ng/µl	qro0211 59,5 ng/µl	qro0219 65 ng/µl	qro0227 48,5 ng/µl	qro0305 34,5 ng/µl	qro0313 34,5 ng/µl	qro0321 55,0 ng/µl	qro0329 53,0 ng/µl			
B	qro0102 38,5 ng/µl	qro0110 87,0 ng/µl	qro0118 63,5 ng/µl	qro0126 103,0 ng/µl	qro0204 41,5 ng/µl	qro0212 7 ng/µl undiluted!	qro0220 26,5 ng/µl	qro0228 39,0 ng/µl	qro0306 49,0 ng/µl	qro0314 50,5 ng/µl	qro0322 57,0 ng/µl	qro0330 57,0 ng/µl			
C	qro0103 42,5 ng/µl	qro0111 53,5 ng/µl	qro0119 59,0 ng/µl	qro0127 47,5 ng/µl	qro0205 20,5 ng/µl	qro0213 6 ng/µl undiluted!	qro0221 2 ng/µl undiluted!	qro0229 13,0 ng/µl	qro0307 56,5 ng/µl	qro0315 48,5 ng/µl	qro0323 47,5 ng/µl	qro0401 53,5 ng/µl			
D	qro0104 37,5 ng/µl	qro0112 43,0 ng/µl	qro0120 39,5 ng/µl	qro0128 4,14 ng/µl undiluted!	qro0206 42,5 ng/µl	qro0214 /	qro0222 77,0 ng/µl	qro0230 12,5 ng/µl	qro0308 54,0 ng/µl	qro0316 29,5 ng/µl	qro0324 37,5 ng/µl	qro0402 33,5 ng/µl			
E	qro0105 36,5 ng/µl	qro0113 54,5 ng/µl	qro0121 56,0 ng/µl	qro0129 49,0 ng/µl	qro0207 4 ng/µl undiluted!	qro0215 9 ng/µl undiluted!	qro0223 /	qro0301 50,5 ng/µl	qro0309 70,0 ng/µl	qro0317 33,0 ng/µl	qro0325 42,0 ng/µl	qro0403 26,5 ng/µl			
F	qro0106 60,5 ng/µl	qro0114 39,5 ng/µl	qro0122 46,5 ng/µl	qro0130 53,5 ng/µl	qro0208 64,5 ng/µl	qro0216 20,5 ng/µl	qro0224 6,5 ng/µl undiluted!	qro0302 48,5 ng/µl	qro0310 53,0 ng/µl	qro0318 36,5 ng/µl	qro0326 35,5 ng/µl	qro0404 44,5 ng/µl			
G	qro0107 68,0 ng/µl	qro0115 46,0 ng/µl	qro0123 85,5 ng/µl	qro0201 37,5 ng/µl	qro0209 59,5 ng/µl	qro0217 /	qro0225 50,5 ng/µl	qro0303 30,0 ng/µl	qro0311 46,5 ng/µl	qro0319 50,5 ng/µl	qro0327 54,0 ng/µl	qro0405 55,0 ng/µl			
H	qro0108 54,5 ng/µl	qro0116 61,0 ng/µl	qro0124 48,0 ng/µl	qro0202 28,0 ng/µl	qro0210 64,5 ng/µl	qro0218 /	qro0226 23,0 ng/µl	qro0304 40,0 ng/µl	qro0312 40,5 ng/µl	qro0320 54,0 ng/µl	qro0328 59,0 ng/µl	qro0406 39,5 ng/µl			
ACORN_Sophia_MP2-qro															
	1	2	3	4	5	6	ng/µl			DNA (µl)			H2O (µl)		
A	qro0407 31,5 ng/µl	qro0415 55,0 ng/µl	qro0423 41,0 ng/µl	qro0431 33,5 ng/µl			< 10			20					0
B	qro0408 86,0 ng/µl	qro0416 45,5 ng/µl	qro0424 48,0 ng/µl	qro0431 /			< 40			10					10
C	qro0409 33,5 ng/µl	qro0417 38,5 ng/µl	qro0425 48,0 ng/µl				41 - 70			10					10
D	qro0410 46,5 ng/µl	qro0418 58,5 ng/µl	qro0426 53,5 ng/µl				71 - 100			10					10
E	qro0411 18,5 ng/µl	qro0419 58,0 ng/µl	qro0427 39,5 ng/µl				101 - 130			10					10
F	qro0412 49,5 ng/µl	qro0420 51,0 ng/µl	qro0428 58,0 ng/µl				131 - 160								
G	qro0413 51,5 ng/µl	qro0421 44,0 ng/µl	qro0429 53,0 ng/µl				161 - 190								
H	qro0414 41,0 ng/µl	qro0422 44,0 ng/µl	qro0430 40,0 ng/µl				191 - 220+								

Anhang B.2

Quercus robur MULTIPLEX-PCR PROTOKOLL (nukleare und cp-Kombination)

Tabelle B.2.1: TOUCHDOWN-PCR der nuklearen Kombination GeneAmp® PCR System 9700 (AB)

Step	Activity	Temperature (C°)	Time (min.)	Number of cycles
1	Initial denaturation	95.0	5:00	1
2	Denaturation	95.0	0:30	10
	Primer annealing	58.0	1:30	
	Extension	72.0	0:30	
3	Denaturation	95.0	0:30	25
	Primer annealing	55.0	1:00	
	Extension	72.0	0:30	
4	Final extension	60.0	30:00	1
	Hold	4.0	infinity	1

Tabelle B.2.2: PCR-PROGRAMM der Chloroplasten-Kombination GeneAmp® PCR System 9700 (AB)

Step	Activity	Temperature (C°)	Time (min.)	Number of cycles
1	Initial denaturation	95.0	5:00	1
2	Denaturation	95.0	0:30	28
	Primer annealing	52.0	1:30	
	Extension	72.0	0:30	
3	Final extension	60.0	30:00	1
	Hold	4.0	infinity	1

PROTOKOLLE DER GRADIENTEN-PCR (58°C-55°C) FÜR DIE NUKLEARE KOMBINATION

Tabelle B.2.3: touchdown-PCR Kombination 1*, Masterplatten 1 und 2 (122 [96 + 26] Proben)

* Die insgesamt 122 Proben wurden auf zwei 96-er Mikrotiterplatten (Masterplatte 1 [96 Proben] und Masterplatte 2 [26 Proben]) aufgeteilt. Die nukleare Kombination wurde aus praktischen Gründen außerdem in Kombination 1 und 2 unterteilt und die PCRs auf mehrere Tage aufgeteilt. Zugehörige Primer siehe Tabellen B.2.3 und B.2.4; Primer quru-GA-1F07 funktionierte nicht und wurde deshalb gestrichen.

Microsatellite PCR Components				KOMBI 1		Microsatellite PCR Components				KOMBI 1	
		inkl. Reserve (10%)						inkl. Reserve (10%)			
Anzahl Reaktionen		96		106		Anzahl Reaktionen		26		29	
Component	Volume/reaction	Total Volume		Component	Volume/reaction	Total Volume		Component	Volume/reaction	Total Volume	
Reaction mix											
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5 ul	530		2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5,0 ul	145		2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5,0 ul	145	
Rnase-free water	3,0 ul	318		Rnase-free water	3,0 ul	87		Rnase-free water	3,0 ul	87	
10x primer mix, 2µM each primer	1 ul	106		10x primer mix, 2µM each primer	1,0 ul	29		10x primer mix, 2µM each primer	1,0 ul	29	
		Σ		954				Σ		261	
Template DNA added at step 4 (≤200 ng DNA/25 µl)	1,0 ul	94		Template DNA added at step 4 (≤200 ng DNA/25 µl)	1,0 ul	26		Template DNA added at step 4 (≤200 ng DNA/25 µl)	1,0 ul	26	
Total volume		10 ul		1060		Total volume		10 ul		290	
Konz:											
normal		4 ul		von jedem Primer		normal		1 ul		von jedem Primer	
tatsächlich		dH ₂ O		Σ		tatsächlich		dH ₂ O		Σ	
1,0 x	QrZAG112	4,2 ul	21,2 ul	106 ul	TD-58°C-55°C	1,0 x	QrZAG112	1,2 ul	5,8 ul	29 ul	
1,0 x	PIE227	4,2 ul				1,0 x	PIE227	1,2 ul			
1,0 x	PIE215	4,2 ul				1,0 x	PIE215	1,2 ul			
1,0 x	QrZAG11	4,2 ul				1,0 x	QrZAG11	1,2 ul			
1,0 x	QpZAG104	4,2 ul				1,0 x	QpZAG104	1,2 ul			
1,0 x	GOT021	4,2 ul				1,0 x	GOT021	1,2 ul			
1,0 x	FIR053	4,2 ul				1,0 x	FIR053	1,2 ul			
1,0 x	GOT004	4,2 ul				1,0 x	GOT004	1,2 ul			
1,0 x	QrZAG96	4,2 ul				1,0 x	QrZAG96	1,2 ul			
1,0 x	quru-GA-1F07	4,2 ul				1,0 x	quru-GA-1F07	1,2 ul			
		22 µl						5 µl			

Tabelle B.2.4: touchdown-PCR Kombination 2*, Masterplatten 1 und 2 (122 [96 + 26] Proben)

Microsatellite PCR Components Kombi. 2				Microsatellite PCR Components Kombi. 2			
		inkl. Reserve (10%)				inkl. Reserve (10%)	
Anzahl Reaktionen	96	106		Anzahl Reaktionen	26	29	

Component	Volume/reaction	Total Volume	Component	Volume/reaction	Total Volume
Reaction mix			Reaction mix		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5,0 ul	530	2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5,0 ul	145
Rnase-free water	3,0 ul	318	Rnase-free water	3,0 ul	87
10x primer mix, 2µM each primer	1,0 ul	106	10x primer mix, 2µM each primer	1,0 ul	29
		Σ 954			Σ 261
Template DNA added at step 4 (≤200 ng DNA/25 µl)	1,0 ul	96	Template DNA added at step 4 (≤200 ng DNA/25 µl)	1,0 ul	26
Total volume	10 ul	1060	Total volume	10 ul	290

Konz:	normal	4 ul	von jedem Primer		TD-58°C-55°C	normal	1 ul	von jedem Primer		
	tatsächlich	dH ₂ O	Σ	tatsächlich			dH ₂ O	Σ		
1,0 x	QpZAG15	4,2 ul	63,6 ul	106 ul		1,0 x	QpZAG15	1,2 ul	17,4 ul	29 ul
1,0 x	PIE099	4,2 ul								
1,0 x	GOT009	4,2 ul								
1,0 x	WAG065	4,2 ul								
1,0 x	FIR039	4,2 ul								
1,0 x	quru-GA-1F02	4,2 ul								
		55,6 µl						14,6 µl		

PROTOKOLL DER PCR (52°C) FÜR DIE CHLOROPLASTEN KOMBINATION

Tabelle B.2.5: PCR der Chloroplasten-Kombination*, Masterplatte cp (32 Proben).

Microsatellite PCR Components				3	
		inkl. Reserve (10%)		35	
Anzahl Reaktionen	32				

Component	Volume/reaction	Total Volume
Reaction mix		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5,0 ul	175
Rnase-free water	3,0 ul	105
10x primer mix, 2µM each primer	1,0 ul	35
		Σ 315
Template DNA added at step 4 (≤200 ng DNA/25 µl)	1,0 ul	32
Total volume	10 ul	350

Konz:	normal	1 ul	von jedem Primer		PCR program normal 52°C		
	tatsächlich	TE buffer	Σ				
1 x	µdt1	1,40 ul	1,4 ul	35 ul			
1 x	ccmp6	1,40 ul					
1 x	µkk4	1,40 ul					
2 x	µdt4	2,80 ul					
1 x	µcd5	1,40 ul					
1 x	µkk3	1,40 ul					
1 x	µcd4	1,40 ul					
1 x	ccmp10	1,40 ul					
1 x	µdt3	1,40 ul					
2 x	ccmp2	2,80 ul					
	SUMME	33,60 ul				25,4	

Die Primer µdt4 und ccmp2 wurden 2x konzentriert!

Anhang C

ADZE Manual nach (SZPIECH et al. 2008)**1.1 Allelic richness**

Consider a locus with I distinct alleles, and define N_{ij} as the number of copies of allele type i in a sample from population j . $N_j = \sum_{i=1}^I N_{ij}$ is the sample size of population j at the locus. The probability of finding no copies of allele type i in a subsample of size g alleles from population j is

$$Q_{ijg} = \frac{\binom{N_j - N_{ij}}{g}}{\binom{N_j}{g}}. \quad (1)$$

Then the probability of finding at least one copy of allele type i in a sample of size g alleles from population j is $P_{ijg} = 1 - Q_{ijg}$, and

$$\hat{\alpha}_g^{(j)} = \sum_{i=1}^I P_{ijg} \quad (2)$$

is the estimated allelic richness of a sample of size g from population j (Hurlbert, 1971; Petit *et al.*, 1998; Kalinowski, 2004). Equation 2 estimates the expected number of distinct alleles that will be observed in population j in a sample of size g .

1.2 Private allelic richness

Using this notation, the estimated private allelic richness for a sample size g from population j can be written as

$$\hat{\pi}_g^{(j)} = \sum_{i=1}^I \left[P_{ijg} \left(\prod_{\substack{j'=1 \\ j' \neq j}}^J Q_{ij'g} \right) \right], \quad (3)$$

where J is the total number of populations (Kalinowski, 2004). This formula sums over distinct allele types, i , the probability that a random subsample of size g from population j contains allele type i and that subsamples of size g from the remaining populations do not contain i .

1.3 Private allelic richness for a combination of populations

Generalizing the concept of private allelic richness, we can consider the number of distinct alleles private to some combination of k populations selected from $\{1, 2, \dots, J\}$. Consider a set of J populations labeled 1 to J , and let $\mathcal{S} = \{1, 2, \dots, J\}$. Let \mathcal{C}_k be the set of all possible combinations of k elements from \mathcal{S} . There are $\binom{J}{k}$ possible combinations in \mathcal{C}_k . We label these combinations by \mathcal{C}_{km} , where m ranges from 1 to $\binom{J}{k}$. Using the following equation we can

calculate $\hat{\pi}_{gk}^{(m)}$ —the estimated number of distinct alleles private to the m th combination of k populations, when samples of size g are drawn from each of the J populations:

$$\hat{\pi}_{gk}^{(m)} = \sum_{i=1}^I \left[\left(\prod_{j \in \mathcal{C}_{km}} P_{ijg} \right) \left(\prod_{j' \in \mathcal{S} \setminus \mathcal{C}_{km}} Q_{ij'g} \right) \right]. \quad (4)$$

$\mathcal{S} \setminus \mathcal{C}_{km}$ denotes the set \mathcal{S} excluding the elements of \mathcal{C}_{km} . For $k = 1$, $\hat{\pi}_{gk}^{(m)}$ reduces to private allelic richness as in Equation 3. For $k = J - 1$, Equation 4 can be considered a measure for “missing allelic richness”, and it reduces to

$$\hat{\mu}_g^{(j)} = \sum_{i=1}^I \left[Q_{ijg} \left(\prod_{\substack{j'=1 \\ j' \neq j}}^J P_{ij'g} \right) \right]. \quad (5)$$

In this equation, $\hat{\mu}_g^{(j)}$ gives a sample size-corrected measure of the number of distinct alleles found in all populations other than population j .

1.4 Summary statistics

ADZE implements these calculations (Equations 2–4) at each of many loci in a data set, and its primary method of reporting results gives the mean, variance, and standard error of the mean across these loci. Section 4.3 has information on how to output locus-specific estimates in addition to the summary statistics. The mean across loci is calculated at each g and for each population (or population grouping) in the following manner:

$$\bar{x} = \frac{1}{L} \sum_{\ell=1}^L x_{\ell}, \quad (6)$$

where L is the total number of loci used in the calculations, and x_{ℓ} is one of the statistics described in the above sections calculated at locus ℓ . Variance across loci is calculated at each g and for each grouping as

$$s^2 = \frac{1}{L-1} \sum_{\ell=1}^L (x_{\ell} - \bar{x})^2, \quad (7)$$

and standard error is calculated at each g and for each grouping as

$$S_E = \frac{s}{\sqrt{L}}. \quad (8)$$