Vom Fachbereich VI (Geographie/Geowissenschaften) der Universität Trier

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Molekulargenetische Untersuchungen zur Variabilität der Fichte (*Picea abies* [L.] Karst.) in Deutschland

vorgelegt von

Markus Quack

Trier, 2004

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller

Berichterstattende: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller, PD Dr. Martin Paulus

Datum der Disputation: 28.04.2004

Danksagung

Das Arbeiten mit sich ständig weiterentwickelnden modernen Verfahren ist spannend und motivierend, erfordert aber auch viel Ausdauer und den Mut zum richtigen Zeitpunkt einen Schlussstrich zu ziehen. Da mir diesbezüglich Anstöße von Freunden und Kollegen hilfreich waren, möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller, dass er mir diese Arbeit ermöglichte und mir bei der Durchführung jeglichen Freiraum ließ.

Den Herren Dr. V. Konnert (Nationalparkverwaltung Berchtesgaden), K. Freyer (Bayerische Staatsforstverwaltung), Dr. H. Rall (Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald), A. Rommerskirchen (Nationalparkverwaltung Hochharz) möchte ich für Unterstützung bei den Recherchen zur Herkunft der Fichtenbestände von Berchtesgaden, Bayerischem Wald und Harz danken.

Den Herren PD Dr. Martin Paulus und apl. Prof. Dr. Willy Werner danke ich für die Durchführung der Probenahmen in Belau und im Hunsrück. Im Rahmen dessen möchte ich mich auch bei allen Kollegen der Umweltprobenbank des Bundes für die Unterstützung bei den Probenahmen sowie für das gute Arbeitsklima und für den „Spaß an der Arbeit“ bedanken.

Herrn Dr. Ralf Kautenburger danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und für die Beantwortung zahlreicher labortechnischer und chemischer Fragen.

Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. Roland Klein bedanken, dessen Diskussionsbereitschaft ich sicherlich hätte häufiger nutzen können.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Judith und meinen Eltern für die Unterstützung während der vergangenen Jahre.

Inhaltsverzeichnis

1 Problemstellung und Zielsetzung 1

2 Stand der Forschung 5

2.1 Systematik, Einwanderungsgeschichte und Verbreitung 5
2.2 Standortfaktoren 10
2.3 Morphologische Variabilität der Fichte 11
2.4 Genetische Variabilität der Fichte 15
2.4.1 Isoenzymanalysen 15
2.4.2 DNA-gestützte Verfahren 17
2.5 Geeignete Markertypen 19
2.5.1 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 25
2.5.2 Inter simple sequence repeats (ISSR) 27
2.5.3 Simple sequence repeats (SSR) 28
2.5.4 Expressed sequence tags (EST) 30

3 Untersuchungsgebiete und Beschreibung der Untersuchungsflächen 32

3.1 Untersuchungsgebiete innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes 35
3.1.1 Nationalpark Berchtesgaden 35
3.1.2 Nationalpark Bayerischer Wald 36
3.1.3 Nationalpark Hochharz 38
3.2 Untersuchungsgebiete außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes 39
3.2.1 Saarländischer Verdichtungsraum (Warndt) 39
3.2.2 Hunsrück 41
3.2.3 Naturpark Solling-Vogler 41
3.2.4 Bornhöveder Seengebiet (Belauer See) 42

4 Material und Methoden 44

4.1 Material 44
4.1.1 Probenmaterial 44
4.1.2 Puffer und Lösungen 45
4.2 Methoden 45
4.2.1 Morphologische und biometrische Charakterisierung 45
4.2.2 DNA-Isolierung 46
4.2.3 RAPD-Analyse 46
4.2.4 ISSR-Analyse 49
4.2.5 SSR-Analyse 50

4.2.6 EST-Analyse 52
4.3 Statistische Auswertung 54
4.3.1 Deskriptive Verfahren 55
4.3.1.1 Ähnlichkeitsmaß 55
4.3.1.2 Clusteranalyse 56
4.3.1.3 Faktorenanalyse 57
4.3.2 Populationsgenetische Analysen 57
4.3.2.1 Allelfrequenz 57
4.3.2.2 Genetische Diversität 58
4.3.2.3 Populationsunterteilung 60
4.3.2.4 Genetische Distanz 60
4.3.2.5 Genfluss 61
4.3.2.6 Genetische Variation in Untergruppen 61

5 Ergebnisse 63

5.1 Morphologisch-biometrische Charakterisierung der untersuchten Individuen 63
5.2 Populationsgenetische Analyse der Einzelbäume 75
5.2.1 RAPD-PCR 75
5.2.1.1 Genetische Ähnlichkeit 77
5.2.1.2 Genetische Distanz und Genfluss 82
5.2.1.3 Genetische Diversität 88
5.2.1.4 Zusammenfassung 91
5.2.2 ISSR-PCR 92
5.2.2.1 Genetische Ähnlichkeit 93
5.2.2.2 Genetische Distanz und Genfluss 97
5.2.2.3 Genetische Diversität 101
5.2.2.4 Zusammenfassung 103
5.2.3 SSR-PCR 105
5.2.3.1 Genetische Ähnlichkeit 109
5.2.3.2 Genetische Distanz und Genfluss 111
5.2.3.3 Genetische Diversität 114
5.2.3.4 Zusammenfassung 116
5.2.4 EST-PCR 118
5.2.4.1 Genetische Ähnlichkeit 121
5.2.4.2 Genetische Distanz und Genfluss 123
5.2.4.3 Genetische Diversität 124
5.2.4.4 Zusammenfassung 125
5.2.5 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aller verwendeten Markersysteme 126
5.3 Exkurs: RAPD- und ISSR-Analyse eines autochthonen Fichtenbestandes 130
5.4 Exkurs: Molekulargenetische Untersuchungen von Poolproben 148

6 Diskussion 156

6.1 Material und Methoden 156

6.1.1 Probenmaterial 156

6.1.2 Stichprobengröße 157

6.1.3 DNA-Isolierung 161

6.1.4 Anwendung der molekulargenetischen PCR-Verfahren 162

6.2 Diskussion der Ergebnisse der morphologisch-biometrischen Charakterisierung 170

6.3 Diskussion der populationsgenetischen Analysen – Zusammenfassende Betrachtung aller verwendeten molekulargenetischen Markersysteme 173

6.3.1 Genetische Differenzierung zwischen Populationen 174

6.3.2 Genetische Variabilität innerhalb der Population 181

6.3.3 Genetische Variation der Art *Picea abies* 186

6.4 Zusammenhang zwischen Morphologie/Biometrie und Genetik 188

7 Zusammenfassung 191

8 Literatur 193

Anhang 220

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Karte der Verbreitung von Picea abies und P. abies var. ‘obovata’ in Eurasien (aus Schmidt-Vogt 1977) 6
Abb. 2: Natürliches Verbreitungsgebiet von Picea abies in Europa (aus Schmidt-Vogt 1977) 7
Abb. 3: Eiszeitliche Refugien und Verbreitungsgeschichte von Picea abies (aus Schmidt-Vogt 1977) 7
Abb. 4: Herkunftsgebiete für das Ausbringen von Picea abies in Deutschland gemäß Forstsaat-Herkunftsgebietsverordnung vom 7. Oktober 1994 (Quelle: AID 1164/1996)..... 10
Abb. 5: Zapfenschuppenformen von Picea abies var. acuminata, var. europaea und var. obovata mit ihren Übergangsformen (nach Priehäusser 1958 und Schmidt-Vogt 1977) 12
Abb. 6: Verzweigungstypen mit ihren Übergangsformen: Kammfichte (links), Bürstenfichte (Mitte), Plattenfichte (rechts) (nach Priehäusser 1958 und Schmidt-Vogt 1977)..... 13
Abb. 7: Schematische Darstellung des PCR-Prinzips (aus Knippers 1997)..... 24
Abb. 8: Schematische Darstellung der Trennung der SSR-Amplifikationsprodukte durch Kapillarelektrophorese 29
Abb. 9: Schematische Darstellung der Trennung der SSR--Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese.... 29
Abb. 10: Karte der Verteilung der Untersuchungsgebiete in Deutschland 33
Abb. 11: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Nationalpark Berchtesgaden (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000) 36
Abb. 12: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Nationalpark Bayerischer Wald (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000) 37
Abb. 13: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Nationalpark Hochharz sowie der zusätzlich ausgewählten Fläche mit vermutlich autochthonen Fichten (gelb) (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000) 38
Abb. 14: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Warndt (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)..... 40
Abb. 15: Karte der Untersuchungsflächen (rot) im Hunsrück (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)..... 41
Abb. 16: Karte der Untersuchungsflächen (rot) im Naturpark Solling-Vogler (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000) 42
Abb. 17: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Bornhöveder Seengebiet (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000) 43
Abb. 18: Schematische Darstellung der Auswertung eines Elektrophoresegels durch Festlegung eines reproduzierbaren Auswertebereichs und Übertrag der Informationen in eine 0/1-Matrix..... 55
Abb. 19: Stammumfänge [cm] der beprobten Individuen 64
Abb. 20: Baumhöhen [m] der beprobten Individuen..... 65
Abb. 21: Trieblängen [mm] der beprobten einjährigen Fichtentriebe 66
Abb. 22: Tausendnadelgewichte [g] der beprobten Individuen 67
Abb. 23: Benadelungsgrade [Summen%] der beprobten Individuen 68
Abb. 24: Nadel-Trockengewichte [g] von jeweils 25 zufällig ausgewählten Trieben 69
Abb. 25: Spross-Trockengewichte [g] von jeweils 25 zufällig ausgewählten Trieben 69
Abb. 26: Stammumfang-Baumhöhen-Relationen der beprobten Individuen..... 70
Abb. 27: TNG-Trieblänge-Relationen der beprobten Individuen..... 71
Abb. 28: Trieblänge-Triebgewicht-Relationen der beprobten Individuen 72
Abb. 29: Box&Whisker-Plots der für die beiden angenommenen Gruppen ermittelten morphologischen Parameter 74
Abb. 30: Box&Whisker-Plots der für die beiden angenommenen Gruppen errechneten biometrischen Relationen 75
Abb. 31: Beispielhafte Darstellung eines RAPD-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Bayerischer Wald mit Primer D19 (links: Fragmentlängenstandard) 77

Abb. 32: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels RAPD untersuchten Bestände ... 78

Abb. 33: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels RAPD untersuchten Bestände ... 79

Abb. 34: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der mittels RAPD ermittelten binären Daten (Varimax rotiert) (Komponentenmatrix im Anhang IX) ... 79

Abb. 35: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) (Varimax rotiert) ... 80

Abb. 36: Box&Whisker-Plots der durchschnittlichen genetischen Distanzen (nach Lynch & Milligan 1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen ... 83

Abb. 37: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Lynch & Milligan 1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen (UPGMA, Eukl. Distanzen) ... 84

Abb. 38: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen (UPGMA, Eukl. Distanzen) ... 85

Abb. 39: Unrooted tree der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen (UPGMA, modifiziert nach Neigbor-Methode mittels PHYLIP 3.5) ... 86

Abb. 40: Regressionsanalyse zur Überprüfung des isolation by distance-Modells mit RAPD-Distanz-Daten nach Lynch & Milligan (1994) (y = 3E-06*x + 0,0631) ... 87

Abb. 41: Beispielhafte Darstellung eines ISSR-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Harz mit Primer (CA)6RG (links: Fragmentlängenstandard) ... 92

Abb. 42: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels ISSR untersuchten Bestände ... 94

Abb. 43: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels ISSR untersuchten Bestände ... 94

Abb. 44: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der mittels ISSR ermittelten binären Daten (Varimax rotiert) (Komponentenmatrix im Anhang X) ... 95

Abb. 45: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) (Varimax rotiert) ... 95

Abb. 46: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Lynch & Milligan 1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen ... 98

Abb. 47: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen ... 99

Abb. 48: Unrooted tree der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen (UPGMA, modifiziert nach Neigbor-Methode mittels PHYLIP 3.5) ... 100

Abb. 49: Regressionsanalyse zur Überprüfung des isolation by distance-Modells mit ISSR-Distanz-Daten nach Lynch & Milligan (1994) (y = 8E-05*x + 0,1094) ... 101

Abb. 50: Beispielhafte Darstellung eines SSR-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Berchtesgaden mit Primer SpAGD1 (Pfeile: stutter bands) ... 106

Abb. 51: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der SSR-Alleltypenhäufigkeiten mit den SSR-Primern SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8 (Varimax rotiert) ... 110

Abb. 52: Unrooted tree der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels SSR untersuchten Beständen (UPGMA, modifiziert nach Neigbor-Methode mittels PHYLIP 3.5) ... 112

Abb. 53: Regressionsanalyse zur Überprüfung des isolation by distance-Modells mit SSR-Distanz-Daten nach Nei (1972) (y = -0,0001*x + 0,1527) ... 113

Abb. 54: Beispielhafte Darstellung eines EST-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Berchtesgaden mit Primer PA0066 ... 119

Abb. 55: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der EST-Alleltypenhäufigkeiten mit den EST-Primern PA0034, PA0043 und PA0066 (Varimax rotiert) ... 122

Abb. 56: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels RAPD untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten ... 131

Abb. 57: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels RAPD untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten ... 132

Abb. 58: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels ISSR untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 133

Abb. 59: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels ISSR untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 133

Abb. 60: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (Varimax rotiert) 134

Abb. 61: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (Varimax rotiert)..... 135

Abb. 62: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Lynch & Milligan 1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, Eukl. Distanzen) 138

Abb. 63: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Lynch & Milligan 1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, Eukl. Distanzen) 140

Abb. 64: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, Eukl. Distanzen)..... 141

Abb. 65: Unrooted tree der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, modifiziert nach Neigbor-Methode mittels PHYLIP 3.5)..... 141

Abb. 66: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 142

Abb. 67: Unrooted tree der genetischen Distanzen (nach Nei 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, modifiziert nach Neigbor-Methode mittels PHYLIP 3.5)..... 143

Abb. 68: Schematische Darstellung der Unterschiede in der statistischen Auswertung von Populationen aus Einzelindividuen und Poolproben 149

Abb. 69: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (SM) der mittels RAPD untersuchten Poolproben 151

Abb. 70: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Rohdaten der gepoolten Proben (Varimax rotiert)..... 151

Abb. 71: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Rohdaten der gepoolten Proben (Varimax rotiert)..... 153

Abb. 72: Beispielhafte Darstellung eines SSR-Elektrophoresegels der Poolproben mit Primer SpAC1F7 (v.l. Be, BW, Ha, Hu, So, Tr, Wa, BS) (links: Fragmentlängenstandard) 154

Abb. 73: Beispielhafte Darstellung eines SSR-Elektropherogramms der Poolproben mit Primer SpAGC2 (v.l.o.n.r.u. Be, BW, Ha, Hu, So, Tr, Wa, BS) (rot = Standard ROX 500)..... 154

Abb. 74: Beispielhafte Darstellung eines EST-Elektrophoresegels der Poolproben mit Primer PA0034 (v.l. Be, BW, Ha, Hu, So, Tr, Wa, BS) 155

Abb. 75: Abhängigkeit der genetischen Ähnlichkeit (BSR) von der Zahl in die Untersuchung einbezogener Individuen am Beispiel der Population von Berchtesgaden (RAPD-Daten)..... 159

Abb. 76: Abhängigkeit der genetischen Diversität (nach Lynch & Milligan 1994) von der Zahl in die Untersuchung einbezogener Individuen (RAPD-Daten) 160

Abb. 77: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der je nach RAPD-Primer ermittelten genetischen Diversität (nach Lynch & Milligan 1994) zur Überprüfung der Abhängigkeit der Ergebnisse vom verwendeten RAPD-Primer (Varimax rotiert)..... 164

Abb. 78: Zusammenhang zwischen Trieblänge [mm] einjähriger Fichtentriebe und der Höhenlage über NN (Datenquelle: Umweltprobenbank des Bundes, unveröffentlicht) 173

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Herkunftsgebiete für Picea abies in Deutschland (nach Forstsaatgut-Herkunftsgebietsverordnung vom 07.10.1994, BML 1994) 9

Tab. 2: Arbeitsschwerpunkte isoenzymatischer Untersuchungen mit Picea abies 16

Tab. 3: Arbeitsschwerpunkte molekulargenetischer Analysen mit Picea abies 19

Tab. 4: Eigenschaften verschiedener genetischer Marker und ihre Eignung für populationsgenetische Untersuchungen (verändert nach Bergmann & Leinemann 2000, Glaubitz & Moran 2000 und Riegel 2001); +++ sehr gut, ++ gut, + ausreichend, - ungeeignet 20

Tab. 5: Liste der bis 2001 mittels RAPD-Analyse untersuchten Pinaceae-Arten 26

Tab. 6: Übersicht über ausgewählte Standortfaktoren in den Untersuchungsgebieten (nach Paulus et al. 1997, Bartel & Quack 2000, Bartel et al. 2002, 2003a) 32

Tab. 7: Zuordnung der ausgewählten UPB-Probenahmeflächen bzw. der Untersuchungsgebiete zu den Hauptökosystemtypen 33

Tab. 8: Geographische Entfernungen [km Luftlinie] zwischen den Untersuchungsgebieten 34

Tab. 9: Übersicht über die Untersuchungsflächen, Probenahmetermine und verwendeten Stichprobengrößen 44

Tab. 10: Eckdaten der verwendeten RAPD-Primer (vgl. auch Anhang IV) 48

Tab. 11: Eckdaten der verwendeten ISSR-Primer; Abkürzungen für mixed base positions: R= (A,G); Y= (C,T) 49

Tab. 12: Eignung der von Pfeiffer et al. (1997) entwickelten SSR-Primer zur Differenzierung von Picea abies-Beständen 51

Tab. 13: Eckdaten der verwendeten SSR-Primer (nach Pfeiffer et al. 1997) 51

Tab. 14: PCR-Programme für EST-PCR mit Picea abies (nach Schubert et al. 2001) 52

Tab. 15: Beschreibung der Fichten-cDNA-Sequenzen, die für die Entwicklung von EST-Markern herangezogen wurden (nach Riegel 2001) 53

Tab. 16: Eckdaten der verwendeten EST-Primer (nach Riegel 2001) 53

Tab. 17: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Stammumfänge (vgl. Abb. 19) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05) 64

Tab. 18: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Baumhöhen (vgl. Abb. 20) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05) 65

Tab. 19: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Trieblängen (vgl. Abb. 21) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05) 66

Tab. 20: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Stammumfang-Baumhöhen-Relationen (vgl. Abb. 26) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05) 70

Tab. 21: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der TNG-Trieblänge-Relationen (vgl. Abb. 27) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05) 71

Tab. 22: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Trieblänge-Triebgewicht-Relationen (vgl. Abb. 28) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05) 72

Tab. 23: Markerzahl (nM) und Anzahl polymorpher Marker (np), aufgeschlüsselt nach verwendeten RAPD-Primern 75

Tab. 24: Abundanzen [%] ausgewählter RAPD-Marker in den untersuchten Populationen 76

Tab. 25: Ähnlichkeitsmaße (BSR) innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen 78

Tab. 26: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen (vgl. Abb. 35) (Die Rotation ist in 6 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung) 80

Tab. 27: Anzahl polymorpher Marker sowie beobachtete und effektive Allelzahl in den mittels RAPD untersuchten Beständen (nach Nei 1987) 81

Tab. 28: Genetische Identitäten nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen 81

Tab. 29: Genetische Distanzen nach Lynch & Milligan (1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen 82

Tab. 30: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der genetischen Distanzen (vgl. Abb. 36) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)..... 83

Tab. 31: Genetischen Distanzen nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Populationen..... 85

Tab. 32: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen (RAPD)..... 88

Tab. 33: Genetische Diversität nach Lynch & Milligan (1994) innerhalb der mittels RAPD untersuchten Bestände (aufgegliedert nach RAPD-Primern)..... 89

Tab. 34: Genetische Diversität nach Lynch & Milligan (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen..... 89

Tab. 35: Single-Population Descriptive Statistics der mittels RAPD untersuchten Bestände (nach Nei 1987)..... 90

Tab. 36: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels RAPD untersuchten Gruppen..... 90

Tab. 37: Markerzahl (nM) und Anzahl polymorpher Marker (np), aufgeschlüsselt nach verwendeten ISSR-Primern 92

Tab. 38: Ähnlichkeitsmaße (BSR) innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen..... 93

Tab. 39: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen (vgl. Abb. 45) (Die Rotation ist in 8 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)..... 96

Tab. 40: Anzahl polymorpher Marker sowie beobachtete und effektive Allelzahl in den mittels ISSR untersuchten Beständen (nach Nei 1987)..... 96

Tab. 41: Genetische Identitäten nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen..... 97

Tab. 42: Genetische Distanzen nach Lynch & Milligan (1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen 97

Tab. 43: Genetische Distanzen nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen..... 99

Tab. 44: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen (ISSR)..... 101

Tab. 45: Genetische Diversität nach Lynch & Milligan (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen..... 102

Tab. 46: Single-Population Descriptive Statistics der mittels ISSR untersuchten Bestände (nach Nei 1987)..... 103

Tab. 47: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels ISSR untersuchten Gruppen..... 103

Tab. 48: Übersicht über die je nach Primer amplifizierten SSR-Produktgrößen..... 105

Tab. 49: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit SSR-Primer SpAGD1..... 107

Tab. 50: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit SSR-Primer SpAGG3..... 107

Tab. 51: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit SSR-Primer SpAC1H8..... 108

Tab. 52: Heterozygotiegrade [%] der mittels SSR untersuchten Bestände, Gesamtdarstellung über die SSR-Primer SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8..... 109

Tab. 53: Anzahl nachgewiesener SSR-Alleltypen; aufgeschlüsselt nach Population und Primer..... 109

Tab. 54: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der SSR-Alleltypenhäufigkeiten mit den SSR-Primern SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8 (vgl. Abb. 51) (Die Rotation ist in 9 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)..... 110

Tab. 55: Genetische Identitäten nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels SSR untersuchten Beständen..... 111

Tab. 56: Genetische Distanzen nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels SSR untersuchten Beständen..... 112

Tab. 57: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen (SSR)..... 113

Tab. 58: Single-Population Descriptive Statistics der mittels SSR untersuchten Bestände (nach Nei 1987)..... 114

Tab. 59: Heterozygotie-Statistik der mittels SSR untersuchten Bestände..... 114

Tab. 60: Diversitätsmaße (nach Shannon 1949, nach Nei 1987) der mittels SSR untersuchten Bestände; aufgeschlüsselt nach SSR-Primern..... 115

Tab. 61: Single-Population Descriptive Statistics der mittels SSR untersuchten Gruppen (nach Nei 1987)..... 116

Tab. 62: Heterozygotie-Statistik der mittels SSR untersuchten Gruppen 116

Tab. 63: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels SSR untersuchten Gruppen 116

Tab. 64: Übersicht über die je nach EST-Primer amplifizierten Produktgrößen (durch cDNA-Sequenz zu erwartende Fragmentgrößen sind unterstrichen) 118

Tab. 65: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit EST-Primer PA0034 119

Tab. 66: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit EST-Primer PA0043 120

Tab. 67: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit EST-Primer PA0066 120

Tab. 68: Heterozygotiegrade [%] der mittels EST untersuchten Bestände, Gesamtdarstellung über die EST-Primer PA0034, PA0043 und PA0066 121

Tab. 69: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der EST-Alleltypenhäufigkeiten mit den EST-Primern PA0034, PA0043 und PA0066 (vgl. Abb. 55) (Die Rotation ist in 7 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung) 122

Tab. 70: Genetische Identitäten nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels EST untersuchten Beständen 123

Tab. 71: Genetische Distanzen nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels EST untersuchten Beständen 123

Tab. 72: Single-Population Descriptive Statistics der mittels EST untersuchten Bestände (nach Nei 1987) 124

Tab. 73: Heterozygotie-Statistik der mittels EST untersuchten Bestände 124

Tab. 74: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels EST untersuchten Gruppen 125

Tab. 75: Übersicht über die Ergebnisse der populationsgenetischen Analysen (RAPD, ISSR, SSR und EST) .. 129

Tab. 76: BSR innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 131

Tab. 77: BSR innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 132

Tab. 78: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (vgl. Abb. 60) (Die Rotation ist in 8 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung) 134

Tab. 79: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (vgl. Abb. 61) (Die Rotation ist in 6 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung) 135

Tab. 80: Single-Population Descriptive Statistics der mittels RAPD untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (nach Nei 1987) 136

Tab. 81: Single-Population Descriptive Statistics der mittels ISSR untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (nach Nei 1987) 136

Tab. 82: Genetische Identitäten nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett) 137

Tab. 83: Genetische Identitäten nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett) 137

Tab. 84: Genetische Distanzen nach Lynch & Milligan (1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 138

Tab. 85: Genetische Distanzen nach Lynch & Milligan (1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 139

Tab. 86: Genetische Distanzen nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett) 140

Tab. 87: Genetische Distanzen nach Nei (1972, oberhalb der Diagonalen) und Nei (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett) 142

Tab. 88: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (RAPD) 143

Tab. 89: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (ISSR) 144

Tab. 90: Genetische Diversität nach Lynch & Milligan (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 144

Tab. 91: Genetische Diversität nach Lynch & Milligan (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 145

Tab. 92: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels RAPD untersuchten Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 145

Tab. 93: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels ISSR untersuchten Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten 145

Tab. 94: Ähnlichkeitsindizes (SM, oberhalb der Diagonalen, und BSR, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Poolproben 150

Tab. 95: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Rohdaten der gepoolten Proben (vgl. Abb. 70) (Die Rotation ist in 5 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung) 152

Tab. 96: Ähnlichkeitsindizes (SM, oberhalb der Diagonalen, und BSR, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Poolproben 152

Tab. 97: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Rohdaten der gepoolten Proben (vgl. Abb. 71) (Die Rotation ist in 9 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung) 153

Tab. 98: Übersicht über die Produktgrößen der im Rahmen der Poolprobenanalyse zusätzlich einbezogenen SSR-Primer (vgl. Tab. 48) 154

Tab. 99: Beispielhaft ausgewählte Stichprobengrößen (n) bei Isoenzym- und RAPD-Analysen mit Populationen von Picea abies 158

Tab. 100: Variabilitätsmaße europäischer Nadel- und Laubwaldarten bzw. von Mono- und Dikotyledonen im Vergleich (nach Mitton 1983 und Müller-Starck 1994) 184

1 Problemstellung und Zielsetzung

Die Gemeine Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) zählt in Mitteleuropa zu den häufigsten und wirtschaftlich bedeutsamsten Baumarten. Aufgrund ihrer forstwirtschaftlichen Nutzbarkeit wird sie – insbesondere in Deutschland – weit über ihr natürliches Verbreitungsgebiet hinaus angebaut und prägt seit Beginn ihrer intensiven Förderung im 18. Jahrhundert weite Landschaftsteile Süddeutschlands, die höheren Lagen der Mittelgebirge sowie zahlreiche Sonderstandorte Norddeutschlands. Die Entwicklungsgeschichte der jeweiligen Populationen bzw. Bestände und die auf sie einwirkenden Standortfaktoren haben in Bezug auf ihre genetische Konstitution unterschiedlichen Einfluss ausgeübt. Während die natürlichen Populationen – innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte – aufgrund selektiver Faktoren während ihrer nacheiszeitlichen Entwicklungsgeschichte und der auf sie einwirkenden Standortfaktoren eine ausgeprägte morphologische Variabilität aufweisen und sich angepasste Phänotypen herausgebildet haben, handelt es sich bei den forstlich ausgebrachten (künstlichen) Populationen um aus gemischtem Saat- und Pflanzgut aufgebaute Bestände, für die sich erst im Laufe einiger Generationen herausstellen wird, ob es sich um geeignetes Material handelt. Der häufig nicht standortgerechte Anbau im 18., 19. und 20. Jahrhundert führte zu zahlreichen forstwirtschaftlichen Problemen, die sich heute noch in einer veränderten Wüchsigkeit oder in der Anfälligkeit gegenüber Windwurf, Schneebruch oder sonstigen externen Faktoren äußern (vgl. SCHMIDT-VOGT 1972d, SCHMIDT-VOGT et al. 1992). Aus dieser Überlegung wurden mit dem FSaatG (26.07.1979) und dem FoVG (22.05.2002) sowie den zugehörigen Verordnungen gesetzliche Vorgaben geschaffen, die die Erzeugung von an die jeweiligen Standortbedingungen angepassten Materials ermöglichen sollen.

Unter Berücksichtigung des Problemfeldes ortsunangepassten Materials wurden seit Mitte des 20. Jahrhunderts zahlreiche Untersuchungen zur Charakterisierung von Fichtenpopulationen bzw. forstlichen Herkünften durchgeführt. Diese beschränkten sich lange Zeit methodenbedingt auf die Betrachtung **morphologischer und phänologischer Parameter**. Wie in Kap. 2.3 ausführlich dargestellt wird, handelt es sich dabei um verschiedene Merkmale, die wesentlich zur Aufklärung der Phylogenie der Fichte sowie zu ihrer nacheiszeitlichen Rückwanderungsgeschichte und Definition ihrer Standortansprüche beitragen konnten. Aufgrund der oben beschriebenen forstwirtschaftlichen Bedeutung (genetisch) angepasstes Material an den jeweiligen Standorten auszubringen, wurden die Grenzen morphologischer Studien erkannt und zunehmend genetische Studien angestrebt, die methodische Entwicklungen zum Inhalt hatten und langfristig zur Aufklärung der genetischen „Konstitution“ der Fichte beitragen sollten. Mit **Isoenzymanalysen** konnten in diesem Zusammenhang erstmals wesentliche Informationen zur Genetik der Fichte bzw. ihrer Populationen gewonnen werden. Im Laufe der letzten Jahrzehnte etablierte sich diese Methode zunehmend, erbrachte aber häufig das Ergebnis, dass ein Bestand so stark durch seine Umwelt beeinflusst wird, dass von seinem äußeren Erscheinungsbild kaum auf dessen genetische Konstitution geschlossen werden kann (vgl. SCHMIDT-VOGT 1976, 1977, FINKELDEY 1992).

Mit Einführung moderner DNA-gestützter Techniken wurde erkannt, dass die Isoenzymanalyse hinsichtlich ihres Informationsgehaltes aufgrund der geringen Diversifizierung ihrer Marker als beschränkt anzusehen ist. Für die genetische Charakterisierung von Populationen rückte der Einsatz moderner **molekulargenetischer Verfahren** immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Insbesondere hinsichtlich der Differenzierung von Populationen und der Darstellung ihrer genetischen Variation bzw. Variabilität erscheint deshalb heute der Einsatz molekulargenetischer Marker unabdingbar.

Wenn auch im Rahmen einiger Untersuchungen populationsgenetische Fragestellungen an Fichten untersucht wurden, so beinhalten diese nur sehr selten Untersuchungen zu Freilandpopulationen, sondern beschäftigen sich mit Differenzierungsmustern forstlicher Klone von Klonsamenplantagen (vgl. u.a. SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b, SKOV 1998a, 1999). Die einzigen zur Zeit vorliegenden populationsgenetischen Studien auf Basis von DNA-Markern stammen von autochthonen Populationen der italienischen Alpen sowie des staatlichen Naturwaldreservates Campolino (Toskana, Provinz Pistoia) (vgl. BINELLI & BUCCI 1994, BUCCI & MENOZZI 1995, PFEIFFER et al. 1997, BUCCI & VENDRAMIN 2000, VENDRAMIN et al. 2000, TROGGIO et al. 2001). Weiterhin lässt sich feststellen, dass nur sehr wenige Untersuchungen existieren, die sowohl natürliche Populationen als auch künstliche Bestände berücksichtigen und darüber hinaus die genetische Charakterisierung künstlicher Bestände zum Inhalt haben. Die aktuell vorliegende Literatur zusammenfassend lässt sich festhalten, dass somit **auf molekularer Ebene bisher keine populationsgenetischen Studien zu *Picea abies* in ihrem deutschen Verbreitungsgebiet vorliegen. Dementsprechend ist – trotz der Kenntnis großer morphologischer Variabilität – die genetische Variabilität deutscher Fichtenpopulationen nur unzureichend erforscht.**

In der Folge sind beispielhaft einige Aspekte aufgeführt, die wesentlichen Einfluss auf die genetische Konstitution der Fichte in Deutschland haben können und dadurch die Differenzierung von Populationen bzw. deren Variation steuern können. Diese sollen im Rahmen der vorliegenden Untersuchung näher betrachtet werden:

- **Einwanderung nach der letzten Eiszeit**: Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten natürlichen Populationen haben nachweislich in unterschiedlichen Refugien während der letzten Eiszeit überdauert und weisen folglich auch eine unterschiedliche Einwanderungsgeschichte auf. Möglicherweise ist dieser Aspekt mitverantwortlich für Differenzierungen, wenn auch lokal geprägte Anpassungs- und Differenzierungsprozesse genetische Unterschiede inzwischen vermutlich überlagert haben können. Die natürliche Selektion kann wahrscheinlich als die Hauptursache für die heutige genetische Struktur angesehen werden (vgl. STUTZ 1990a). Entsprechend den Studien von BERGMANN (1984) kann vermutet werden, dass ein Zusammenhang zwischen den genetischen Differenzierungsmustern und den eiszeitlichen Refugien oder der nacheiszeitlichen Migration der Baumarten besteht. Bei gleicher Einwanderungsgeschichte kann daher größere genetische Ähnlichkeit erwartet werden (STUTZ 1990a, 1990b).

- **Autochthonie und Allochthonie** bzw. historische **Geschichte der Populationen**: Es ist in vielen Fällen davon auszugehen, dass „künstliche“ Bestände, die nicht im natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte angelegt wurden, entsprechend der Saatgut-Herkunftsgebietsverordnung (BML 1994) aus Saat- bzw. Pflanzgut zusammengesetzt sind, das in einer Samenklenge gemischt wurde. Unter diesen Bedingungen wäre in diesen Populationen eine im Vergleich zu autochthonen Beständen größere Diversität bzw. Variabilität zu vermuten.
- große **räumliche Distanz zwischen den Untersuchungsstandorten**: Die räumliche Differenzierung und unterschiedlich große Entfernung zwischen den Standorten lässt eine unterschiedlich starke Einschränkung des Genflusses vermuten.
- starke **topographische Untergliederung**: Mit den Populationen der in Kap. 3 genannten Standorte werden Höhenlagen von 0 m ü. NN bis 1500 m ü. NN in die Untersuchung einbezogen. Eine am Rande ihres ökologischen Optimums befindliche Population kann Ausgangspunkt zur Bildung einer Substratrasse sein (*bottleneck effect*). Ein Einfluss des „Grenzgehens“ auf die genetische Struktur wurde bereits mit Hilfe von Isoenzymanalysen bestätigt (BERGMANN & GREGORIUS 1979).
- stark variierende **geologische und/oder pedochemische Faktoren**: Generell stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage nach dem Einfluss der lokalen Standortfaktoren auf die genetische Struktur. Geologische Sonderstandorte bedingen unter Umständen die Anpassung ausgewählter Genotypen und können ebenfalls als Ausgangspunkt zur Bildung einer Substratrasse angesehen werden. Durch die Gebietsauswahl wurde ein breites Spektrum an Standorttypen berücksichtigt.
- variierende **klimatische Faktoren** sowie u.U. Grenzlagen zwischen ozeanischen und kontinentalen Klimaeinflüssen und damit verbundene unterschiedlich lange **Vegetationszeiten**: Klimatische Aspekte wirken auf den Stoffwechsel der Bäume ein und stellen eine häufig genannte Ursache für morphologische Differenzierungen von Populationen dar.
- **Schadstoffeinträge und Belastung** der Populationen: Nach Angaben von SCHOLZ & BERGMANN (1984) ist der Einfluss von Stoffbelastungen auf die genetische Struktur einzelner Individuen nachgewiesen. Beachtung verdient dieser Aspekt in Hinblick auf den Vergleich von unbelasteten mit vermutlich stärker belasteten Gebieten. Diesem Faktor wird versucht dadurch Rechnung zu tragen, dass sowohl Fichtenbestände naturnaher Ökosysteme als auch industrieller Ballungsräume im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die vorliegende Untersuchung soll deshalb in einem ersten Schritt den **Stand der Forschung** zur genetischen Konstitution der Fichte sowie zur Differenzierung und Variation ihrer Populationen beschreiben. Hierzu wird in Kap. 2 die aktuelle Systematik und die zur Zeit vorliegende Kenntnis zur Einwanderungsgschichte der Fichte vorgestellt. Im Anschluss daran werden die Inhalte bisheriger Untersuchungen zur morphologischen und genetischen Charakterisierung der Fichte aufgeführt und bewertet. In einem zweiten Schritt wird der Kenntnisstand bisheriger populationsgenetischer Untersuchungen auf DNA-Basis präsentiert und verschiedene molekulargenetische Methoden vorgestellt.

Diese werden abschließend hinsichtlich ihrer Eignung zur Darstellung von Differenzierungsmustern und populationsinternen Variationen bewertet. Im Sinne einer **umfassenden genetischen Charakterisierung deutscher *Picea abies*-Populationen und -Bestände** werden schließlich die als geeignet ausgewählten molekulargenetischen Methoden in populationsgenetischen Analysen angewandt.

Für die populationsgenetischen Analysen selbst wurden sieben Fichtenbestände ausgewählt, die sowohl die gesamte Nord-Süd-Ausdehnung Deutschlands als auch die wesentlichen Höhenstufen (planar, kollin, montan, subalpin) berücksichtigen. Bei der Auswahl von Untersuchungsgebieten wurden dementsprechend sowohl Bestände innerhalb als auch außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte mit einbezogen. Die Gebietsauswahl erfolgte in Anlehnung an die Probenahmegebiete der Umweltprobenbank des Bundes (UPB), orientiert sich somit an den Hauptökosystemtypen Deutschlands und kann als für die Umweltsituation in Deutschland weitgehend repräsentativ bezeichnet werden.

Die Auswahl der UPB-Probenahmeflächen wurde des Weiteren mit dem Hintergrund vorgenommen, dass im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ein wichtiger Beitrag zur **Vergleichbarkeit von Umweltproben** geliefert werden kann. Nachdem *Picea abies* bereits sehr früh auf ihre Eignung als Indikatororganismus getestet und seitdem routinemäßig in Umweltüberwachungsprogrammen und forstlichen Bonitierungsprogrammen eingesetzt wurde (vgl. ARNDT et al. 1987, Ministerium für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg 2002), wird sie seit 1985 als Teil des Probenartensets der UPB verwendet. Im Rahmen der UPB werden zur Erfassung des Umweltzustandes nach standarisierten Richtlinien deutschlandweit einjährige Fichtentriebe beprobt, stoffanalytisch charakterisiert und für retrospektive Analysen langfristig über Flüssigstickstoff gelagert (WAGNER et al. 1993, KLEIN et al. 1994, KLEIN & PAULUS 1995, ROSSBACH & JAYASEKERA 1996). Die Vergleichbarkeit analytischer Daten ist aber nur durch die Vergleichbarkeit der jeweiligen Probenmatrix gegeben, da davon ausgegangen werden muss, dass genetische Unterschiede in den Individuen eine unterschiedliche Wirkung von Umweltfaktoren auf die jeweilige Population nach sich ziehen. Ziel einer Probenahme muss also auch sein, eine möglichst geringe genetische Variabilität innerhalb der Grundgesamtheit zu erhalten, um einen möglichen Einfluss der genetischen Variabilität auf die Wirkung von Umweltfaktoren ausschließen zu können (vgl. MÜLLER & WAGNER 1983, HALBWACHS & ARNDT 1991, KLEIN & PAULUS 1995).

Aus diesen Gründen soll die vorliegende Untersuchung zur Aufklärung der genetischen Variabilität der Fichte in Deutschland und auch zur **genetischen Charakterisierung der im Rahmen der UPB beprobten Fichtenbestände** beitragen. Die Untersuchung soll somit zur Überprüfung der **genetischen Vergleichbarkeit** von Umweltproben sowie zur Überprüfung der (genetischen) Reproduzierbarkeit von regionenübergreifenden Probenahmen dienen. Hier soll insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob die untersuchten Bestände als genetisch einheitlich gelten können, oder ob es sich um genetisch unterschiedliche Populationen handelt, was letztlich die Vergleichbarkeit der Proben und einen Vergleich der Ergebnisse der Stoffanalytik erschweren würde.

2 Stand der Forschung

2.1 Systematik, Einwanderungsgeschichte und Verbreitung

Die Gemeine Fichte (*Picea abies* (L.) Karst. 1881, *Norway spruce*) gilt als phylogenetisch alte Spezies und gehört als Konifere (Coniferales, Pinaceae) einem sehr alten systematischen Zweig an (SCHMIDT-VOGT 1977, 1986). Man geht davon aus, dass die Formen von *Picea abies* schon sehr früh ausgebildet waren, wie Zapfenfunde im Miozän von Spitzbergen, im Oberpliozän im Piemont und im badischen Tertiär beweisen (SCHMIDT-VOGT 1974b). Trotz der langen Entwicklungsgeschichte dieser Art ist die Systematik der Gattung *Picea* bis heute nicht gänzlich aufgeklärt. Der Ursprung der Gattung wird in Ostasien vermutet, von wo sie sich wahrscheinlich in zwei großen Strömen nach Westen und Osten ausgebreitet hat (SCHMIDT-VOGT 1974b). Insgesamt werden heute zwischen 30 und 50 *Picea*-Arten beschrieben, die alle nordhemisphärisch verbreitet sind und aufgrund fließender morphologischer Übergänge je nach Bearbeiter auch als Sondertypen einiger weniger Arten ausgegliedert werden (KRÜSSMANN 1983, SCHMIDT-VOGT 1977). In diesem Zusammenhang werden gerade bei *Picea abies* aufgrund ihrer großen ökologischen Valenz und weiten Verbreitung **Sondertypen bzw. Rassen** (z.B. Hochlagentypen) diskutiert. Insbesondere zwischen *Picea abies* und der lange als selbständige Art behandelten Sibirischen Fichte (*Picea obovata* Ledeb. 1833) erschwerten fließende Übergänge in einigen morphologischen Merkmalen (vgl. Kap. 2.3) die ursprüngliche Artdetermination (PRAVDIN 1975). Nachdem in mehreren Arbeiten der klinale Charakter morphologischer Merkmale aufgedeckt werden konnte (KÖPPEN 1889, LINDQUIST 1948, SCHMIDT-VOGT 1975, SUTTON et al. 1991), wird die Sibirische Fichte heute meist als Varietät bzw. Standortrasse von *P. abies* definiert (vgl. SCHMIDT-VOGT 1974b, 1975, GIANNINI et al. 1991b, KRUTOVSKII & BERGMANN 1993, 1995). Ähnliche systematische Änderungen wurden in den letzten Jahrzehnten hinsichtlich der Differenzierung der finnischen *Picea fennica* (Regel) Kom. (1934) und der auf die Alpen beschränkten *Picea alpestris* Bruegg. ex Stein (1887), beide mittlerweile als „Kaltklimarasse“ von *Picea abies* beschrieben, vorgenommen (SCHMIDT-VOGT 1977, KRÜSSMANN 1983). Grundlage dieser Neugliederung waren hauptsächlich morphologische Merkmale, wie beispielsweise die Zapfenschuppenform (vgl. Kap. 2.3). Anhand dieses Merkmals werden diese und andere ehemals selbständige Arten heute als Varietäten *var. acuminata*, *var. europaea* und *var. obovata* von *Picea abies* geführt.

Das Verbreitungsgebiet der gesamten *Picea abies*-Gruppe reicht dementsprechend von Frankreich im Westen bis zur russischen Pazifikküste im Osten und vom Rhodopegebirge in Griechenland im Süden bis zur Waldgrenze in Norwegen und Sibirien (vgl. auch Abb. 1; SCHMIDT-VOGT 1974a, KULLMANN & ENGELMARK 1991). Der Ural bildet den Übergangsbereich zwischen *Picea abies* i.e.S. und *P. abies var. obovata*, weswegen Mitteleuropa meist als das eigentliche Verbreitungsgebiet von *P. abies* angegeben wird.

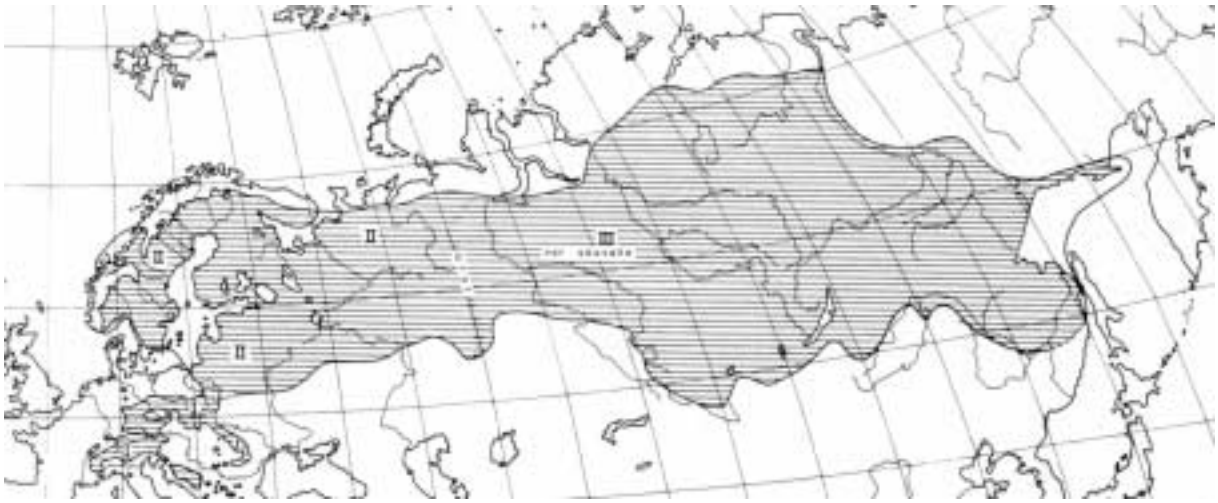


Abb. 1: Karte der Verbreitung von *Picea abies* und *P. abies var. 'obovata'* in Eurasien (aus SCHMIDT-VOGT 1977)

Hinsichtlich der **natürlichen Verbreitung** beschreibt SCHMIDT-VOGT (1974a) drei Fichtengebiete in Europa, die von zwei – vermutlich anthropogen verursachten – fichtenfreien Streifen in Polen und in den Karpaten unterteilt werden (vgl. Abb. 2). Er unterscheidet:

- **Nordisch-baltisches Tieflandvorkommen**: In Nordskandinavien liegt die Obergrenze bei 100-200 m ü. NN, in Südnorwegen steigt sie auf 400 m ü. NN.
- **Herzynisch-karpatisches Berglandvorkommen**: Montane (450-600 m ü. NN) bis subalpine Höhenlage in den Karpaten, der Tatra, dem Herzynischen Mittelgebirge, dem Böhmerwald und dem Bayerischen Wald. Verbreitungsgrenzen: Harz unter 1000 m ü. NN, Bayerischer Wald unter 1450 m ü. NN, Ostkarpaten 1770 m ü. NN.
- **Alpin-südosteuropäisches Gebirgsvorkommen**: Alpen, Schwarzwald, Vogesen, Schweizer sowie Französischer Jura. Verbreitungsgrenzen: Nord- bzw. Südalpen 1700-1800 m ü. NN und Zentralalpen 2100 m ü. NN.

Wenn auch in den letzten beiden Jahrhunderten das Artareal durch den Menschen eine intensive Veränderung erfuhr (SCHMIDT-VOGT 1977), so kommt die Fichte **innerhalb Deutschlands** nur in den Alpen, dem Bayerischen Wald, im Harz und in kleinen Restbeständen im Schwarzwald natürlich vor. Zurückgeführt wird die heutige natürliche Verbreitung der Fichte im Wesentlichen auf die Rück- bzw. Einwanderung nach der letzten Eiszeit. In diesem Zusammenhang geht man davon aus, dass die Fichte die Eiszeiten in drei eiszeitlichen **Refugien** – Jugoslawien, den Karpaten und Russland (möglicherweise auch Italien) – überdauert hat und von da aus Mitteleuropa erneut besiedelte (VON WUEHLISCH & KRUSCHKE 1991). Für den deutschen Bereich geht SCHMIDT-VOGT (1976) von einer Einwanderung der Fichte nach Bayern und Baden-Württemberg aus einem jugoslawischen Refugium aus (vgl. auch GÄRTNER et al. 1996), während die Fichten des Harzes und des Harzvorlandes aus den

Beskiden bzw. den Karpaten eingewandert sein sollen (vgl. Abb. 3). Die Massenausbreitung der Fichte im Böhmerwald und im Bayerischen Wald wird im Boreal angenommen (SCHMIDT-VOGT 1974a).

Abb. 2: Natürliches Verbreitungsgebiet von *Picea abies* in Europa (aus Schmidt-Vogt 1977)

Abb. 3: Eiszeitliche Refugien und Verbreitungsgeschichte von *Picea abies* (aus Schmidt-Vogt 1977)

Die heutige Verbreitung der Fichte in Deutschland ist im Wesentlichen durch ihren **künstlichen Anbau** geprägt (vgl. insbesondere SCHMIDT-VOGT 1977). Im Zuge zunehmender Bedeutung forstpolitischer Maßnahmen kam es insbesondere aufgrund des Baus der Eisenbahnen im 19. Jahrhundert zu ausgedehnten Bestandsgründungen. Diese intensiven Aufforstungen jenseits ihres natürlichen Verbreitungsgebietes ließen den Anteil der Fichte an der gesamten deutschen Waldfläche auf über 30% ansteigen (VON WUEHLISCH & KRUSCHKE 1991, HUSS 1998). Damit nimmt sie heute den mit Abstand breitesten Raum unter den Baumarten Deutschlands ein. Der Schwerpunkt der Verbreitung liegt in hohen und mittleren Lagen Süddeutschlands und der Mittelgebirge.

Wie oben bereits erwähnt, entspricht nur ein geringer Teil der heutigen Verbreitung der Fichte in Deutschland dem tatsächlichen und somit „natürlichen“ Verbreitungsgebiet der Art. Zurückzuführen ist dies auf die relativ große ökologische Valenz der Fichte. Neben dem natürlichen Vorkommen in den Alpen, dem Bayerischen Wald, im Harz und im Schwarzwald kann der Großteil der deutschen Fichtenbestände auf forstliche Anpflanzung unter nur suboptimalen Bedingungen zurückgeführt werden. Seit Forschungen von CIESLAR (1887) ist allerdings nachgewiesen, dass der Herkunftsort von forstlichem Saatgut wesentliche Bedeutung für den späteren Anpflanzungserfolg hat (BERGMANN 1982). Daraus resultierend wurden bereits 1911 freiwillige Vereinbarungen in der deutschen Kontrollvereinigung getroffen, wonach die Samenhändler den Herkunftsort ihrer Forstsamen anzugeben hatten. Durch das forstliche Artgesetz vom 13.12.1934 wurde diese Vorgehensweise im Deutschen Reich erstmals gesetzlich festgeschrieben (HOLZER 1982). Mit dem **Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut** (FSaatG, 26.07.1979, BGBl. I S. 1242) und dem **Forstvermehrungsgutgesetz** (FoVG, 22.05.2002, BGBl. I, S. 1658) – als erster Schritt zur Umsetzung der Richtlinie 1999/105/EG des Rates vom 22. Dezember 1999 über den Verkehr mit forstlichem Vermehrungsgut – ist die Behandlung von Saat- und Pflanzgut inzwischen gesetzlich neu geregelt (vgl. auch MUHS 1996, BMVEL 2002). Wesentlicher Zweck des Gesetzes ist, den Wald durch die Bereitstellung von hochwertigem und identitätsgesichertem forstlichen Vermehrungsgut in seiner genetischen Vielfalt zu erhalten. Hierzu werden Regelungen über die Zulassung des Ausgangsmaterials (d.h. der Bäume, von denen forstliches Vermehrungsgut gewonnen wird), die Zertifizierung und Kennzeichnung des Vermehrungsgutes beim Vertrieb sowie über die Kontrolle der Betriebe getroffen. Darüber hinaus sind durch die dem FSaatG zugeordnete Verordnung über Herkunftsgebiete für forstliches Vermehrungsgut (**Forstsaat-Herkunftsgebietsverordnung**) vom 7. Oktober 1994 die Herkünfte von auszubringendem Saat- und Pflanzgut exakt definiert (BML 1994, RAU & BROCKHAUS 1995). Nach dieser Vorgabe ist Deutschland in mehr oder weniger große, räumlich abgegrenzte Herkunftsgebiete eingeteilt. Saatgut, das innerhalb dieser Gebiete geerntet wird, wird in einer Samenklenge vereinigt und unter der Bezeichnung des Herkunftsgebietes in den Handel gebracht (SCHMIDT-VOGT 1976). Tab. 1 und Abb. 4 geben einen Überblick über die exakte Definition der Herkunftsgebiete für *Picea abies* in Deutschland.

Tab. 1: Herkunftsgebiete für *Picea abies* in Deutschland (nach Forstsaatgut-Herkunftsgebiets-verordnung vom 07.10.1994, BML 1994)

Kennziffer	Definition
840 01	Nordwestdeutsches Tiefland
840 02	Mittel- und Ostdeutsches Tiefland außer Niederlausitz
840 03	Niederlausitz
840 04	Rheinisches und Saarpfälzer Bergland, sowie Oberrheingraben, kolline Stufe
840 05	Rheinisches und Saarpfälzer Bergland, sowie Oberrheingraben, montane Stufe
840 06	Weser- und Hessisches Bergland, kolline Stufe (< 500 m ü. NN)
840 07	Weser- und Hessisches Bergland, montane Stufe (> 500 m ü. NN)
840 08	Harz, kollin (<400 m ü. NN)
840 09	Harz, montan (400-700 m ü. NN)
840 10	Harz, hochmontan (>700 m ü. NN)
840 11	Thüringer Wald und Frankenwald, kolline Stufe (< 700 m ü. NN)
840 12	Thüringer Wald und Frankenwald, montane Stufe (> 700 m ü. NN)
840 13	Vogtland und Ostthüringisches Hügelland
840 14	Sächsisches Bergland, kolline Stufe (< 500 m ü. NN)
840 15	Sächsisches Bergland, montane Stufe (500-800 m ü. NN)
840 16	Sächsisches Bergland, hochmontane Stufe (> 800 m ü. NN)
840 17	Neckarland und Fränkisches Hügelland
840 18	Fichtelgebirge und Oberpfälzer Wald, submontane Stufe (< 800 m ü. NN)
840 19	Fichtelgebirge und Oberpfälzer Wald, montane Stufe (> 800 m ü. NN)
840 20	Bayerischer Wald, submontan (< 800 m ü. NN)
840 21	Bayerischer Wald, montan (800-1100 m ü. NN)
840 22	Bayerischer Wald, hochmontan (> 1100 m ü. NN)
840 23	Schwarzwald, submontane Stufe (< 900 m ü. NN)
840 24	Schwarzwald, hochmontane Stufe (> 900 m ü. NN)
840 25	Schwäbisch-Fränkischer Wald
840 26	Alb
840 27	Alpenvorland
840 28	Alpen, submontan (< 900 m ü. NN)
840 29	Alpen, montan (900-1300 m ü. NN)
840 30	Alpen, subalpin (> 1300 m ü. NN)

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass es sich bei diesen gesetzlichen Regelungen um Regulierungen in der Praxis der jüngsten Forstgeschichte handelt, die sich maximal auf die letzten 100 Jahre beziehen. Vor der Gesetzgebung wurden zwar mündliche Übereinkünfte zur Verwendung von Saatgut eingehalten, aber der Anbau der Fichte und anderer Waldbäume mit großen Umtriebszeiten erfolgte weitestgehend **ohne genaue Kenntnis der Herkunft** des verwendeten Saatgutes. Die heute gültige gesetzliche Regelung ist somit nicht mehr rückwirkend auf die heute adulten Bestände anwendbar. In diesem Zusammenhang ist weiterhin davon auszugehen, dass sich die Fichte nach ihrem ersten künstlichen Anbau auf geeigneten Standorten auf natürlichem Wege weiter ausgebreitet und mit anderen Beständen durchmischt hat. Aufgrund der erst relativ kurzen Anbauperiode muss zur Zeit angenommen werden, dass noch keine örtliche Anpassung durch natürliche Selektionsmechanismen in den künstlich begründeten Beständen stattgefunden hat (vgl. KONNERT & FRANKE 1990, KONNERT

1991a). Forstlich ist dieser Aspekt besonders bedeutsam, da die Gebiete außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte deutlich geringere Wuchsleistungen als bodenständige Herkünfte vergleichbarer Lagen im natürlichen Verbreitungsgebiet aufweisen (SCHMIDT-VOGT 1976, SKRØPPA & MAGNUSSEN 1993), wenn dies auch aufgrund der ausgleichenden (Dünge-)Maßnahmen der modernen Forstwirtschaft heute immer weniger offensichtlich ist.

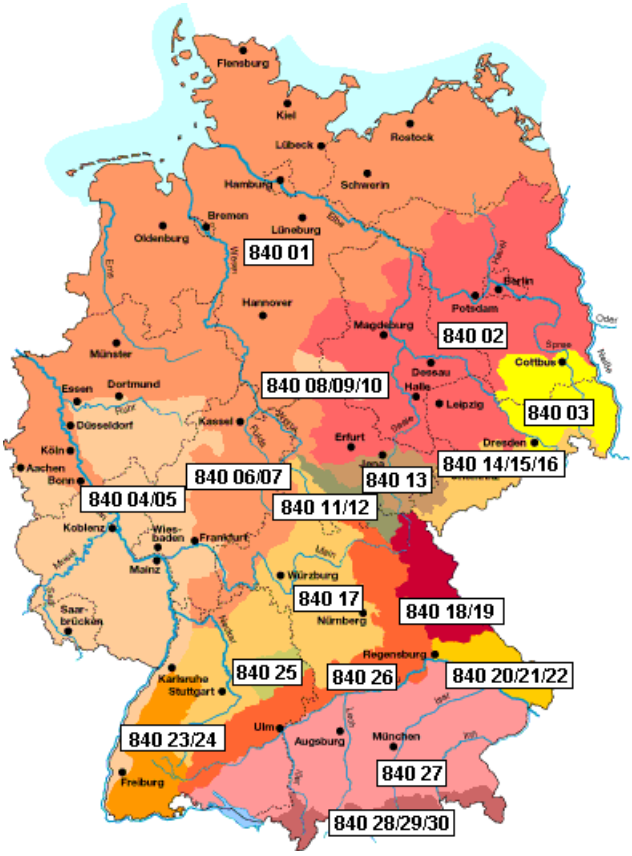


Abb. 4: **Herkunftsgebiete für das Ausbringen von *Picea abies* in Deutschland gemäß Forstsaat-Herkunftsgebietsverordnung vom 7. Oktober 1994 (Quelle: AID 1164/1996)**

2.2 Standortfaktoren

Die Fichte hat als flachwurzelnde Halbschattbaumart eher geringe **Standortansprüche**. Lediglich hinsichtlich der Wasserversorgung und des Sauerstoffbedarfs der Wurzeln stellt sie höhere Anforderungen. Dementsprechend sollten die Böden gut durchlüftet sein (mäßig frisch bis frisch) und mit Ausnahme sehr heißer Sommermonate, muss eine gute bis ausreichende Wasserversorgung gewährleistet sein (vgl. HOFFMANN 1959, BERNHART 1963, SCHMIDT-VOGT 1977, 1986). Aufgrund der Kronenform ist sie mitunter windanfällig, bevorzugt aber im Allgemeinen winterkaltes Kontinental- und Gebirgsklima. Dementsprechend werden feuchte, saure und kühle Standorte als optimal angegeben

(vgl. OELKERS 1959). Zuzüglich zu den beschriebenen anthropogenen Ursachen ihrer Verbreitung und der großen ökologischen Valenz der Art, sind es somit diese in den Hügel- und Gebirgslagen in unseren Breiten häufig anzutreffenden Standortbedingungen, die es der Fichte ermöglichten, sich zur dominierenden Baumart der Mittelgebirge und höheren Lagen zu entwickeln.

Diese Faktoren führen dazu, dass die Fichte an Standorten mit den unterschiedlichsten Wuchsbedingungen anzutreffen ist (MÜLLER-STARCK 1995a). Insbesondere bei Waldbaumarten ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass zwischen den Populationen, die auf unterschiedlichen Standorten ihres Verbreitungsgebietes wachsen, **Variationen in phänotypischen Merkmalen** nachzuweisen sind (SCHMIDT-VOGT 1977). In der Forstwirtschaft werden insbesondere die Phänologie und das Austriebsverhalten einer Art als wichtige standortabhängige Merkmale bezeichnet (HANHART-ROESCH & KLEINSCHMIT 1991). Aber auch im Wuchsverhalten sind wesentliche Differenzierungen zwischen den Populationen nachweisbar (vgl. auch SKRØPPA & MAGNUSSEN 1993). So stellte beispielsweise MAYER (1968) fest, dass die Fichte aller soziologischer Schichten in subalpinen Hochlagen um die Hälfte schmalkroniger ist, als in montanen Hochlagen (vgl. auch CIESLAR 1887, ENGLER 1903, Schmidt-Vogt 1972c, SKRØPPA 1994). Dementsprechend ist nach SCHMIDT-VOGT (1976) davon auszugehen, dass lokale Standortfaktoren durch verschiedenartigen Selektionsdruck wahrscheinlich zu einer Vielfalt an **Ökotypen** geführt haben. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass HANHART-ROSCH & KLEINSCHMIT (1991) zeigen konnten, dass auch Merkmale, die unter einheitlichen Umweltbedingen eine strenge genetische Kontrolle zeigen, unter dem Einfluss geographischer und klimatischer Unterschiede eine außerordentlich große Plastizität aufweisen.

Es ist also davon auszugehen, dass die Fichte so stark durch ihre Umwelt und durch die auf sie einwirkenden Standortfaktoren beeinflusst wird, dass vom äußeren Erscheinungsbild eines Bestandes kaum auf dessen genetische Konstitution geschlossen werden kann (FINKELDEY 1992).

2.3 Morphologische Variabilität der Fichte

Wie bereits in den beiden vorhergehenden Kapiteln beschrieben, handelt es sich bei der Fichte aufgrund ihrer differenzierten Einwanderungsgeschichte und der sie prägenden unterschiedlichen Standortbedingungen um eine **morphologisch sehr variable Art**.

Aufgrund ihrer zunehmenden wirtschaftlichen Bedeutung rückte ihre Formenvielfalt insbesondere im Hinblick auf ihre forstliche Nutzung zunehmend ins Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen (vgl. u.a. TUROK et al. 1995, TUROK & KOSKI 1997). Nach Angaben von SCHMIDT-VOGT (1972a, 1977) wurden die ersten Studien zur Unterscheidung von *Picea abies*-Populationen bzw. -Individuen bereits im ausgehenden 18. und im 19. Jahrhundert durchgeführt (vgl. SCHRÖTER 1898). Die erste veröffentlichte Beobachtung von morphologischen Unterschieden bei der Fichte finden sich bei

BECKMANN (1777), der hinsichtlich der **Zapfenfarbe** erstmals Fichtenbestände unterschied. Allerdings korrelierten die Farbunterschiede – ähnlich wie bei den Untersuchungen zu **Zapfenform** (HEIKINHEIMO 1920) und **Nadellänge** (BECHSTEIN 1815) – im Wesentlichen mit klimatischen Parametern. Das von PRIEHÄUSSER (1956) postulierte Differenzierungsmerkmal der **Triebbehaarung** wurde später von SCHMIDT-VOGT (1972a, 1972b, 1972c, 1977) als nicht aussagekräftig widerlegt und wird heute ebenso wie die **Behaarung der Nadelkissen** (LINDQUIST 1948) nicht mehr als Merkmal herangezogen.

Durch die von LEDEBOUR (1833) veröffentlichte Beschreibung einer sibirischen Fichte, die sich durch die Form der Zapfenschuppen von den mitteleuropäischen Fichten unterschied, begann die Diskussion um die Bedeutung der **Zapfenschuppenform** als Differenzierungsmerkmal (vgl. auch TEPLOUCHOV 1869, BRÜGGER 1886 und WILLKOMM 1887). Es wurden im Wesentlichen fünf Formen unterschieden, die sich durch zum Teil fließende Übergänge auszeichnen. SCHMIDT-VOGT (1972a, 1977) konnte nachweisen, dass es sich hierbei allerdings um eine klinale Veränderung morphologischer Eigenschaften handelt, die als Varietäten von *Picea abies* charakterisiert werden müssen. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen zur Übereinstimmung der Zapfenschuppenform der sibirischen (*var. obovata* nach PRIEHÄUSSER 1956) und der Alpenfichten (*var. alpestris* nach PRIEHÄUSSER 1956) konnte geschlossen werden, dass es sich bei der Form der Zapfenschuppen demnach lediglich um ein Merkmal für Kaltklimaeinfluss handelt. Nach SCHMIDT-VOGT (1974b) werden deshalb zur Zeit nur drei – var. *acuminata*, var. *europaea* und var. *obovata* – der in Abb. 5 abgebildeten Varietäten ausgegliedert.

var. **acuminata** Beck (1887)	var. **europaea** Teplouchoff (1869)	var. **montana** Ascherson (1897)	var. **fennica** Regel (1863)	var. **obovata** Ledebour (1833)	var. **rotundata** Priehäusser (1956)

Abb. 5: Zapfenschuppenformen von *Picea abies* var. *acuminata*, var. *europaea* und var. *obovata* mit ihren Übergangsformen (nach PRIEHÄUSSER 1958 und SCHMIDT-VOGT 1977)

Die Zapfenschuppenform gilt aber auch heute noch als gängiges Merkmal, da sie zum einen signifikant abhängig von den klimatischen Gegebenheiten ist (PRIEHÄUSSER 1956, BORGHETTI et al. 1988) und zum anderen darauf aufbauend mit den Refugien der Fichte während den Eiszeiten und den daraus resultierenden Rückwanderungen nach der letzten Eiszeit korreliert werden kann. Dementsprechend kann von einer Abnahme der Varietät *acuminata* und Zunahme der Varietät *obovata* von Westen nach Osten, von Süden nach Norden und von der Tieflage zur Hochlage ausge-

gangen werden (SCHMIDT-VOGT 1972c). BORGHETTI et al. (1988) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass sich europäische Fichten-Populationen anhand dieses Merkmals signifikant unterscheiden lassen.

Ein wesentlich belastbareres Merkmal zur morphologischen Differenzierung der Fichte in ihrem Verbreitungsgebiet stellt allerdings der **Verzweigungstyp** dar. Den ältesten Hinweis auf dieses bis heute diskutierte Merkmal enthält die 1815 erschienene Forstbotanik von BECHSTEIN. In Kombination mit der Diskussion um die Form der o.g. Zapfenschuppen gibt SYLVÉN (1909) mit der Untersuchung der Verzweigungstypen den entscheidenden Anstoß, die morphologische Variabilität der Fichte auf wissenschaftlicher Grundlage forstlich auszuwerten. Er nahm an, dass lediglich die Verzweigungsform als Grundlage für die Systematik der Fichtenformen von Bedeutung sei und erarbeitete fünf Formen, die mittlerweile zu drei Typen zusammengefasst wurden (vgl. RUBNER 1936, 1939, 1941, 1943 1957; vgl. auch GRUBER 1993):

- **Kammfichte**: breitkronig, raschwüchsig, größerer Durchmesser, lange und vergleichsweise dünne Nadeln (anfällig gegen Windbruch und Eishang)
- **Bürstenfichte**: intermediärer Typ
- **Plattenfichte**: Krone schmal, viele waagerechte Äste, Benadelung dicht, Nadeln kurz und eher kräftig (anfällig gegen Schneebruch)

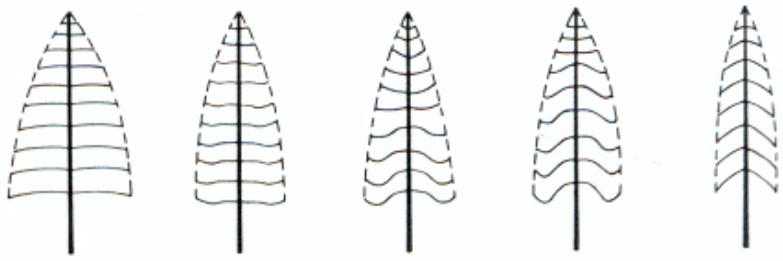


Abb. 6: Verzweigungstypen mit ihren Übergangsformen: Kammfichte (links), Bürstenfichte (Mitte), Plattenfichte (rechts) (nach PRIEHÄUSSER 1958 und SCHMIDT-VOGT 1977)

RUBNER (1936, 1939, 1941) stellte weiterhin fest, dass der Plattentyp adulter Fichten mit großer Regelmäßigkeit mit Kleinnadeligkeit, der Kamm- bzw. Bürstentyp aber mit Großnadeligkeit verknüpft ist, dass also Kronentyp, Nadellänge und Wüchsigkeit der Fichte miteinander gekoppelt sind (vgl. auch SCHMIDT-VOGT 1949, 1972a). Weiterhin waren die Kammfichten hinsichtlich der Oberfläche je Nadel und Tausendnadelgewicht (TNG) sowie dem Nadelgewicht, der Nadelzahl und der Nadeloberfläche je Baum den beiden anderen Typen überlegen (SCHMIDT-VOGT 1972a). Die daraus resultierende, je nach klimatischen Gegebenheiten (z.B. Schnee, Frost etc.) unterschiedliche forstliche Nutzbarkeit der Typen wurden von PRIEHÄUSSER (1956, 1958) eingehend beschrieben. Zahlreiche

Arbeiten beschäftigten sich in der Folge mit Empfehlungen zum Anbau bestimmter Typen in Abhängigkeit der jeweiligen Standortverhältnisse (vgl. u.a. KLOTZ 1958, 1959, ROOSEN 1959).

Diese drei – vermutlich genetisch manifestierten – Typen scheinen in Abhängigkeit der geographischen Lage und der klimatischen Bedingungen unterschiedlich angepasst zu sein (ALEXANDROV 1971). So vermutet SCHMIDT-VOGT (1972c), dass der Anteil an Kammfichten mit steigender Höhenlage und mit steigender geographischer Breite abnimmt, der der Bürstenfichten – und in extremen Lagen der der Plattenfichten – dagegen zunimmt. Die kammartige Verzweigung gilt in windstillen Lagen als am besten ausgebildet, während an stark windexponierten Stellen nur plattenartige Verzweigung auftritt, was nach Angaben von SCHMIDT-VOGT (1972c) baumphysiologisch erklärbar ist. Zudem gilt der Kammfichtentyp als resistenter gegen Schnee und der Plattenfichtentyp als resistenter gegen Eishang. Da in den Hochlagen die Gefahr des Wärmeverlustes besonders stark ist, setzt sich hier meist der Plattenfichtentyp durch (SCHMIDT-VOGT 1972c).

Neben diesen morphologischen Parametern wurde ab den 1960er Jahren die Differenzierungsanalyse auch auf **Pflanzeninhaltsstoffe**, wie beispielsweise **Phenole** oder **Terpenoide** ausgedehnt (vgl. VON SCHANTZ & JUVONEN 1966, WELLENDORF et al. 1971, SAUER et al. 1973). Unter anderem wurden auch **ätherische Öle** der Nadeln als ein brauchbares Merkmal herangezogen, wenngleich die nachgewiesenen Unterschiede ebenso durch die unterschiedlichen klimatischen und geologischen Gegebenheiten der jeweiligen Untersuchungsgebiete bedingt sein konnten (SCHMIDT-VOGT 1974b).

Durch zunehmendes forstwissenschaftliches Interesse an der Eignung morphologischer Varianten für forstwirtschaftliche Zwecke wurde die Differenzierungsanalyse insbesondere auch auf die **Phänologie** ausgedehnt. In diesem Zusammenhang haben europaweite **Provenienzversuche**, wie beispielsweise die der *International Union of Forest Research Organizations* (IUFRO) wesentlich dazu beigetragen, Differenzierungen zwischen Herkünften der Fichte zu beleuchten (vgl. u.a. KRUTZSCH 1974). Darauf aufbauend werden in jüngerer Zeit im Rahmen des forstlichen Umweltmonitorings (IFOM, ICP Forests), der Waldschadenserhebung oder von Untersuchungen in der Umweltbeobachtung zusätzlich weitere biometrische Parameter erhoben, die Aufschluss über die morphologische Variabilität der Art geben. Während der **Benadelungsgrad** häufig als wichtiger Parameter in der Forstbonitierung Verwendung findet, werden das **Tausendnadelgewicht (TNG)** und die **Trieblänge einjähriger Triebe**, die zweifellos ein belastbares Maß für die Wuchsbedingungen darstellen, nur selten beschrieben (vgl. u.a. SCHMIDT-VOGT 1972a, FAENSEN-THIEBES et al. 1999, BARTEL et al. 2002, 2003a, Ministerium für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg 2002, DIETRICH & HEITZ 2003). Hierbei erscheint insbesondere das TNG von besonderer Bedeutung, da mit steigendem Nadelgewicht auch die Oberfläche und damit die Anzahl der Stomata zunehmen. Diese physiologisch wichtige Eigenschaft, die nach FRÖHLICH (1969) genetisch individuell fixiert zu sein scheint, kann bei gleichzeitiger hoher Assimilationsintensität der Nadeln zu großen Zuwachsmehrleistungen führen und für wesentliche individuelle Variationen verantwortlich sein.

2.4 Genetische Variabilität der Fichte

Aufgrund der zuvor dargestellten großen morphologischen Variabilität innerhalb dieser Art muss hinsichtlich der Populationsdifferenzierung von einer geringen Aussagekraft morphologischer Merkmale ausgegangen werden (SCHMIDT-VOGT 1972b). Da es sich in vielen Fällen um klimatisch bedingte morphologische Differenzierungen zu handeln scheint, ist in den meisten Fällen unklar, ob diese Polymorphismen genetisch manifestiert sind. Zur Überprüfung dieser Frage wurden mit der Entwicklung geeigneter Methoden seit Mitte der 1970er Jahre zunehmend Analysen durchgeführt. Hierbei stellte die forstliche Bedeutung dieser Polymorphismen die treibende Kraft für Variabilitätsuntersuchungen dar. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei die mögliche Kopplung forstlich wichtiger Eigenschaften (z.B. Wüchsigkeit, Resistenz etc.) mit bestimmten morphologischen Eigenschaften (Verzweigungsform, Zapfenschuppentyp etc.) (SCHMIDT-VOGT 1972a, VON ARNOLD & ERIKSON 1986, STRAUSS et al. 1992, MORGENSTERN 1997).

2.4.1 Isoenzymanalysen

Die Etablierung biochemischer Isoenzym-Genmarker zu Beginn der 1970er Jahre (BARTELS 1971, MITTON 1983) ermöglichte den Nachweis genetisch manifestierter Unterschiede und war der Beginn umfangreicher Populationsstudien in Waldbaumpopulationen (vgl. insbes. ROTHE 1988, HATTEMER 1991, O'MALLEY & WHETTEN 1997, MÜLLER-STARCK 1998). Mit Hilfe der funktional identischen, sich aber hinsichtlich ihrer Primärstruktur unterscheidenden Enzyme konnten erstmals kostengünstig verlässliche Ergebnisse produziert werden. *Picea abies* wurde – hauptsächlich durch das wirtschaftliche Interesse an dieser Art begründet – als eine der ersten Baumarten bei zahlreichen forstgenetischen Fragestellungen als Untersuchungsobjekt verwendet (KLEINSCHMIT 1995). Die zu Identifizierung von Isoenzymmarkern erforderlichen biochemisch-genetischen Verfahren und Methoden galten bereits Mitte der 1980er als besonders ausgereift und erlaubten eine routinemäßige Untersuchung der genetischen Variation an zahlreichen Strukturgenloci (HATTEMER et al. 1993, HOSIUS et al. 1996a). Heute sind die Isoenzymvariationen und -differenzierungen zwischen Populationen europaweit sehr gut dokumentiert (vgl. Tab. 2). Eine umfassende Übersicht zu Isoenzym-Studien an Koniferen findet sich bei FALKENHAGEN (1985) und MÜLLER-STARCK (1998).

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, lagen die Forschungsschwerpunkte weitestgehend bei der Erforschung der genetischen Struktur der Fichte und nur zu einem geringeren Anteil bei der Untersuchung der genetischen Differenzierung der Art. Genetische Inventuren ergaben zwar eine große genetische Variabilität innerhalb von Populationen (MÜLLER-STARCK 1995a), aber nach Angaben von GONCHARENKO et al. (1995) wurden bis Mitte der 1990er Jahre sowohl natürliche als auch künstliche **Freilandpopulationen** der Fichte **nur sehr selten genetisch charakterisiert** (z.B. LUNDKVIST 1979, ALTUKHOV et al. 1986a, 1986b, GONCHARENKO & POTENKO 1990, 1991, MUONA et al. 1990). Sehr schnell erweiterte sich das Arbeitsfeld insbesondere in Richtung der Überprüfung der Sensitivität

gegenüber atmosphärischer Belastung. Isoenzymanalysen sind im Hinblick auf Einflüsse von Schadstoffen auf die genetische Struktur besonders interessant, weil über die Funktionsbetrachtung im Primärstoffwechsel ein Bezug zur Physiologie des Organismus gegeben ist und einige Enzyme Schlüsselpositionen im Metabolismus unter umweltbedingten Stresseinflüssen darstellen (vgl. MÜLLER-STARCK 1994).

Tab. 2: Arbeitsschwerpunkte isoenzymatischer Untersuchungen mit Picea abies

Arbeitsschwerpunkte	Quellen
Erforschung der genetischen Struktur der Fichte	TIGERSTEDT 1973, BERGMANN 1974, 1975, LUNDKVIST & RUDIN 1977, BERGMANN & GREGORIUS 1979, LUNDKVIST 1979, YAZDANI & RUDIN 1982, BRUNEL & RUDOLPHE 1985, ALTUKHOV et al. 1986a, 1986b, YAZDANI 1988, MORGANTE et al. 1989, LAGERCRANTZ & RYMAN 1990, MUONA et al. 1990, PAULE et al. 1990, BERGMANN & RUETZ 1991, GIANNINI et al. 1991b, GONCHARENKO & POTENKO 1991, MORGANTE & VENDRAMIN 1991, VON WUEHLISCH & KRUSCHKE 1991, GÖMÖRY 1992, MÜLLER-STARCK et al. 1992, WITTLAND 1992, LIESEBACH 1994, LEONARDI et al. 1996
Ermittlung der Verteilung der genetischen Variabilität	BERGMANN 1973, 1974, 1975, 1978, 1982, TIGERSTEDT 1973, 1974, LUNDKVIST & RUDIN 1977, GIANNINI et al. 1991a, PFEIL 1991, GÖMÖRY & PAULE 1993, GONCHARENKO et al. 1993, 1995, STIMM & BERGMANN 1994, BERGMANN & HOSIUS 1996b, LEWANDOWSKI et al. 1997
Erforschung des Vererbungssystems	MÜLLER 1977, CHELIAK et al. 1987, MUONA et al. 1990, MORGANTE et al. 1991, PAULE et al. 1993, FINKELDEY 1995
Ermittlung von Isoenzym-Loci	GRILL et al. 1985, ALTUKHOV et al. 1986a, 1986b, MUONA et al. 1987, GEBUREK & VON WUEHLISCH 1989, BREITENBACH-DORFER & GEBUREK 1995
Rekolonisierung der Fichte nach der letzten Eiszeit	BERGMANN 1984
Zuordnung unbekannter Samenherkünfte	BERGMANN 1975, HOLZER 1975, RUETZ & BERGMANN 1988, HOSIUS et al. 1996b
Zusammenhang von genetischer Struktur und Sensitivität gegenüber atmosphärischer Belastung	BRAUN 1977, SCHOLZ 1984, SCHOLZ & BERGMANN 1984, BERGMANN & SCHOLZ 1986, 1987, 1989, HATTEMER & ZIEHE 1987, GEBUREK 1988, SCHMIEDEL 1988, SCHOLZ et al. 1989, WILD 1990, HANTGE 1992, HOSIUS & BERGMANN 1993, HOSIUS 1994, MÜLLER-STARCK 1995c, PRUS-GLOWACKI & GODZIK 1995, BERGMANN & HOSIUS 1996a, HOSIUS et al. 1996a, IPSEN et al. 1998
Strategie zur Genkonservierung der Fichte	FINKELDEY 1992, STARKE 1993

Hinsichtlich der Differenzierung von Freilandpopulationen werden heute – insbesondere im Vergleich zu DNA-gestützten Verfahren – die **beschränkte Markerzahl** sowie der **geringe Polymorphiegrad** als Problemfelder diskutiert (vgl. u.a. WILDE et al. 1992, KOLLER et al. 1993, CHAN & SUN 1997). Nach derzeitigem Stand der Forschung gilt die Zahl analysierbarer Isoenzym-Loci in *Picea abies* als limitiert (SVOLBA 1990, MÜLLER-STARCK et al. 1992). Es muss davon ausgegangen werden, dass das außerordentlich große Genom der Fichte (3-4x10^{10} bp, MIKSCHE 1985, GOVINDARAJU & CULLIS 1991) mit diesem Markertyp nicht repräsentativ untersucht werden kann. RIEGEL (2001) geht in diesem

Zusammenhang davon aus, dass weite Bereiche des Kerngenoms in den bisherigen ökologisch-genetischen Studien nicht erfasst wurden bzw. unterrepräsentiert sind. Im Rahmen von Forst-Management und Saatgut-Programmen wurde bereits mehrfach auf die Notwendigkeit der Verbesserung der Kenntnis über die Genetik der Fichte hingewiesen und die Konservierung der genetischen Variation der Fichte angemahnt (FINKELDEY 1992, STARKE 1993).

2.4.2 DNA-gestützte Verfahren

Seit Anfang der 1990er Jahre stehen Methoden zur Verfügung, mit denen Differenzierungen zwischen Taxa auf DNA-Ebene nachgewiesen werden können (vgl. DHILLON 1987, FINESCHI et al. 1991, FORREST 1994, BARADAT et al. 1995). Da mit diesen Verfahren größtenteils auch im nicht codierenden (unexprimierten) Bereich der DNA Polymorphismen nachgewiesen werden können, steht zum einen eine **annähernd unbegrenzte Markerzahl** zur Verfügung und zum anderen wird auch eine wesentlich **höhere Variabilität nachweisbar**. Die DNA ist darüber hinaus ontogenetisch und somatisch stabil und somit vom Entwicklungsstand des untersuchten Organismus und dem ausgewählten Organ unabhängig.

Aufgrund ihres großen Genoms und dem Mangel an Information über die Kopplung der Merkmale (LEHNER et al. 1995) wurden Baumarten allerdings lange Zeit als schwieriges Untersuchungsobjekt für genetische Fragestellungen eingeschätzt. Wenngleich zunehmend Informationen zum Genom von Koniferen bzw. im Speziellen zu *Picea abies* zusammengetragen wurden (vgl. SAX & SAX 1933, KIELLANDER 1950, KHOSHOO 1961, SCHMIDT-VOGT 1978, OHRI & KOSHOO 1986, TOUSSAINT 1993), entwickelte sich die DNA-Forschung bei diesen Taxa verhältnismäßig langsam. Aus diesem Grund ist die DNA-Analytik – trotz rascher methodischer Entwicklung – in forstgenetischen Studien bei weitem noch nicht so etabliert wie die seit den 1970er Jahren verwendeten isoenzymatischen Verfahren (vgl. ROTHE 1988, STRAUSS et al. 1992). Heute geht man allerdings davon aus, dass mit Hilfe der DNA-Analytik die beschränkte Anwendbarkeit der Isoenzymanalyse überwunden werden kann und neue, detailliertere Informationen gewonnen werden können. Der Einsatz von DNA-Markern wird insbesondere hinsichtlich folgender Aspekte diskutiert (vgl. GRATTAPAGLIA et al. 1992, NEALE & HARRY 1994, HEINZE et al. 1996, GEBUREK 1997):

- Reproduktionsforschung,
- Erforschung der genetischen Diversität von Beständen sowie Erforschung des Genflusses zwischen Beständen,
- Überprüfung von Interaktion mit Schadstoffen, Pathogenen oder abiotischen Faktoren,
- Unterstützung der Bereitstellung von an unterschiedliche Umweltbedingungen angepassten Saatgutes für Wiederaufforstungsmaßnahmen,
- Zertifizierung von Saat- und Pflanzgut.

Für die einzelnen Themenkomplexe bzw. ihre jeweiligen Fragestellungen sind verschiedene molekulargenetische Verfahren mehr oder weniger gut geeignet (vgl. FORREST 1994, GILLET 1999, MÜLLER-STARCK & SCHUBERT 2000). Unter alleiniger Berücksichtigung populationsgenetischer Studien, die die Erforschung der genetischen Diversität und der Differenzierung von *Picea abies*-Populationen zum Inhalt haben, sind insbesondere die Verwendung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs) und von VNTR-Polymorphismen (*variable number of tandem repeats*) zu nennen. Während Anfang der 1990er Jahre beispielsweise noch das komplexe **DNA-Fingerprint**-Verfahren für Diversitätsanalysen an Fichten verwendet wurde (KREIKE et al. 1991) und später mittels **AFLP**-Verfahren RFL-Polymorphismen untersucht wurden (PAGLIA & MORGANTE 1998, PAGLIA et al. 1998, vgl. auch VOS et al. 1995), konnte sich mit der Entwicklung automatisierter und deshalb einfacherer Verfahren insbesondere die auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) basierenden Methoden durchsetzen (vgl. MULLIS & FALOONA 1987, SAIKI et al. 1988, SAIKI 1990, MULLIS et al. 1994). Wenn auch zahlreiche PCR-gestützte Techniken mittlerweile beschrieben wurden (KARP et al. 1998), wurden letztlich hauptsächlich zwei Verfahren für Studien an *Picea abies* angewandt.

Während SKOV (1998a, 1998b, 1998c, 1999) und SKOV & WELLENDORF (1998) sich hauptsächlich noch mit methodischen Entwicklungen zur **RAPD**-PCR (*random amplified polymorphic DNA*) beschäftigten (vgl. auch HEINTZE et al. 1996, SCHEEPERS 1997a, 1997b, COLLIGNON & FAVRE 2000), wurden von der IPGRI-Arbeitsgruppe um G. BUCCI neben der RAPD-PCR (vgl. BUCCI & MENOZZI 1993, 1995, 2002, BINELLI & BUCCI 1994, BUCCI et al. 1995, 1997a) auch Mikrosatellitenverfahren (**SSR**, *simple sequence repeat*) zur Differenzierung italienischer *Picea abies*-Bestände auf ihre Eignung überprüft und für populationsgenetische Studien verwendet (vgl. BUCCI & VENDRAMIN 2000, SCOTTI et al. 2000, VENDRAMIN et al. 2000).

Durch zunehmende Entwicklung spezifischer SSR- (PFEIFFER et al. 1997, GEBUREK et al. 1998, SCOTTI et al. 2002a, 2002b) und **EST**-Primer (*expressed sequence tags*) (RIEGEL 2001, SCHUBERT et al. 2001) wurden in den letzten Jahren die bestehenden Verfahren weiterentwickelt. Es ist davon auszugehen, dass sie eine detailliertere Erforschung der genetischen Struktur von *Picea abies* ermöglichen. Ebenso sei in diesem Zusammenhang auf die Untersuchungen von KARVONEN et al. (1994) und MAGGINI et al. (2000) sowie von SUTTER (1997) und SPERISEN et al. (1999) verwiesen, die sich mit ITS (*internal transcribed spacers*) in Ribosomen sowie der Sequenzierung von Organellen-DNA beschäftigen. In Tab. 3 sind die Arbeitsschwerpunkte molekulargenetischer Analysen an *Picea abies* zusammengefasst.

Die raschen methodischen Fortschritte der letzten Jahre lassen vermuten, dass durch zunehmende Automatisierung in naher Zukunft vermehrt **Genkarten** von *Picea abies* entwickelt werden können und dies neben koordiniert durchgeführter **DNA-Sequenzierung** zu einer sukzessiven Aufschlüsselung des Genoms führt.

Tab. 3: Arbeitsschwerpunkte molekulargenetischer Analysen mit Picea abies

Arbeitsschwerpunkte	Quellen
Erforschung der genetischen Struktur der Fichte	BUCCI & MENOZZI 1993, BINELLI & BUCCI 1994, LEHNER et al. 1995, HEINZE et al. 1996, BUCCI et al. 1997a, FOURRÉ et al. 1997, SUTTER 1997, SCHUBERT et al. 1998, SKOV & WELLENDORF 1998, SKOV 1998a, 1999, MAGGINI et al. 2000, BUCCI & MENOZZI 2002, BASTIEN et al. 2003
Ermittlung der Verteilung der genetischen Variabilität	BUCCI & MENOZZI 1995, BUCCI 1997, PFEIFFER et al. 1997, SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b, GEBUREK et al. 1998, BUCCI & VENDRAMIN 2000, VENDRAMIN et al. 2000, TROGGIO et al. 2001, KRAJ 2002
Rekolonisierung der Fichte nach der letzten Eiszeit	SCHEEPERS et al. 1997a, GEBUREK et al. 1998, COLLIGNON & FAVRE 2000, BUCCI & VENDRAMIN 2000, VENDRAMIN et al. 2000, GUGERLI et al. 2001
Entwicklung und Anwendung neuer molekulargenetischer Methoden	BUCCI et al. 1995, PFEIFFER et al. 1997, SCOTTI et al. 1998, 2000, 2002a, 2002b, SKOV 1998b, 1998c, 1999, RIEGEL 2001, SCHUBERT et al. 2001, JEANDROZ et al. 2002

2.5 Geeignete Markertypen

Die Analyse genetischer Variation begann ursprünglich auf der Ebene der phänotypischen Variation von Individuen. Wie bereits in Kap. 2.4 beschrieben, führte der technische Fortschritt zu einer Verschiebung des methodischen Spektrums auf Enzym- und später auf die DNA-Ebene. Mittlerweile haben sich zahlreiche Arbeiten mit der Auswahl geeigneter Methoden bzw. der hierbei verwendeten Markertypen beschäftigt (vgl. u.a. GILLET 1993, 1999, FORREST 1994, MÜLLER-STARCK & SCHUBERT 2000). Diese beinhaltet sowohl die Betrachtung grundsätzlicher Anforderungen, die ein Marker erfüllen muss (vgl. NEALE & HARRY 1994), als auch die Beantwortung der Frage, welcher Markertyp für welchen Zweck am geeignetsten erscheint (vgl. KARP et al. 1998, SUNNUCKS 2000). Für Waldbaumpopulationen sei hier insbesondere auf die umfassenden Untersuchungen von FORREST (1994) und GILLET et al. (1999) verwiesen. Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, ist der sinnvolle Einsatz eines Markertyps stark von der jeweils zu beantwortenden Fragestellung abhängig. In Tab. 4 sind die Eigenschaften ausgewählter genetischer Markertypen vergleichend dargestellt.

Wie aus den Ausführungen in Kap. 2.4 bereits hervorgegangen ist, wurden in forstgenetischen Untersuchungen bisher hauptsächlich **isoenzymatische Verfahren** verwendet. Der Vorteil der Isoenzymanalyse besteht hauptsächlich darin, dass es sich bei den exprimierten Enzymen um funktionale Einheiten handelt, die beispielsweise mit dem Stoffwechsel assoziieren und deswegen Aussagen über Anpassungen der untersuchten Population über die Zeitachse ermöglichen. Des Weiteren sind durch die langjährigen Erfahrungen mittlerweile einige differenzierende Markersysteme bekannt, wie beispielsweise der 6-PGDH-Locus, der in einigen Untersuchungen eine höhenabhängige Variabilität vermuten lässt (vgl. KONNERT & FRANKE 1990, 1991, FRANKE & KONNERT 1990, GÄRTNER et

al. 1996). Als große Probleme der Isoenzymanalytik werden heute allerdings die **beschränkte Markerzahl** sowie der vergleichsweise **geringe Polymorphiegrad** gesehen (vgl. u.a. WILDE et al. 1992, KOLLER et al. 1993, CHAN & SUN 1997). Die Zahl analysierbarer Isoenzym-Loci in *Picea abies* gilt nach derzeitigem Stand der Forschung als limitiert (MÜLLER-STARCK et al. 1992). SVOLBA (1990) spricht für die fünf sinnvoll einsetzbaren Enzymsysteme LAP, GOT, GDH, IDH, MDH von insgesamt 27 Allelen. Akkurate Schätzungen der Genfrequenzen einer Population können somit nur über sehr große **Stichprobenzahlen** erhalten werden (LAGERCRANTZ et al. 1988). Des weiteren sind Isoenzyme nicht somatisch stabil. Die Problematik der **organspezifischen Isoenzymmuster** erfordert deswegen auch eine ausreichend große Stichprobe pro Baum. Ein in diesem Zusammenhang ebenfalls zu berücksichtigender Nachteil besteht darin, dass Isoenzyme auch ontogenetisch nicht stabil sind und deswegen Varianzen zwischen zwei Merkmalen auftreten, die durch den Entnahmetermin zu erklären sind (SAUER et al. 1973). Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass die ermittelbaren Polymorphismen nicht ausreichend sind, um die in vorliegender Untersuchung betrachteten Populationen zu charakterisieren und hinsichtlich geeigneter statistischer Parameter zu differenzieren.

Tab. 4: Eigenschaften verschiedener genetischer Marker und ihre Eignung für populationsgenetische Untersuchungen (verändert nach BERGMANN & LEINEMANN 2000, GLAUBITZ & MORAN 2000 und RIEGEL 2001); +++ sehr gut, ++ gut, + ausreichend, - ungeeignet

		Isoenzyme	STS, ESTs	RAPDs, AFLPs	SSRs	cpSSR
Eigenschaften	Anzahl Loci pro Reaktion	1 oder mehr	1 oder mehr	1-80	1 oder mehr	1
	Vererbung	codominant	codominant	dominant	codominant	uniparental
	Variabilität	niedrig-mittel	niedrig-mittel	sehr hoch	hoch	mittel
	Genexpression	Unterschiede zw. Allelen möglich	Unterschiede zw. Allelen möglich	unbekannt	nicht codierend	nicht codierend
	Entwicklungsaufwand	niedrig	sehr hoch	niedrig	sehr hoch	hoch
Eignung	Genetische Diversität	+	+	++	+++	+
	Populationsdifferenzierung	+	+	++	++	++
	Genotypische Struktur	++	++	-	++	-
	Adaptive Variation	+	++	-	-	+

Im Vergleich zur Isoenzymanalyse haben die meisten „moderneren“ **molekulargenetischen Verfahren** (DNA-Techniken) gegenüber herkömmlichen Methoden eindeutige Vorteile im Informationsgehalt. Neben dem bei der Isoenzymanalyse ausschließlich analysierten exprimierten Genom wird auch der nicht codierende Genom-Bereich betrachtet. Zum einen kann dadurch ein größerer Teil des Genoms auf Variation untersucht werden (VORNAM 1993), zum anderen können durch Methoden, die nicht codierende Bereiche des Genoms in die Untersuchung einbeziehen, höhere Polymorphiegrade aufgedeckt werden. Denn dieser Bereich unterliegt nicht der Selektion, d.h.

Mutationen in diesem Abschnitt werden weitervererbt und können einen wesentlichen Beitrag für die Betrachtung der Differenzierung von Individuen und Populationen liefern. CHAN & SUN (1997) sprechen in diesem Zusammenhang von einer Unterschätzung der genetischen Variabilität durch Isoenzymanalysen und belegen dies mit einem doppelt so hohen Prozentsatz an polymorphen Loci bei molekulargenetischen Analysen an denselben Individuen. Außerdem sind DNA-Marker ubiquitär und nicht entwicklungs- bzw. gewebespezifisch, wie es bei manchen Isoenzymen der Fall sein kann (vgl. z.B. KIM 1979, 1985). Zudem ist die DNA in der Regel von Umweltfaktoren noch unabhängiger und durch ihre Stabilität sind auch rückwirkend noch Untersuchungen möglich, während die Isoenzymanalysen darauf angewiesen sind, dass die Enzyme während der Probenahme und -lagerung nichts an ihrer katalytischen Funktion bzw. Aktivität verlieren (VORNAM 1993).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass aufgrund der raschen methodischen Weiterentwicklung molekulargenetischer Verfahren mittlerweile eine **große Zahl an Markersystemen** vorliegt. Mit einem für die vorliegende Untersuchung geeigneten System müssen aber sowohl Individuen als auch Populationen differenziert werden können. Dazu bedarf es des Nachweises vieler Polymorphismen, was nur durch eine große Markerzahl gewährleistet werden kann. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass für die Auswahl einer geeigneten molekulargenetischen Methode die jeweilige Probenmatrix und die eigentliche DNA-Quelle wichtige Kriterien darstellen. Dementsprechend sollen diese beiden Aspekte in der Folge kurz beleuchtet werden.

Auswahl der DNA-Quelle

Bei der Auswahl einer geeigneten Methode muss in einem ersten Schritt festgelegt werden, welches **Kompartiment** einer Pflanzenzelle als **DNA-Quelle** betrachtet wird. Im Gegensatz zur Zellkern-DNA ist Organellen-DNA (Chloroplasten, Mitochondrien) oft phylogenetisch stark konserviert und wird meist uniparental vererbt. Wenngleich die Vererbungsmodi der Organellen-DNA mittlerweile für die meisten Gymnospermen aufgeklärt sind (vgl. u.a. RIESEBERG & SOLTIS 1991, WAGNER et al. 1991, HIPKINS et al. 1994), sind einige Aspekte hinsichtlich der Beantwortung der eingangs gestellten Fragen sicherlich kritisch zu diskutieren.

Die **mitochondriale DNA** (mtDNA) wird bei *Picea abies* rein maternal vererbt (CHANDELIER et al. 1999). Sie unterliegt aufgrund dieses Vererbungsmodus einer vergleichsweise langsamen Sequenz-Evolution, was mit einer großen Zahl an Generationen bis zur Differenzierung von Individuen gleichzusetzen ist. Mitochondriale DNA wird deshalb häufig zur Untersuchung von Veränderungen des Genoms über lange Zeitachsen verwendet, wie beispielsweise der Erklärung von Rückwanderungen und -wegen nach den Eiszeiten (vgl. GRIVET et al. 1999, SINCLAIR et al. 1998, 1999, SORANZO et al. 2000). Hinsichtlich der genetischen Differenzierung von Beständen innerhalb eines mehr oder weniger abgeschlossenen Areals erscheint die mtDNA eher ungeeignet. Aufgrund des geringeren Polymorphiegrades ist insbesondere hinsichtlich der Differenzierung der künstlichen Bestände außerhalb des Verbreitungsgebietes der Fichte nicht von einem zielführenden Ansatz

auszugehen. Die Problematik der langsamen Sequenz-Evolution im Vergleich zu Chloroplasten-DNA (cpDNA) oder nukleärer DNA (nDNA) wurde bereits in zahlreichen Untersuchungen thematisiert und diskutiert (vgl. u.a. WAGNER 1992, BIRKY 1995, DEMESURE et al. 1995, LAROCHE et al. 1997, LUNT et al. 1998, PALMER et al. 2000, JARAMILLO-CORREA et al. 2003).

Die **Chloroplasten-DNA** (cpDNA) ist in Koniferen rein paternal vererbt und im Gegensatz zu dem cp-Genom anderer höherer Pflanzen mit 120 kbp verhältnismäßig klein (vgl. WAGNER 1992, PHILPIPS 1998). Paternaler Vererbungsmodus bedeutet in diesem Zusammenhang zwar eine im Vergleich zur mtDNA höhere Sequenz-Evolution des cp-Genoms, die hohe Mobilität der männlichen Samen hat aber auch hinsichtlich der Analyse der Variabilität innerhalb und zwischen Populationen einen entscheidenden Nachteil: Bei *Picea abies* handelt es sich um eine windbestäubte Art, bei der die Pollen in Abhängigkeit von den Windverhältnissen große geographische Distanzen überbrücken können. Das heißt, durch die Analyse von cpDNA wird die Ausbreitungstendenz der untersuchten Individuen automatisch mit berücksichtigt (MÜLLER 1976, CAMPBELL 1991, SUTTON et al. 1991, BURG et al. 1998, BIRKY 1995, SPERISEN et al. 1999). Problematisch wird dies in Untersuchungen, die Differenzierungen innerhalb einer Population bzw. zwischen geographisch nahe gelegenen Populationen nachweisen wollen. Wenn auch Untersuchungen zur Differenzierung von Koniferen-populationen mittels cpDNA von skandinavischen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden (SZMIDT 1991, SIGURGEIRSSON & SZMIDT 1991, 1993, SIGURGEIRSSON 1992), so wurden bis heute nur sehr wenige detaillierte Untersuchungen zum cp-Genom der Fichte angestrebt (VENDRAMIN et al. 1996, SUTTER 1997, AUTINO et al. 1998, PROVAN et al. 2001). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die Analyse von cpDNA hinsichtlich der eingangs gestellten Fragen nicht unbedingt empfiehlt und aufgrund noch fehlender Erfahrung als nicht zielführend betrachtet werden muss.

Das haploide **(nukleäre) Kern-Genom** (nDNA) von *Picea abies* wird auf 2-4 x 10^{10} Basenpaare geschätzt (MIKSCHE 1985, GOVINDARAJU & CULLIS 1991, NEALE & HARRY 1994, PAGLIA et al. 1998) und ist im Vergleich zu anderen Pflanzen vergleichsweise groß und mit komplexen Sequenzen ausgestattet (vgl. ARUMUGANATHAN & EARLE 1991, BINELLI & BUCCI 1994, MORGANTE et al. 1996, O'MALLEY & WHETTEN 1997). Die Unkenntnis der Sequenzen erschwert neben dem Fehlen von Probenmaterial älter als zwei Generationen und der langen Generationszeit (CARLSON et al. 1994) zwar wesentlich die genetische Analyse, die Genomgröße selbst stellt aber gleichzeitig auch einen wesentlichen Vorteil für die Analyse von Differenzierungen zwischen Individuen und Populationen dar. Denn aufgrund vergleichsweise hoher Mutationsraten zeichnet sich die nDNA im Individuenvergleich durch eine deutlich höhere Zahl an Polymorphismen und damit durch eine höhere Variabilität aus, was die Differenzierung von Individuen und Populationen wesentlich vereinfacht. Aufgrund der Genom-größe und seinem hohen Anteil an repetetiver DNA sind zahlreiche Marker nachweisbar (PFEIFFER et al. 1997). Die Kern-DNA stellt somit die universellste DNA-Quelle dar und kann auch aufgrund des erfolgreichen Einsatzes in zahlreichen populationsgenetischen Studien als geeignet betrachtet werden (vgl. DHILLON 1987, BURKE et al. 1991, EL-KASSABY 1991, O'MALLEY & WHETTEN 1997).

Auswahl der Probenmatrix

Wie bereits bei der Betrachtung der Isoenzymanalyse erwähnt, spielt die Proben-Matrix für die Auswahl geeigneter Markersysteme ebenfalls eine wesentliche Rolle. Allerdings soll in diesem Zusammenhang lediglich die Auswahl zwischen haploidem und diploidem Gewebe verstanden werden (vgl. KUBISIAK et al. 1996). Im Rahmen isoenzymatischer Untersuchungen wird in den meisten Fällen der **Megagametophyt** als Probenmatrix verwendet (vgl. u.a TULSIERAM et al. 1992, WANG et al. 1996). Das haploide Genom der Megagametophyten repräsentiert den mütterlichen/weiblichen Anteil embryonaler DNA (CHAMBERLAIN 1935) und ist deshalb direkt zur Nachkommenschaftsprüfung einsetzbar. Weitere Vorteile haploider DNA aus Megagametophyten sind von TULSIERAM et al. (1992) umfassend beschrieben worden (vgl. auch GREGORIUS 1977, 1980). Nachteile bestehen aber insbesondere in der jahreszeitenabhängigen Verfügbarkeit und in der notwendigen Menge an Probenmaterial. Aus diesem Grund hat sich in den letzten Jahren zunehmend die Verwendung von **Nadelmaterial** durchgesetzt. Hierbei handelt es sich um diploides Gewebe, das – auch aufgrund seiner ganzjährigen Verfügbarkeit – vergleichsweise einfach zu beproben ist und im Gegensatz zu Megagametophyten vom Entwicklungszyklus des Individuums unabhängig ist (vgl. SKOV 1998b, SKOV & WELLENDORF 1998). Diploides Nadelgewebe ermöglicht darüber hinaus den Einsatz hochinformativer codominanter Verfahren und soll aus diesen Gründen als Probenmatrix in vorliegender Untersuchung Verwendung finden.

Auswahl der Methode

Anhand der Ergebnisse der in Kap. 2.4.1 und 2.4.2 vorgestellten Untersuchungen ist von einer hohen genetischen Variabilität der untersuchten Populationen auszugehen. In diesem Zusammenhang erscheinen Methoden, die auf der Analyse von RFLPs basieren (**DNA-Fingerprinting**, **AFLP**), als zu komplex und aufwändig (vgl. KRAWCZAK & SCHMIDTKE 1994 , VOS et al. 1995). Die Vorteile des DNA-Fingerprinting liegen darin, dass zum einen eine wesentlich höhere Variabilität nachweisbar ist und zum anderen eine sehr exakte Beschreibung des Genoms möglich ist. Ein Nachteil ist sicherlich, dass diese Arbeiten durch die Anwendung der Hybridisierung und des Blottens sehr zeit- und kostenintensiv sind und dadurch nur begrenzt Anwendungen finden können (WILLIAMS et al. 1993, KRAWCZAK & SCHMIDTKE 1994). Gerade in Untersuchungen, die sich mit großen Stichproben beschäftigen, hat das DNA-Fingerprinting seine Grenzen (WILLIAMS et al. 1993). Ein Nachteil, der besonders von HADRYS et al. (1992) betont wird, ist im dargestellten Polymorphiegrad auszumachen. Die Variabilität, die durch das DNA-Fingerprinting darstellbar ist, kann bei dem Vergleich von Populationen über mehrere Jahre zu derart großen Unterschieden führen, dass die unmittelbare Verwandtschaft der Jahrgänge nicht mehr nachweisbar ist.

Im Gegensatz dazu stellen Methoden, die auf der **Polymerasekettenreaktion** (*polymerase chain reaction*, PCR) beruhen, wesentlich einfachere und universellere Verfahren dar (vgl. MULLIS & FALOONA 1987, SAIKI et al. 1988, MULLIS 1990). Bei der PCR handelt es sich um ein Verfahren, das als

in vitro-Methode das Zellreparatursystem im lebenden System imitiert (vgl. NEWTON & GRAHAM 1994, CHA & THILLY 1995, MICHELI & BOVA 1997). Sie beruht auf einer zyklischen Replikation, bei der in jedem Zyklus die vorhandene DNA verdoppelt wird. Auf diese Art werden DNA-Fragmente von einem einzigen Molekül bis zu einer Größe von 10 kbp in Abhängigkeit von der Zyklenzahl tausend- bis millionenfach vervielfältigt und gelelektrophoretisch oder kapillarelektrophoretisch nachweisbar (vgl. WHITE et al. 1989, ARNHEIM et al. 1990, INNIS & GELFAND 1990, ERLICH et al. 1991, ARNHEIM & ERLICH 1992, MARTIN 1996).

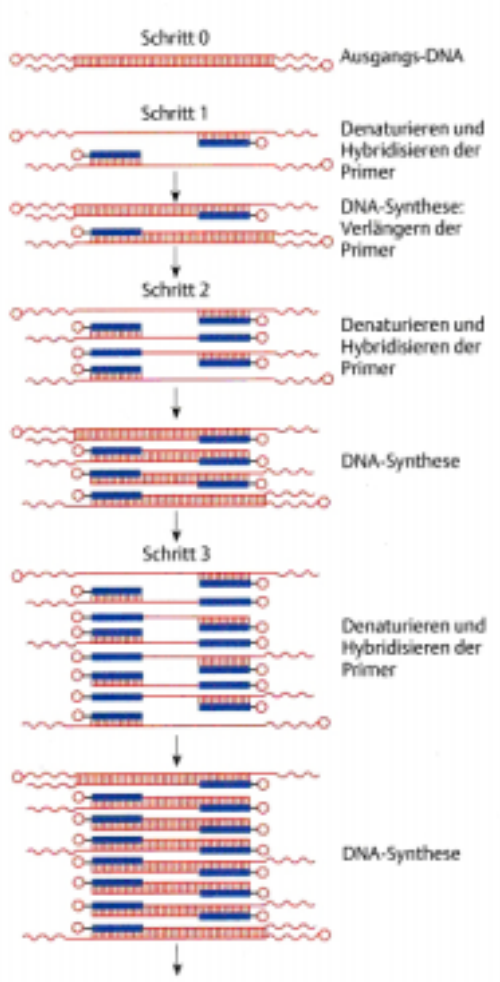


Abb. 7: Schematische Darstellung des PCR-Prinzips (aus KNIPPERS 1997)

Die PCR hat wegen ihrer Einfachheit als gentechnische Methode die Genetik revolutioniert und Einzug gehalten in Molekularbiologie, medizinische Diagnostik, Forensik und vor wenigen Jahren auch in die Populationsgenetik (vgl. HAGEN-MANN & MANN 1990, WELSH & MCCLELLAND 1990, HANKE 1992, HUMMEL 1992). Der wissenschaftliche Durchbruch der PCR kam durch die Nutzung temperaturstabiler Polymerasen (SAIKI et al. 1988, GELFAND & WHITE 1990, DIEFFENBACH et al. 1995) und somit ihrer Automatisierung, wodurch die für Denaturierung, Annealing und Amplifikation

notwendigen Temperaturzyklen in einem Thermocycler automatisch nacheinander ablaufen können und so mögliche Fehlerquellen minimiert werden. Neben zahlreichen, mittels PCR-gestützter Verfahren durchgeführten forstgenetischen Studien (vgl. Kap. 2.4.2; NEALE & HARRY 1994) betonen insbesondere BOUSQUET et al. (1990) und SCHEEPERS et al. (1997b), dass dieses Verfahren aufgrund der Leichtigkeit, mit der Informationen über eine Vielzahl von Individuen erhalten werden können, sowohl für phylogenetische Zwecke im Management von Forstpflanzen als auch in forstgenetischen Populationsuntersuchungen von großem Interesse sein kann.

Wenn auch PCR-Verfahren vergleichsweise empfindlich auf Störgrößen reagieren (vgl. Kap. 6.1.4), sind die einfache Anwendung, die Möglichkeit der Analyse großer Stichproben sowie die große Zahl potenziell polymorpher Loci die wesentlichen Gründe, warum PCR-gestützte Verfahren für die populationsgenetischen Analysen in vorliegender Untersuchung als die am besten geeigneten Methoden ausgewählt wurden. In den Folgekapiteln sind die einzelnen ausgewählten Verfahren bzw. die Gründe ihrer Auswahl erläutert.

2.5.1 *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD)

Die RAPD-PCR stellt die einfachste Variante der PCR-gestützten Verfahren dar. Ihr Prinzip beruht darauf, dass ein beliebiger Primer eingesetzt wird, der an komplementären Genorten bindet (MULLIS et al. 1994, WILLIAMS et al. 1990). Somit können auch Polymorphismen in Organismen nachgewiesen werden, über deren Genom noch nichts oder wenig bekannt ist (HADRYS et al. 1992, CASTIGLIONE et al. 1993). Zudem bedarf es keiner aufwändigen Vorarbeiten, wie der Entwicklung von Sonden im DNA-Fingerprinting oder der Sequenzierung von DNA-Abschnitten zur Erstellung geeigneter Primer bei der herkömmlichen PCR (vgl. WILLIAMS et al. 1990). Diese universelle Einsetzbarkeit – auch bei komplexen Koniferengenomen – und die Identifizierung einer großen Zahl polymorpher Marker, die über das gesamte Genom verteilt sind, hat sie in den 1990er Jahren zu einem bedeutenden Werkzeug in der Populationsgenetik werden lassen. Die mit Hilfe der RAPD-PCR erhaltbare vergleichsweise große Markerzahl macht die Methode für Untersuchungen mit dem Ziel der Differenzierung von Individuen und/oder Populationen, im Vergleich zu Organelluntersuchungen, Isoenzymen und RFLPs ideal (TULSIERAM et al. 1992). BUCCI et al. (1997) gehen in diesem Zusammenhang aufgrund der höheren Markerzahl und der dadurch bedingten höheren statistischen Aussagekraft von einer wesentlich größeren Sensitivität der RAPD-Analyse bezüglich der Unterscheidung von Populationen im Vergleich zu Isoenzymanalysen aus (vgl. RAFALSKI et al. 1991, 1993, RAFALSKI 1997).

Das RAPD-Verfahren unterscheidet sich von anderen Random-Primer-Verfahren (DAF, AP-PCR) durch die Anwendung eines meist decameren Primers und durch eine relativ geringe Annealingtemperatur (WELSH & MCCLELLAND 1990, 1991, CAETANO-ANOLÉES et al. 1991, 1992, CAETANO-ANOLÉES 1993, MCCLELLAND & WELSH 1994). Die amplifizierten Fragmente werden mittels

einer Stärkegel-Elektrophorese getrennt und durch eine färbende Ethidiumbromid-Lösung auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht (WILLIAMS et al. 1990, MARTIN 1996).

RAPD-Analysen mit Pflanzen beschäftigten sich meist mit wirtschaftlich bedeutende Nutzpflanzen wie Mais (WELSH et al. 1991, LANZA et al. 1997), Reis (SUH et al. 1997), Getreide (RUSSELL et al. 1997, DE BUSTOS et al. 1998), Baumwolle (IQBAL et al. 1997) oder auch *Brassica* sp. (DEMEKE et al. 1992, KRESOVICH et al. 1992, HALLDÉN et al. 1994, LANNÉR et al. 1996), Kakao (WILDE et al. 1992, N'GORAN et al. 1994), Apfel (KOLLER et al. 1993) oder Wein (BÜSCHER et al. 1993). Daneben sind aber auch Studien zu Baumarten wie beispielsweise Pappel (CASTIGLIONE et al. 1993), Buche (GALLOIS et al. 1998), Birke (ROY et al. 1992), Eukalyptus (NESBITT et al. 1997) und Robinie (DE FILIPPIS & MAGEL 1998) durchgeführt worden. Besonders erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die RAPD-Analysen an anderen Koniferen-Arten wie zum Beispiel *Taxus brevifolia* (GÖÇMEN et al. 1996) sowie die in Tab. 5 aufgeführten Untersuchungen zu Arten der Familie der *Pinaceae*.

Tab. 5: Liste der bis 2001 mittels RAPD-Analyse untersuchten Pinaceae-Arten

Art	Quelle
Picea abies	BUCCI & MENOZZI 1993, 1995, BUCCI et al. 1995, 1997a, HEINZE & SCHMIDT 1995, LEHNER et al. 1995, SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b, HEINZE et al. 1996, LEIBENGUTH & SHOGHI 1998, SKOV 1998a, 1998b, 1998c, SKOV & WELLENDORF 1998, COLLIGNON & FAVRE 2000, TROGGIO et al. 2001
Picea engelmanni	KHASA & DANCIK 1996
Picea glauca	CARLSON et al. 1991, TULSIERAM et al. 1992
Picea mariana	PERRON et al. 1995, ISABEL et al. 1993, 1995
Picea rubens	PERRON et al. 1995
Picea sitchensis	VAN DE VEN & MCNICHOL 1995
Picea spec.	NKONGOLO et al. 1998, NKONGOLO 1999
Pinus brutia	KAYA & NEALE 1993, 1995
Pinus caribaea	DALE & TEASDALE 1995
Pinus elliotti	NELSON et al. 1993, KUBISIAK et al. 1995, DALE & TEASDALE 1995
Pinus leucodermis	BOSCHERINI et al. 1994, BUCCI et al. 1997b
Pinus nigra	KAYA & NEALE 1993
Pinus palustris	NELSON et al. 1994, KUBISIAK et al. 1995, 1996
Pinus pinaster	PLOMION et al. 1995a, 1995b, PLOMION & O'MALLEY 1996, COSTA et al. 2000
Pinus radiata	DEVEY et al. 1996
Pinus resinosa	MOSSELER et al. 1992
Pinus silvestris	LU et al. 1994, 1995, 1997, YAZDANI et al. 1995, SZMIDT et al. 1996, HURME & SAVOLAINEN 1999
Pinus strobus	ECHT & NELSON 1997
Pinus spec.	FURMAN et al. 1997
Abies alba	VICARIO et al. 1995
Pseudotsuga menziesii	CARLSON et al. 1991, JERMSTAD et al. 1994, 1998, AAGARD et al. 1998a, 1998b, KRUTOVSKII et al. 1996, 1998
Larix decidua	ARCADE et al. 2000
Larix kaempferi	ARCADE et al. 2000

Wie in Kap. 2.4.2 und in Tab. 5 bereits dargestellt, wurden im Laufe der letzten Jahre grundlegende Kenntnisse hinsichtlich des RAPD-Markersystems in *Picea abies* erarbeitet (BUCCI et al. 1995, 1997). Die Anwendbarkeit der Methode für eine solche Fragestellung ist beispielsweise durch die Arbeiten von BUCCI & MENOZZI (1993, 1995), HEINZE et al. (1996) und SCHEEPERS et al. (1997a, 1997b) belegt, die anhand ausgewählter Marker die Verteilung genetischer Variabilität in natürlichen Populationen bzw. in Klonsamenplantagen in Italien, Belgien und Österreich untersuchten. Darüber hinaus haben sich RAPD-Marker bereits bei der Analyse der genetischen Variabilitäten der Sitka-Fichte (*Picea sitchensis*) und bei der Identifizierung von deren Klonen als nützlich erwiesen (VAN DE VEN & MCNICHOL 1995). Methodische Optimierung erfuhr diese Methode insbesondere durch die Arbeiten von SKOV (1998a, 1998b, 1998c, 1999) sowie SKOV & WELLENDORF (1998).

Als Problem dieser Methode muss allerdings die dominante Expression der RAPD-Marker genannt werden. Das bedeutet, dass es – im Gegensatz zur RFLP-Analyse – in diploidem Gewebe nicht möglich ist zwischen homozygot dominanten und heterozygoten Genotypen zu unterscheiden. Damit geht mit der RAPD-PCR ein Informationsverlust einher, da nicht zwischen heterozygoten und homozygoten Markern unterschieden werden kann (vgl. WELSH et al. 1991, CLARK & LANIGAN 1993, LYNCH & MILLIGAN 1994). HEDRICK (1992) gibt als Lösung dieses Problems an, dass durch den Einsatz mehrerer Primer die Zahl der RAPD-Marker erhöht wird und eine Informationsdichte erreicht wird, die die statistische Aussagekraft der Untersuchung erhöht. Zudem wurden mittlerweile statistische Schätzmodelle entwickelt, die dieses „Dominanzproblem“ der RAPD-Marker auf mathematische Art berücksichtigen (LYNCH & MILLIGAN 1994, ZHIVOTOVSKY 1999).

2.5.2 *Inter simple sequence repeats* (ISSR)

Die Methode der ISSR-PCR (*inter simple sequence repeat*) wurde Mitte der 1990er Jahre entwickelt und detektiert polymorphe Loci in hochvariablen Mikrosatelliten(SSR)-Regionen. Die ersten ISSR-Untersuchungen beschäftigten sich hauptsächlich mit Kulturpflanzen und demonstrierten die Hypervariabilität von ISSR-Markern (z.B. GUPTA et al. 1994, ZIETKIEWICZ et al. 1994, KANTETY et al. 1995, KOJIMA et al. 1998, BLAIR et al. 1999, PREVOST & WILKINSON 1999, MCGREGOR et al. 2000). Mittlerweile wurde ISSR auch auf natürliche Populationen zahlreicher verschiedener Wildarten erfolgreich angewendet (ESSELMAN et al. 1999, CAMACHO & LISTON 2001). Allerdings liegen kaum weitere Informationen zu ISSR-Analysen mit Baumarten vor (ARCADE et al. 2000, MATTIONI et al. 2002). Da das Koniferen-Genom, wie bereits in Kap. 2.4 beschrieben, zahlreiche Mikrosatellitenregionen aufweist, an denen die ISSR-Primer binden, erscheint die Methode hinsichtlich der Analyse der genetischen Variabilität der Fichte vielversprechend, wenngleich bisher noch keine ISSR-Analysen mit *Picea abies* durchgeführt wurden.

Die Methode der ISSR-PCR wurde zusammenfassend von WOLFE et al. (1998) und WOLFE & LISTON (1998) beschrieben. Sie ist weitgehend mit der Vorgehensweise bei der RAPD-PCR identisch (vgl.

Abb. 7). Auch hier sind keine Vorkenntnisse hinsichtlich des Genoms des zu untersuchenden Organismus notwendig. Während es sich bei RAPD-Primern um decamere Sequenzen beliebiger Bauart handelt, entsprechen ISSR-Primer in ihrem Aufbau dem von Mikrosatellitenregionen mit meist Di- oder Trinukleotid-Wiederholungen (z.B. $[CA]_n$, $[AG]_n$, $[GTG]_5$). In der Summe ihrer Basenpaare sind diese Primer somit zum Teil wesentlich größer (ca. 20 bp) und die Annealing-Temperaturen müssen dementsprechend höher gewählt werden (vgl. WOLFE et al. 1998). Aufgrund der Länge der Primer ist zwar die Gefahr eines unvollständigen Annealings erhöht, aber dadurch, dass meist weniger polymorphe Loci detektiert werden, sind ISSR-Amplifikationsmuster in den meisten Fällen reproduzierbarer und einfacher auszuwerten (WILLIAMS et al. 1990, GOODWIN et al. 1997, WOLFE & LISTON 1998, BORNET & BRANCHARD 2001).

Die Auftrennung der ISSR-PCR-Produkte erfolgt gelelektrophoretisch (vgl. MARTIN 1996). Die ermittelten Loci werden in eine binäre Matrix überführt und als genetischer Marker verwendet.

2.5.3 *Simple sequence repeats* (SSR)

Die oben bereits beschriebenen Mikrosatelliten (*simple sequence repeats*, SSR)-Regionen bestehen aus tandemartig wiederholten Kopien von Mono-, Di-, Tri oder Tetranukleotidmotiven (GOLDSTEIN & SCHLÖTTERER 1999). Sie sind ubiquitär im Eukaryoten-Genom verteilt und werden aufgrund ihres hohen Polymorphiegrades häufig als genetische Marker verwendet (z.B. TAUTZ 1989, BRUFORD & WAYNE 1993, LI et al. 2002). Als hochvariable und zudem codominante Marker sind sie in der Lage die aus RAPD oder ISSR erhaltenen Informationen wesentlich zu ergänzen – insbesondere hinsichtlich des Heterozygotiegrades (vgl. JARNE & LAGODA 1996, POWELL et al. 1996, RUSSELL et al. 1997). Im Unterschied zu den zuvor genannten Methoden bedarf es hier allerdings der genauen Kenntnis der Mikrosatelliten-Sequenz, da die entsprechenden Primer als das Zielfragment flankierende Sequenzen labortechnisch synthetisiert werden müssen. Dieses Verfahren ist zudem vergleichsweise kostenintensiv, was eine Ursache dafür darstellen kann, dass die SSR-Analyse in Koniferen bisher lediglich sehr begrenzt eingesetzt wurde (SMITH & DEVEY 1994, KOSTIA et al. 1995, PFEIFFER et al. 1997, PAGLIA et al. 1998, PAGLIA & MORGANTE 1998).

SSR-Sequenzen wurden mittlerweile sowohl im Kern- als auch im Chloroplasten-Genom einiger Angiospermen nachgewiesen und ihr Nutzen zur Differenzierung von Individuen, Populationen und Arten wurde mittlerweile glaubhaft demonstriert (MORGANTE & OLIVIERI 1993, SPERISEN et al. 1999). Aufgrund der Grundlagenarbeit von PFEIFFER et al. (1997) liegen SSR-Primer zum Kerngenom der Fichte vor, die bereits erfolgreich in anderen Untersuchungen verwendet wurden (GEBUREK et al. 1998) und in vorliegender Untersuchung hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung deutscher *Picea abies*-Bestände getestet werden sollen.

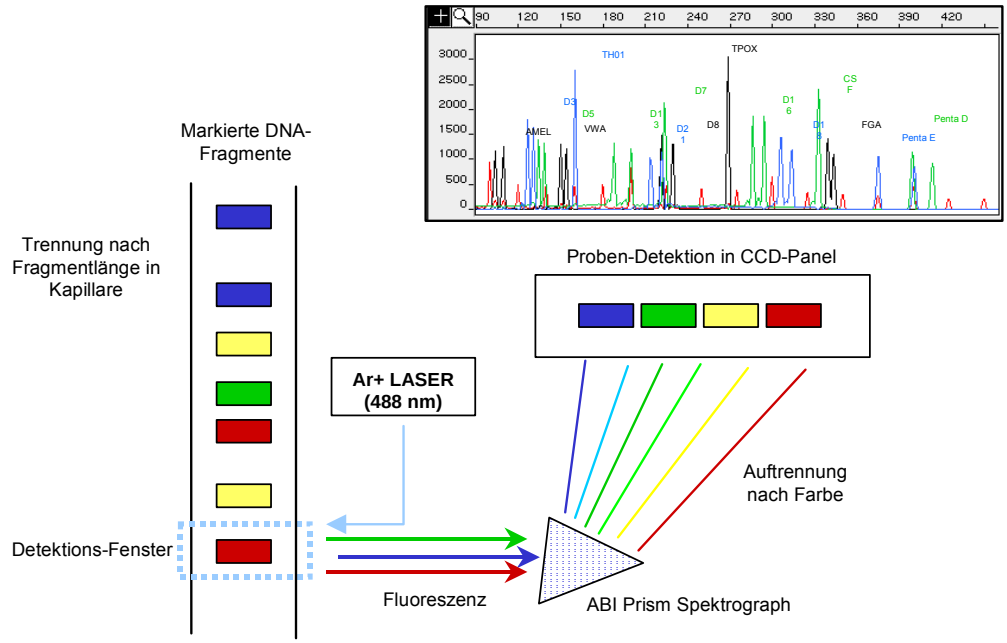


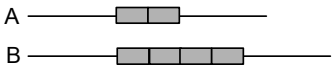
Abb. 8: **Schematische Darstellung der Trennung der SSR-Amplifikationsprodukte durch Kapillarelektrophorese**

...CGTAGCCTTGCATCCTT**CTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTACTACGTGG...
...CGTAGCCTTGCATCCTT**CTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTACTACGTGG...

5‘ flankierende Region — **Mikrosatellit Homozygot (AA)** — 3‘ flankierende Region

...CGTAGCCTTGCATCCTT**CTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTACTACGTGG...
...CGTAGCCTTGCATCCTT**CTCTCTCTCTCTCTCT**ATCGGTACTACGTGG...

5‘ flankierende Region — **Mikrosatellit Heterozygot (AB)** — 3‘ flankierende Region



variable Anzahl von Sequenzwiederholungen (VNTR)

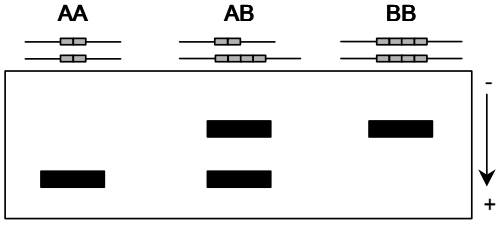


Abb. 9: **Schematische Darstellung der Trennung der SSR-Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese**

Methodisch unterscheidet sich die SSR-Analyse von den beiden erstgenannten Verfahren hauptsächlich dadurch, dass die PCR-Produkte – neben Gel- oder Polyacrylamid-Elektrophorese – auch kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Laser detektiert werden (vgl. Abb. 8). Der nachzuweisende Polymorphismus besteht hierbei darin, dass die Anzahl der oben beschriebenen Sequenzwiederholungen (z.B. [CT]-*repeat*) zwischen verschiedenen Individuen variieren kann. Ist die Anzahl dieser Sequenzwiederholungen und somit die Länge des Mikrosatelliten in einer Population variabel, so eignet sie sich als Marker, mit dessen Hilfe Individuen genetisch voneinander unterschieden werden können (vgl. Abb. 9).

2.5.4 *Expressed sequence tags* (EST)

Den bisher vorgestellten molekulargenetischen Verfahren ist zu eigen, dass sie sowohl den codierenden (Exons) als auch den nicht-codierenden (Introns) Bereich der DNA analysieren. Insbesondere bei der Analyse regelmäßiger Sequenzwiederholungen (*tandem repeats*) wie bei der Mikrosatellitenanalyse ist von der Abbildung nicht codierender DNA-Abschnitte auszugehen. Es kann deshalb keine Aussage über die „Bedeutung“ und die Funktionalität der analysierten Regionen getroffen werden. Bei EST-Markern (*expressed sequence tags*) handelt es sich dagegen um für bestimmte Proteine codierende Genomabschnitte. Das heißt, ähnlich wie bei der Isoenzymanalyse, werden Proteinstrukturen untersucht. Voraussetzung hierzu ist, dass die Sequenz des Proteins aufgeschlüsselt ist und dementsprechend flankierende Primer synthetisiert sind. Je nach untersuchtem Protein ist davon auszugehen, dass die entsprechenden EST-Marker mit phänotypischen Merkmalen assoziiert sind bzw. die Funktionalität der DNA-Sequenz entschlüsselt werden kann.

Bisher wurden bereits einige Untersuchungen zu kerncodierten, codominant vererbten EST-Markern mit Koniferen durchgeführt (PERRY & BOUSQUET 1998a, 1998b, CATO et al. 2001, TEMESGEN et al. 2001). Darüber hinaus wurden im Jahr 2001 im Fachgebiet Forstgenetik der Technischen Universität München auf der Basis einer cDNA-Bibliothek der Fichte (NAGEISKY 1999) EST-Marker entwickelt und für die Anwendung routinemäßiger Analysen entsprechende Primer synthetisiert (RIEGEL 2001, SCHUBERT et al. 2001). Dieser neue molekulargenetische Markertyp zeigt nach Angaben der Autoren in Fichtenpopulationen eine etwas stärker ausgeprägte Variation als Isoenzym-Genmarker. Wegen der gleichmäßigeren Verteilung der genetischen Typen in Populationen sind deutlich höhere Werte für die genetische Diversität und die beobachtete Heterozygotie nachweisbar. In Pilotstudien mit Fichtenpopulationen unter spezifischem Freilandstress (Stickoxide, Streusalz) konnte gezeigt werden, dass die neu entwickelten EST-Marker auch zum Nachweis der genetischen Konsequenzen von stressbezogenen Selektionsereignissen verwendet werden können.

Die methodische Vorgehensweise zur Anwendung der EST ist weitestgehend mit der Methodik der RAPD und ISSR identisch. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt über die Gelelektrophorese

bzw. auch kapillarelektrophoretisch. Der Polymorphiegrad der erhaltenen Muster kann als genetischer Marker verwendet werden.

3 Untersuchungsgebiete und Beschreibung der Untersuchungsflächen

Wie bereits aus Kap. 2.2 hervorgegangen ist, stellen die Standortfaktoren eine maßgebliche Ursache für die morphologische und somit auch für die genetische Variabilität der Fichte dar. Diesem Aspekt wurde mit der Auswahl von Untersuchungsgebieten Rechnung getragen, da die untersuchten Populationen sowohl die gesamte Nord-Süd-Ausdehnung Deutschlands als auch die wesentlichen Höhenstufen (planar, kollin, montan, subalpin) berücksichtigen (vgl. Tab. 6 und Abb. 10). Bei der Auswahl von Untersuchungsgebieten wurden dementsprechend sowohl Bestände innerhalb als auch außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte mit einbezogen (vgl. Kap. 2.1). Die Auswahl der Gebiete erfolgte in Anlehnung an die Probenahmegebiete der Umweltprobenbank des Bundes (UPB). Diese wurden so festgelegt, dass die Hauptökosystemtypen Deutschlands vertreten sind und damit in ihrer Gesamtheit für die Umweltsituation in Deutschland weitgehend repräsentativ sind (vgl. Tab. 7; LEWIS et al. 1989, PAULUS et al. 1990, KLEIN et al. 1994).

Tab. 6: Übersicht über ausgewählte Standortfaktoren in den Untersuchungsgebieten (nach PAULUS et al. 1997, BARTEL & QUACK 2000, BARTEL et al. 2002, 2003a)

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
R&H-Wert nach GK	4567,000 5269,000	4605,000 5427,000	4406,000 5743,000	2583,000 5518,000	3541,000 5736,000	2557,000 5454,000	3581,500 5997,500
Meereshöhe [m ü. NN]	990-1540	1160-1300	550-900	600-740	420-490	220	40
Jahresdurch-schnitts-temperatur [°C]	3,5	5,6	5,0-6,3	6,5	6,5	8,4	8,1
Jahresnieder-schlagsmittel [mm]	1980-2500	1319	950-1400	ca. 1000	1050	750	757
Dauer der Vegetations-periode [d]	100-160	ca. 130	ca. 140	bis 200	ca. 160	170	n.b.
Geologisches Substrat	Dachstein-kalk	Cordierit-gneis	Granit	Taunus-quarzit	Mittlerer Buntsand-stein	Mittlerer Buntsand-stein	weichsel-zeitliche Jungmoräne

Abb. 10: Karte der Verteilung der Untersuchungsgebiete in Deutschland

Tab. 7: Zuordnung der ausgewählten UPB-Probenahmeflächen bzw. der Untersuchungsgebiete zu den Hauptökosystemtypen

Hauptöko-systemtyp	Probenahmegebiet der UPB	Probenahmefläche der UPB	Bez. in vorliegender Untersuchung
Naturnahe Ökosysteme	BR/NP Berchtesgaden	WEG Wimbachtal, Gries oberhalb Schloss	Berchtesgaden (Be)
	BR/NP Bayerischer Wald	WEG Markungsgraben, Hochlagenplateau	Bayer. Wald (BW)
	NP Hochharz	Oberes Ilseeinzugsgebiet	Harz (Ha)
Forst-ökosysteme	Hunsrück	FA Morbach	Hunsrück (Hu)
	Solling	Sievershausen (FA Dassel, FA Winnefeld)	Solling (So)
Urbane Ökosysteme	Saarländischer Verdich-tungsraum	Warndt 1	Warndt (Wa)
Agrar-ökosysteme	Bornhöveder Seengebiet	WEG Belauer See, Westufer	Belau (BS)

Tab. 8: Geographische Entfernungen [km Luftlinie] zwischen den Untersuchungsgebieten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	159	495	495	516	483	756
Bayer. Wald		-	375	468	405	477	612
Harz			-	336	66	384	267
Hunsrück				-	285	60	537
Solling					-	342	270
Warndt						-	594
Belau							-

Entsprechend der Verbreitung der Fichte in Deutschland stellen die ausgewählten Untersuchungsflächen Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz Fichtenstandorte innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Art dar. Bei diesen ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Bestände aus natürlicher Verjüngung entstanden ist bzw. möglicherweise auch autochthonen Ursprungs ist. Es handelt sich somit um möglicherweise an die Standortbedingungen angepasstes Material, das aufgrund seiner Entwicklungsgeschichte einer gerichteten genetischen Drift unterliegen kann. In diesem Zusammenhang muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die untersuchten Bestände – je nach geschichtlicher Entwicklung – durch forstliche Eingriffe mit ortsfremdem Saat- und Pflanzgut ergänzt sein können und deshalb durchmischt sind.

Im Gegensatz dazu liegen die übrigen Untersuchungsflächen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte und sind mit Sicherheit künstlich, durch forstliche Maßnahmen, begründet. Dieses Material ist auf Saat- bzw. Pflanzgut zurückzuführen, das aus Samenbanken bzw. aus Samenklengen stammt und als Mischprobe einer forstlichen Herkunft (vgl. Kap. 2.1) angesehen werden muss. Je nach Alter dieser Bestände liegen dementsprechend nur wenige Informationen zu der Zusammensetzung des Materials vor.

Aufgrund dieser grundsätzlichen Unterschiedlichkeit der Herkunft des Pflanzenmaterials werden die Untersuchungsgebiete den beiden genannten Gruppen zugeordnet und getrennt voneinander einzeln vorgestellt. Eine zusammenfassende morphologisch-biometrische Beschreibung der beprobten Bäume findet sich in Anhang III.

3.1 Untersuchungsgebiete innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes

3.1.1 Nationalpark Berchtesgaden

Nach Angaben von HUSS (1998) weist die Fichte in Oberbayern einen Anteil an der Waldbodenfläche von rund 65% auf. Sie ist somit die häufigste Baumart in den Bayerischen Alpen und gilt in vielen Höhenlagen und unzugänglichen Alpentälern als autochthon. Wie bereits in Kap. 2.1 erwähnt, wurde aufgrund der außergewöhnlichen Wuchsform ein eigener **Ökotyp („Alpenfichte")** beschrieben (WILLKOMM 1887), der identische morphologische Merkmale wie die Kaltklimarassen in Sibirien aufweist und mitunter auch als *Picea abies var. europaea* bezeichnet wird (SCHMIDT-VOGT 1975). Dieser Ökotyp zeichnet sich insbesondere durch eine schmale Krone sowie kurze Triebe in Kombination mit Kurznadeligkeit aus. Nach Angaben von HOLZER (1967) überwiegt in einer Höhenlage von unter 1000 m ü. NN der Verzweigungstyp der Kammfichte, während in der Zone zwischen 1000 und 1700 m ü. NN die Bürstenfichte dominiert.

Die Ausbreitung der Fichte im Berchtesgadener Land kann bis etwa um 6000 v.Chr. zurückverfolgt werden. Demnach sind seit dieser Zeit in verschiedenen Höhenzonen unterschiedliche Standortrassen oder angepasste Ökotypen entstanden. Der steigende Holzbedarf führte seit dem 15. Jahrhundert zu einem raschen Rückgang der Bestände in Tallage. Darüber hinaus wurden zur Deckung des Holzbedarfs bei der Salzgewinnung (z.B. der Saline Berchtesgaden) selbst entlegene Hochlagenbestände – auch die des heutigen Nationalparkbereichs – häufig mit Kahlschlägen genutzt. Die notwendig gewordenen und 1784 begonnenen Bestockungsmaßnahmen wurden insbesondere zwischen 1840 und 1875 mit ortsfremdem Saat- und Pflanzgut aus tieferen Lagen durchgeführt (vgl. VON BÜLOW 1962, RUETZ & BERGMANN 1989). Aus diesem Grund ist größtenteils nur bei Beständen von über 160 Jahren von autochthonen Fichten mit „natürlichem" Jungwuchs auszugehen. Bei Beständen jünger als 120 Jahre handelt es sich höchstwahrscheinlich um vermischtes Material. Genauere Angaben können nicht gemacht werden, da nicht exakt rekonstruierbar ist, an welchen Standorten Saatgut ausgebracht wurde (K. FREYER, mündl. Mitteilung). In diesem Zusammenhang ging allerdings bereits SCHMIDT-VOGT (1975) davon aus, dass es mit geeigneten Methoden feststellbar wäre, „wo im Alpenpark fremde, nicht bodenständige Fichten eingebracht wurden." RUETZ & BERGMANN (1989) bezweifeln in diesem Zusammenhang, dass am phänotypischen Erscheinungsbild heutiger Bestände feststellbar sei, welche Bestände in den Hochlagen mit Saat- und Pflanzgut aus tieferen Lagen begründet worden sind und wie hoch der Anteil nicht autochthoner Individuen ist. Sie konnten allerdings isoenzymatisch anhand des SAP-B Locus einen sogenannten Hochlagen-Genotyp von Tieflandsherkünften differenzieren (vgl. auch BERGMANN 1982).

Im Nationalpark Berchtesgaden wurden innerhalb des Wimbachtales – westlich der Watzmann-Gruppe – auf insgesamt sechs Flächen (90-1540 m ü. NN) 30 Fichten beprobt (vgl. Abb. 11). Es handelt sich hierbei um Bäume im Alter von 130 bis 300 Jahren, die in mehr oder weniger dichtem

Bestand stehen. Die nördlicheren – und somit in Tallage befindlichen Flächen – sind mit Sicherheit auf gepflanztes Material zurückführbar und entstammen nach Angaben der Bayerischen Staatsforstverwaltung (K. FREYER, mündl. Mitteilung) wahrscheinlich der Samenklenge Lauffen. Im südlichen Bereich des Wimbachtales (>1300 m ü. NN) handelt es sich nach Aussage der Forstverwaltung und des Nationalparkamtes wahrscheinlich um autochthone Bestände (K. FREYER & V. KONNERT, mündl. Mitteilung).

Abb. 11: **Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Nationalpark Berchtesgaden (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)**

3.1.2 Nationalpark Bayerischer Wald

Mit einem Fichten-Anteil von 52% in Niederbayern und in der Oberpfalz ist der Bayerische Wald eines der fichtenreichsten Waldgebiete Deutschlands (HUSS 1998). Die morphologische Variabilität der nahezu alle Höhenzüge bedeckenden Fichtenbestände wurde von PRIEHÄUSSER (1956, 1958, 1959) umfassend untersucht. Aufgrund des Klimas handelt es sich hier um besonders langsam wüchsige Formen, die nach Angaben von SCHMIDT-VOGT (1976) aus dem jugoslawischen Refugium entstammen. RUOFF (1932) vermutet, dass sie im Boreal über den Ostalpenrand und die Donau aus dem zentralen Waldviertel und dem nördlichen Mühlenviertel in den Bayerischen Wald eingewandert sind. Diese von WILLKOMM (1887) als „**Urwaldfichte des Bayerischen Waldes**“ beschriebene Form entspricht im Wesentlichen den heute als Plattenfichten beschriebenen Formen und wurde früher der Variation *fennica* zugeordnet. Nach Angaben von KLOTZ (1959) dominieren diese Formen heute

lediglich in den klimatisch extremen Hochlagen (vgl. auch PRIEHÄUSSER 1958, FRÖHLICH 1959, 1969, SCHMIDT-VOGT 1972a).

Wenn auch die Hochlagen des Bayerischen Waldes mit autochthonen Fichten bestockt sind, so kann auf der Untersuchungsfläche auf dem Hochlagenplateau des Markungsgrabens nicht sicher von Autochthonie ausgegangen werden. Nach Angaben der Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald (H. RALL, mündl. Mitteilung) handelt es sich bei den beprobten Beständen um bis zu 200 Jahre alte Fichten, die einer Aussaat aus vermutlich badischem Saatgut entstammen könnten. Verheerende Windwürfe Mitte des 19. Jahrhunderts machten eine schnelle Ansaat der Hochlagen notwendig, weswegen ortsfremdes Material eingesetzt wurde. Aufgrund der Unsicherheit über den exakten Ansaatbereich kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den ausgewählten Individuen teilweise um naturverjüngte Bäume autochthonen Ursprungs handelt.

In Bereich des Wassereinzugsgebietes des Markungsgrabens wurden an der Hangkante und auf dem Hochlagenplateau 30 Fichten beprobt (ca. 1160-1300 m ü. NN) (vgl. Abb. 12). Bei den beprobten Bäumen handelt es sich um Individuen, die die Borkenkäferkalamitäten Mitte der 1990er Jahre überlebten und sich inmitten des noch stehenden Totholzes befinden. Wenn auch nach Angaben von KLOTZ (1959) vornehmlich Plattenfichten typisch sein sollen, so wurden die Verzweigungstypen von Kamm-, Bürsten- und Plattenfichten zu etwa gleichen Anteilen beprobt.

Abb. 12: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Nationalpark Bayerischer Wald (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)

3.1.3 Nationalpark Hochharz

Die Fichte ist auch im Nationalpark Hochharz die bestandsprägende Baumart und erreicht im Ostharz einen Anteil von 58% (HUSS 1998). Vergleichbar mit den Angaben zum Bayerischen Wald handelt es sich auch hier überwiegend um verhältnismäßig schwachwüchsige Plattenfichten (MEYER 1959, SCHMIDT-VOGT 1976). Der Weg ihrer Rückwanderung in den Harz seit der letzten Eiszeit ist noch weitgehend ungeklärt, da pollenanalytisch keine Verbindungsstandorte nachgewiesen werden konnten (FIRBAS 1949, HUNTLEY & BIRKS 1983). Es wird angenommen, dass sie im älteren Teil der Mittleren Wärmezeit, ungefähr 4000 v. Chr., den Weg über den Bayerischen Wald und das Fichtelgebirge in den Harz gefunden hat. Heute sind die Bestände in weiten Teilen durch die seit dem Jahr 1610 dokumentierten Fichtensaaten überprägt. Diese wurden zur Ergänzung der Naturverjüngung, insbesondere in Folge der schweren Sturm- und Borkenkäferkatastrophen des 17. und 18. Jahrhunderts, angelegt; allein zwischen 1791 und 1801 wurden 27.500 ha bepflanzt (KÖHLER 1952, BORCHERS 1959).

Im Nationalpark Hochharz wurden entlang des Laufes der Ilse, unmittelbar östlich des Brockens, insgesamt 30 Fichten beprobt, die aus verschiedenen Höhenstufen stammen. Es handelt sich hierbei um Proben aus montanen bis hochmontanen Lagen (550 m bis 900 m ü. NN), die den Fichten-Herkunftsgebieten 840 08 und 840 09 zuzuordnen sind. Nach Angaben von HUSS (1998) sind die Standorte im Harz aufgrund des geomorphologischen Aufbaus des Gebirges sehr differenziert. Die Jahresniederschläge nehmen von den stark ozeanisch getönten Kammlagen des Brockens mit 1500 mm auf 500 mm am bereits kontinental getönten Ostharzrand ab.

Abb. 13: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Nationalpark Hochharz sowie der zusätzlich ausgewählten Fläche mit vermutlich autochthonen Fichten (gelb) (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)

Zusätzlich zu den in Abb. 13 dargestellten Beständen, die auf den Flächen der Routine-Probenahmen der Umweltprobenbank des Bundes beprobt werden, wurde für weiterführende molekulargenetische Analysen ein weiterer Bestand (n=12) ausgewählt. Nach Angaben der Nationalparkverwaltung Hochharz (A. ROMMERSKIRCHEN, mündl. Mitteilung) handelt es sich bei den 250-400 Jahre alten Individuen aus dem Quellbereich der Ilse um autochthone Fichten. Entsprechend den Erläuterungen von BORCHERS (1967) ist diese „autochthone Harzfichte“ anhand des Verzweigungstyps und der Drüsenbehaarung von den anthropogen eingebrachten Pflanzen unterscheidbar.

3.2 Untersuchungsgebiete außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes

Bei den übrigen Untersuchungsgebieten handelt es sich um Flächen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte und somit um auf forstliche Aktivität begründete Bestände ohne natürliche Verjüngung. Da der forstliche Eingriff wesentliche Bedeutung für die Ausbildung des Genpools hat, werden diese Gebiete getrennt von den übrigen dargestellt. SAUER et al. (1973) gehen in diesem Zusammenhang davon aus, dass die forstliche Stecklingsvermehrung zu einer verstärkten Begründung von in ihrem Genpool eingeschränkten Beständen führt (vgl. auch HOLZER et al. 1991). Im Gegensatz dazu ist aber auch von einer höheren Diversität dieser Bestände auszugehen, da das diesen Untersuchungsgebieten zugrunde liegende Samen- bzw. Pflanzmaterial in einer staatlichen **Samenklenge** vermischt wurde. Dabei handelt es sich um Anlagen zur Gewinnung der in Nadelholz- und Erlenzapfen liegenden Samen durch vorsichtige Erwärmung. In der Samenklenge werden die Baumsamen, nachdem sie aus dem Zapfen herausgelöst wurden, entsprechend ihrer Herkunft gemischt und für die weitere Behandlung bzw. erneute Ausbringung gelagert. Die Lagerfähigkeit forstlichen Saatgutes von *Picea abies* wird zur Zeit mit über 30 Jahren (bei weniger als -5°C und weniger als 5% Wassergehalt) angegeben (Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Erhaltung forstlicher Genressourcen“ 1987, 2000).

Auch wenn mit dem FSaatG (26.07.1979) sowie dem FoVG (22.05.2002) und der Forstsaat-Herkunftsgebietsverordnung (07.10.1994) mittlerweile gesetzgeberische Vorgaben bestehen, so ist in den meisten Fällen die exakte Herkunft der heute anzutreffenden Bestände unbekannt.

3.2.1 Saarländischer Verdichtungsraum (Warndt)

Für die nacheiszeitliche Rückwanderung der Fichte in den rheinland-pfälzischen und saarländischen Raum wird häufig die Schiene über die Westalpen und den Schwarzwald bzw. die Vogesen angegeben. Während im Schwarzwald relikthaft vermutlich autochthone Bestände zu verzeichnen

sind (KONNERT 1991a, 1991b, KONNERT & FRANKE 1991), kann in den Vogesen nicht von natürlichen Beständen ausgegangen werden (SCHMIDT-VOGT 1977). Dementsprechend ist für Südwestdeutschland zwar anzunehmen, dass die Fichte bis in den Hunsrück rückgewandert ist, heute aber im gesamten Bereich lediglich künstliche Bestände anzutreffen sind.

Nach Angaben von HUSS (1998) hat die Fichte erst seit dem 19. Jahrhundert aufgrund ihrer wirtschaftlichen Nutzung nennenswerte Bedeutung für den saarländischen Wald. Ihr Anteil an der Waldfläche wird heute auf ca. 16% geschätzt, wobei sie sehr unter den Stürmen Anfang der 1990er Jahre gelitten hat (Waldanteil 1990: 24%) (PAULUS et al. 1997). Im Untersuchungsgebiet des Warndt stellt sie heute die dominierende Nadelbaumart dar, wenngleich ihr Anbau noch Mitte der 1970er aufgrund zum Teil heftiger Rauchschäden durch die nahe gelegenen Industriegebiete des Saarländischen Verdichtungsraumes als „nicht empfehlenswert“ dargestellt wurde (vgl. SCHMIDT-VOGT 1977).

Die 30 im saarländischen Verdichtungsraum beprobten Fichten entstammen einer Fläche westlich der Ortschaft Ludweiler (Saarforst, Regionalbetrieb Süd, 220 m ü. NN). Es handelt sich ausnahmslos um forstlich eingebrachte Fichten mit mittleren Verzweigungstypen (Bürstentyp) und einem durchschnittlichen Alter von etwa 70-100 Jahren.

Abb. 14: Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Warndt (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)

3.2.2 Hunsrück

Der Hunsrück gilt mit ca. 53% Flächenanteil der Fichte als eines der größten zusammenhängenden Fichtengebiete in Südwestdeutschland. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist von einer eiszeitlichen Rückwanderung der Fichte über die Westalpen und den Schwarzwald bzw. die Vogesen bis in den Hunsrück auszugehen, wenngleich heute keine autochthonen Bestände mehr angetroffen werden können. Die heutige Dominanz der Fichte ist auf Nadelholz-fördernde Aufforstungsmaßnahmen gegen Ende des 18. Jahrhunderts zurückzuführen (BAUER 1962, 1966, 1969, KONNERT & FRANKE 1990, KLEINSCHMIT 1995).

Im Hunsrück wurden innerhalb des Forstamtes Morbach – ca. 30 km östlich von Trier – auf insgesamt fünf Flächen (600-740 m ü. NN) 30 Fichten beprobt (vgl. Abb. 15). Es handelt sich hierbei um Bäume im Alter von 100 bis 150 Jahren, die in geschlossenem Bestand stehen.

Abb. 15: Karte der Untersuchungsflächen (rot) im Hunsrück (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)

3.2.3 Naturpark Solling-Vogler

Der Wuchsbezirk Hochsolling gilt mit vergleichsweise hohen Niederschlägen und niedrigen Temperaturen als klassisches Fichtengebiet, wobei die heute anzutreffenden Bestände vollständig auf forstliche Maßnahmen zurückzuführen sind. Etwa 40% der Waldfläche des Solling sind mit Fichten bestockt (Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 1996). Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die Fichte bei ihrer nacheiszeitlichen Rückwanderung den Solling

überhaupt nochmals erreichen konnte. Es ist allerdings davon auszugehen, dass, wenn sie auf natürliche Weise den Solling wiederbesiedelt haben sollte, eine Einwanderung nur über den Bayerischen Wald und das Fichtelgebirge stattgefunden haben kann (SCHMIDT-VOGT 1977).

Im Naturpark Solling-Vogler – etwa 40 km nordwestlich von Göttingen – wurden 30 Fichten des Bürstentyps von insgesamt sechs Probenahmeflächen beprobt, die sich ökologisch nur sehr wenig voneinander unterscheiden. Die Probenahmeflächen liegen zwischen den Ortschaften Silberborn und Sievershausen, haben eine maximale Entfernung von 10 km und sind den Forstämtern Dassel und Winnefeld zugeordnet. Bei den beprobten Beständen handelt es sich um stark durchforstete Parzellen mit Altersklassen zwischen 60 und 120 Jahren, die alle dem Wuchsbezirk Hochsolling (>400 m ü. NN) zuzuordnen sind.

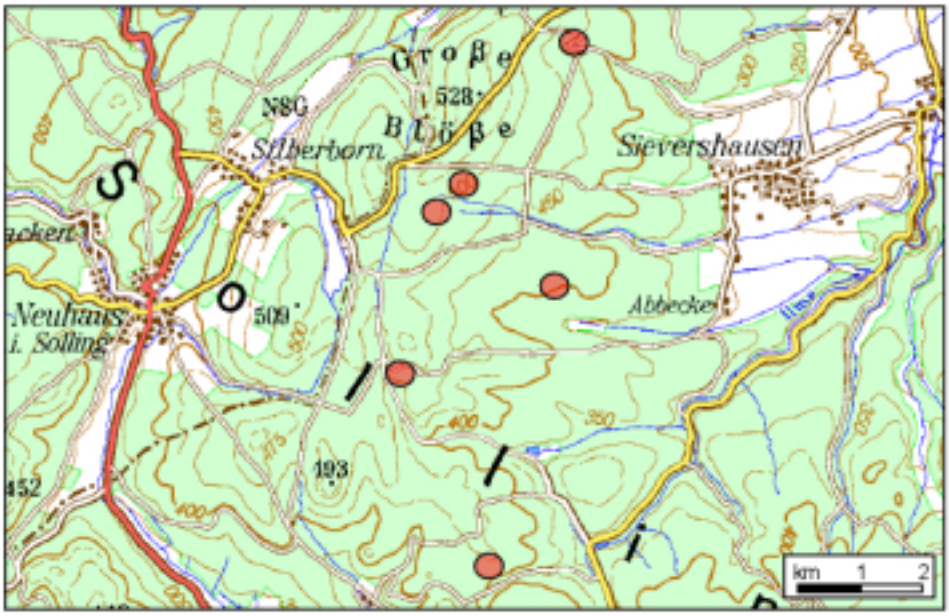


Abb. 16: Karte der Untersuchungsflächen (rot) im Naturpark Solling-Vogler (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)

3.2.4 Bornhöveder Seengebiet (Belauer See)

Das Untersuchungsgebiet westlich des Belauer Sees – ca. 30 km südlich von Kiel – ist am weitesten von dem natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte entfernt. Mit Ausnahme eines relikthaften, inselartigen Vorkommens in der Lüneburger Heide, ist die Fichte im gesamten norddeutschen Tiefland nicht natürlich vertreten (SCHMIDT-VOGT 1977). Dementsprechend weist Schleswig-Holstein mit seinen sandigen Böden nur verschwindend geringe Fichtenanteile auf (HUSS 1998). PAULUS et al. (1997)

geben in diesem Zusammenhang für Nadelwald 4,6% Flächenanteil an den Flächennutzungstypen im Wassereinzugsgebiet des Belauer Sees an.

Die 30 Proben des Bornhöveder Seengebiets entstammen einem privaten, etwa 600 m² großen Fichtenreinbestand unmittelbar westlich des Sees (40 m ü. NN). Es handelt sich hierbei um Fichten des Bürsten- bis Plattentyps, die in den 1940er Jahren in etwa 5 m Abstand aufgeforstet wurden.

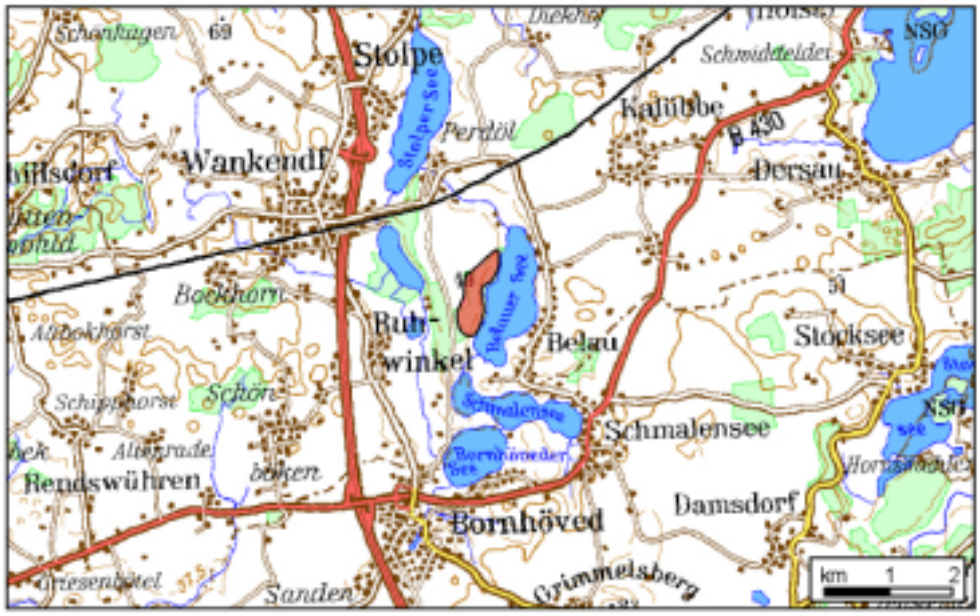


Abb. 17: **Karte des Untersuchungsgebietes (rot) im Bornhöveder Seengebiet (Kartengrundlage: TOP50 1:200.000)**

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Probenmaterial

Die Probenahmen erfolgten im Zeitraum von September 1998 bis August 1999. Die technische Vorgehensweise orientierte sich an der Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Fichte (*Picea abies*) und Kiefer (*Pinus sylvestris*) nach WAGNER et al. (1993). Danach wurden von mehreren Astwirteln des oberen Kronenraumes eine repräsentative Menge einjähriger Triebe geschnitten, gemischt und separat für die biometrische Charakterisierung und die molekulargenetische Analyse verpackt. Um die Beprobung von Familienverbänden ausschließen zu können, handelt es sich bei den ausgewählten Bäumen ausnahmslos um Bäume der sozialen Stellung vorherrschend, mitherrschend oder herrschend (Kraft'sche Klassen 0-2, KRAFT 1884). Jüngere, unterständige Bäume wurden nicht beprobt. Für die molekulargenetische Analyse dienten lediglich die Nadeln als Probenmaterial. Dazu wurden die Triebe innerhalb 24 Stunden nach der Probenahme entnadelt und die Nadelproben bei -20°C eingefroren. Insgesamt wurden zu den genannten Probenahmeterminen 210 Fichten beprobt (vgl. Tab. 9). Eine biometrische Übersicht über das Probenmaterial ist im Anhang III aufgeführt.

Tab. 9: Übersicht über die Untersuchungsflächen, Probenahmetermine und verwendeten Stichprobengrößen

Bezeichnung (Abk.)	Beschreibung	Probenahmetermin	n
Berchtesgaden (Be)	Nationalpark Berchtesgaden - Wimbachtal	22.-24.09.1998	30
Bayer. Wald (BW)	Nationalpark Bayerischer Wald - Markungsgraben	19.-20.09.1998	30
Harz (Ha)	Nationalpark Hochharz - Ilsetal	21.-22.04.1999	30
Hunsrück (Hu)	Hunsrück - FA Morbach	30.-31.08.1999	30
Solling (So)	Naturpark Solling-Vogler - FÄ Dassel und Winnefeld	19.-20.04.1999	30
Warndt (Wa)	Saarländischer Verdichtungsraum - FA Warndt	04.03.1999	30
Belau (BS)	Bornhöveder Seengebiet - Belauer See Westseite	25.03.1999	30

Neben den in Tab. 9 dargestellten Stichproben wurden im Nationalpark Hochharz (Entnahmestelle Ilsequelle) zusätzlich zwölf Individuen von vermutlich autochthoner Herkunft beprobt (Bezeichnung: Harz autochthon, Abk.: Hx; 20.04.1999). Diese wurden allerdings in der morphologischen Untersuchung (vgl. Kap. 5.1) nicht berücksichtigt.

4.1.2 Puffer und Lösungen

Für die molekulargenetischen Arbeiten mittels RAPD-, ISSR-, SSR- und EST-PCR wurden zahlreiche Puffer und Lösungen verwendet, deren Zusammensetzung in Anhang II aufgeschlüsselt ist.

Das allen Methoden zu eigene PCR-Verfahren wurde ausschließlich mit Bestandteilen des DyNAzyme^{TM} DNA Polymerase-Kits durchgeführt. Der praktikable Einsatz der DyNAzyme-*Thermus brockianus*-Polymerase ist durch mehrere Arbeiten an Fichten bereits belegt (vgl. FOURRÉ et al. 1997, GEBUREK et al. 1998). Die Zusammensetzung des Kits ist ebenfalls in Anhang II aufgeführt. Die verwendeten Primer sind in Abhängigkeit von der jeweiligen molekulargenetischen Methode in den entsprechenden Unterkapiteln definiert.

4.2 Methoden

4.2.1 Morphologische und biometrische Charakterisierung

Die morphologische bzw. biometrische Charakterisierung der Proben erfolgte aufbauend auf den Richtlinien zur Probenahme und Probenbearbeitung Fichte/Kiefer der Umweltprobenbank des Bundes (WAGNER et al. 1993) bzw. auf deren Fortschreibung durch BARTEL et al. (2003b).

Nach Ermittlung der sozialen Stellung und der Baumhöhe [m] der ausgewählten Bäume wurden mehrere Äste aus dem oberen Kronenbereich geschnitten, eine Schadansprache durchgeführt und der Benadelungsgrad [Summen-%] nach Jahrgängen getrennt ermittelt. An 25 zufällig ausgewählten einjährigen Trieben wurden nach Trocknung (48 h bei 80°C) das Trockengewicht von Nadeln [g] und Sprossachsen [g] sowie die Trieblänge [mm] ermittelt und über Auszählung von 3x100 Nadeln das Tausendnadelgewicht (TNG) berechnet. Aus den erhobenen Daten wurden zur weiteren Charakterisierung durch Division zusätzlich folgende biometrische Parameter abgeleitet: Stammumfang-Baumhöhen-Relation, Nadel-Sprossachsen-Relation, TNG-Trieblänge-Relation, Trieblänge-Triebgewicht-Relation.

Die ermittelten Parameter wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) statistisch differenziert. Mit der Varianzanalyse wird die Hypothese überprüft, dass mehrere Mittelwerte gleich sind. Dieses Verfahren ist eine Erweiterung des T-Tests bei zwei Stichproben. Mit Post-Hoc-Spannweitentests wurden homogene Untergruppen von Mittelwerten ermittelt, die nicht voneinander abweichen. Dabei wurde bei Varianzgleichheit ($p<0,001$) der Mehrfachvergleich nach Duncan angewendet, während bei fehlender Varianzgleichheit der Dunnett-T3-Test verwendet wurde. Die Ergebnisse werden in einer Matrix angezeigt, in der Gruppenmittelwerte, die auf einem Alpha-Niveau von 0,05 signifikant voneinander abweichen, durch Sterne markiert sind. Die Berechnungen erfolgten mittels SPSS 11.0 (SPSS Inc.).

4.2.2 DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung wurden unterschiedliche Verfahren angewendet, die auf der Extraktionsmethode von MURRAY & THOMPSON (1980) bzw. DOYLE (1991) und MILLIGAN (1992) beruhen (vgl. auch BOUSQUET et al. 1990, DOYLE et al. 1990, ISABEL et al. 1993, VAN DE VEN & MCNICHOL 1995). Die besten Ergebnisse wurden mit dem DNeasy-Plant-Mini-Kit der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) erzielt, dem 1 mg/ml RNase A (QIAGEN, Hilden) zugesetzt wurden.

Die Vorgehensweise gestaltete sich wie folgt: Etwa 80 mg des bei -20°C gelagerten Probenmaterials wurde unter flüssigem Stickstoff zermörsert, in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen und mit 400 µl Lysis-Puffer (AP1) und 4 µl RNase-Lösung versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 65°C wurde das Gemisch mit 130 µl mit Puffer (AP2) versetzt und 5 min auf Eis gelagert. Das Lysat wurde auf die QIA-Shredder-Säule übertragen und für 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Die erhaltene Lösung wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, mit 0,5 Volumen Puffer (AP3) und 1 Volumen $Ethanol_{abs.}$ versetzt und gemischt. 650 ml des Gemisches wurde auf die DNeasy-Säule übertragen und bei 8000 U/min 1 min zentrifugiert und mit dem eventuell verbleibenden Probenrest wiederholt. Nach Reinigung der Säule mit 2x 500 µl Puffer (AW) bei jeweils 2 min bei 14000 U/min wurde die DNA mit 2x 100 µl Elutionspuffer (AE) in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eluiert.

Die Reinheits- und Konzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss an die Isolierung photometrisch und in manchen Fällen elektrophoretisch (vgl. QUACK 1998). Die erhaltene Lösung wurde bei -20°C gelagert.

4.2.3 RAPD-Analyse

Trotz der Tatsache, dass in den letzten Jahren bereits Arbeiten zur Anwendung von RAPDs mit der Gattung *Picea* veröffentlicht wurden, existiert keine einheitliche Vorgehensweise (vgl. INNIS & GELFAND 1990, WELSH & MCCLELLAND 1990, WILLIAMS et al. 1990, MICHELI et al. 1993). Die dieser Arbeit zugrundeliegende Methodik orientiert sich an den bisher veröffentlichten Vorgehensweisen (ISABEL et al. 1993, BUCCI & MENOZZI 1995, SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b, VAN DE VEN & MCNICHOL 1995, HEINZE et al. 1996, SKOV 1998a, COLLIGNON & FAVRE 2000) und stellt einen weiteren Beitrag zur Optimierung der RAPD für Fichten dar (vgl. auch ROY et al. 1992).

Jedes **Reaktionsgemisch** wurde aus 2,5 µl 10xReaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 2,5 µl 10 µM Primer, 2 µl Template-DNA (ca. 20-50 ng), 0,25 µl PrimeZyme™ DNA Polymerase (2 U/µl) zusammengesetzt und mit sterilem $H_20_{deion.}$ auf 25 µl aufgefüllt. Der Thermocycler (T-Gradient-Thermocycler, BIOMETRA, Göttingen) wurde 2 min bei 40°C aufgeheizt, die Proben eingesetzt und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt: 90 sec bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der Template-DNA, 45 Zyklen mit 30 sec bei 94°C zur Denaturierung, 60 sec bei 38-42°C für das Annealing, 120 sec bei 72°C zur Synthese. Der letzte Syntheseschritt wurde 10 min gehalten.

Die Auswahl eines geeigneten **RAPD-Primers** hat, wenn keine vergleichbaren Arbeiten zur untersuchten Art vorliegen, empirischen Charakter. Es liegt bisher kein Regelwerk, das die sinnvolle Nutzung eines bestimmten Primers garantiert, vor. Zur Beantwortung der eingangs gestellten Fragen muss ein geeigneter Primer sowohl in der Lage sein, Unterschiede zwischen den ausgewählten Beständen als auch zwischen den Individuen selbst darzustellen. Die Auswahl geeigneter Primer erfolgte deshalb zum einen nach eigenen Vorarbeiten und zum anderen nach Vorgaben der Nuclein Acids Protein Service Unit (NAPS, www.biotech.ubc.ca/naps/napprimc.htm) der University of British Columbia, des Istituto di Miglioramento Genetico delle Piante Forestali (IMGPF, www.dsa.unipr.it/~bucci/singletreemap/primers/primers.html) sowie nach BINELLI & BUCCI (1994), SCHEEPERS et al. (1997b) und SKOV & WELLENDORF (1998).

Im Rahmen der eigenen Arbeiten wurden anhand von fünf Proben Tests zur Ermittlung informativer Amplifikationsmuster durchgeführt. Dafür wurden die häufig verwendeten Random Primer Kits A, B, C und D (ROTH, Karlsruhe; baugleich mit OPERON, Basensequenzen vgl. Anhang IV) mit je 20 Primern pro Kit getestet (vgl. HEINZE et al. 1996). Die im Elektrophoresegel ermittelten Bandenmuster wurden fünf verschiedenen Kategorien zugeordnet und dementsprechend hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung von Individuen und Populationen bewertet (vgl. auch BINELLI & BUCCI 1994, BUCCI et al. 1997a):

- **+** gut auswertbares Muster mit distinkten Banden, sowohl monomorphe Banden als auch polymorphe Banden vorhanden ⇨ geeignet
- **§** schlecht reproduzierbares Muster mit meist nicht-distinkten Banden ⇨ ungeeignet
- **#** Bandenmuster verwischt, Laufstrecke durch mehr oder weniger gleichmäßige Anfärbung charakterisiert ⇨ ungeeignet
- **$** annähernd vollständiges Fehlen polymorpher Banden verhindert den Einsatz des Primers als Marker in Variabilitätsuntersuchungen ⇨ ungeeignet
- **-** kein Amplifikationsmuster nachweisbar ⇨ ungeeignet

Durch die Verwendung mehrerer Primer erhöht sich die Zahl polymorpher Marker und die Sicherheit einer richtigen Aussage wird gesteigert (BURKE et al. 1991, HADRYS et al. 1991, BOWDITCH et al. 1993, LYNCH & MILLIGAN 1994, CHAN & SUN 1997). Aus diesem Grund wurde – wie oben bereits erwähnt – zusätzlich auf Empfehlungen der Nuclein Acids Protein Service Unit (NAPS, 100 RAPD-Primer) sowie des Istituto di Miglioramento Genetico delle Piante Forestali (IMGPF, 96 RAPD-Primer) zurückgegriffen. 53 der insgesamt 196 aufgelisteten RAPD-Primern wurden von beiden Arbeitsgruppen empfohlen.

Insgesamt wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren 206 RAPD-Primer getestet und bewertet. In Anhang IV sind die in den durchgeführten Tests ermittelten maximalen Bandenzahlen, die Anzahl polymorpher Banden und die qualitative Einstufung der Primer für ihre Anwendung bei *Picea abies*

aufgeführt. Nach Auswertung aller Tests wurden 28 der 206 Primer als geeignet (+) eingestuft, während mit 168 Primern schlechte Ergebnisse (#§$) erzielt wurden und mit 10 Primern überhaupt kein Amplifikationsmuster (-) nachgewiesen werden konnte. Entsprechend den Ergebnissen dieser Voruntersuchungen wurden für die populationsgenetische Analyse die in Tab. 10 aufgeführten Primer ausgewählt und verwendet.

Tab. 10: Eckdaten der verwendeten RAPD-Primer (vgl. auch Anhang IV)

Primer	Primersequenz (5'-3')	T_m [°C]	T_a [°C]	max. Bandenzahl	Auswertebereich [bp]	Quelle
A12	TCGGCGATAG	32	40	19	450-1760	IMGPF, SKOV & WELLENDORF 1998
B05	TGCGCCCTTC	34	42	13	650-1590	IMGPF, SKOV & WELLENDORF 1998
B09	TGGGGGACTC	34	42	14	540-1500	-
B13	TTCCCCCGCT	34	42	17	520-1400	NAPS, IMGPF, SKOV & WELL. 1998
B14	TCCGCTCTGG	34	42	19	360-1880	-
B16	TTTGCCCGGA	32	40	20	430-2040	IMGPF
D06	ACCTGAACGG	32	40	20	410-2040	-
D12	CACCGTATCC	32	40	15	480-1500	SCHEEPERS et al. 1997b
D17	TTTCCCACGG	32	40	10	550-1920	SCHEEPERS et al. 1997b
D19	CTGGGGACTT	32	40	20	460-1940	-
C203	CACGGCGAGT	34	42	16	500-1340	NAPS, IMGPF
C452	CTAATCACGG	30	38	15	400-1500	IMGPF
C479	CTCATACGCG	32	40	22	520-1980	NAPS, IMGPF
C628	GTCTGGTTAG	30	38	14	580-1580	IMGPF

Die Auftrennung der mit diesen Primern erzielten PCR-Produkte erfolgte über ein mit 1 µg/ml Ethidiumbromidlösung versetztes 1,4%iges Agarosegel (Agarose I, AMRESCO Inc. Solon, Ohio, USA) mit 4 V/cm in einem 1XTBE-Puffer. Die Laufzeit betrug je nach Primer zwischen 180 und 240 min. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte mittels einer KODAK Digital Science™ EDAS120-Digitalkamera auf einem UV-Transilluminator (312 nm) abgelichtet. Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde im Vergleich zu den bekannten Fragmentlängen des Längenstandards (peqgold 100 bp-DNA-Leiter Plus, PEQLAB, Erlangen) auf je 10 bp geschätzt. Unter identischen Bedingungen ermittelte Fragmente gleicher Größe wurden als homologe Marker betrachtet (vgl. RIESEBERG 1996, DE BUSTOS et al. 1998). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Fragmentmuster wurde die Analyse (PCR und Elektrophorese) aller Proben – inklusive einer jeweils mitgeführten DNA-freien (Null-)Probe – mindestens drei Mal wiederholt.

4.2.4 ISSR-Analyse

Die methodische Vorgehensweise orientiert sich an der oben beschriebenen Vorgehensweise des RAPD-Verfahrens und an WOLFE & LISTON (1998). Dazu wurde jedes **Reaktionsgemisch** aus 2,5 µl 10xReaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 2,5 µl 10 µM Primer, 2 µl Template-DNA (ca. 20-50 ng), 0,25 µl DyNAzyme™ DNA Polymerase (2 U/µl) zusammengesetzt und mit sterilem $H_20_{deion.}$ auf 25 µl aufgefüllt. Der Thermocycler (T-Gradient, BIOMETRA, Göttingen) wurde 2 min bei 40°C aufgeheizt, die Proben eingesetzt und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt: 90 sec bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der *template*-DNA, 35 Zyklen mit 30 sec bei 94°C zur Denaturierung, 45 sec bei 50-60°C für das Annealing, 90 sec bei 72°C zur Synthese. Der letzte Syntheseschritt wurde 20 min gehalten, bevor der Thermocycler-Block dauerhaft auf 4°C gekühlt wurde.

Die Auswahl der **ISSR-Primer** erfolgte aufgrund fehlender ISSR-Untersuchungen mit *Picea abies* auf der Basis der Empfehlungen von WOLFE et al. (1998) und WOLFE & LISTON (1998). Die Autoren empfehlen insbesondere die in Tab. 11 dargestellten Primer mit [CA]-*repeats*, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit in zahlreichen anderen pflanzlichen Organismen ebenfalls erfolgreich einsetzbar seien. Zusätzlich dazu wurden Primer gescreent, die in Analysen mit *Oryza sativa* und verschiedenen Insekten-Taxa als die polymorphsten beschrieben wurden und für die Anwendung auf andere Taxa ebenfalls empfohlen wurden (vgl. BLAIR et al. 1999, ABBOT 2001).

Tab. 11: Eckdaten der verwendeten ISSR-Primer; Abkürzungen für *mixed base positions*: R= (A,G); Y= (C,T)

Primer	Primersequenz (5'-3')	T_m [°C]	T_a [°C]	Motiv	UBC Primer #	Quelle
$(GA)_9T$	GAGAGAGAGAGAGAGAGAT	56	60	$(GA)_9T$	n.b.	BLAIR et al. 1999
$(AC)_8C$	ACACACACACACACACC	52	60	$(AC)_8C$	826	ABBOT 2001
$(AC)_8G$	ACACACACACACACACG	52	60	$(AC)_8G$	827	ABBOT 2001
$(CA)_6RY$	CACACACACACAAGCT	42	50	$(CA)_6(A,G)(C,T)$	17898	WOLFE et al. 1998
$(CA)_6RG$	CACACACACACAAGG	43	50	$(CA)_6(A,G)G$	17899	WOLFE et al. 1998
$(CA)_6(GT)$	CACACACACACAGT	42	50	$(CA)_6(GT)$	17898B	WOLFE et al. 1998
$(CA)_6(AC)$	CACACACACACAAC	42	50	$(CA)_6(AC)$	17898A	WOLFE et al. 1998

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein mit 1 µg/ml Ethidiumbromidlösung versetztes 2%iges Agarosegel (Agarose I, AMRESCO Inc. Solon, Ohio, USA) mit 4 V/cm in einem 1XTBE-Puffer. Die Laufzeit betrug je nach Primer zwischen 120 und 180 min. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte mittels einer KODAK Digital Science™ EDAS120-Digitalkamera auf einem UV-Transilluminator (312 nm) abgelichtet. Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde im Vergleich zu den bekannten Fragmentlängen des Längenstandards (peqgold 100 bp-DNA-Leiter Plus, PEQLAB, Erlangen) auf je 10 bp geschätzt. Unter identischen Bedingungen ermittelte Fragmente gleicher Größe wurden als homologe Marker betrachtet (vgl. RIESEBERG 1996). Zur Überprüfung der Reproduzier-

barkeit wurde jede Analyse (PCR und Elektrophorese) drei Mal wiederholt. Entsprechend den Angaben von WOLFE et al. (1998) wurden nur in beiden Läufen reproduzierbar amplifizierte DNA-Fragmente in die statistische Auswertung der Muster einbezogen.

4.2.5 SSR-Analyse

Von PFEIFFER et al. (1997) wurden in einer Studie zu italienischen *Picea abies*-Beständen SSR-Primer entwickelt, die von GEBUREK et al. (1998) bereits erfolgreich verwendet und in vorliegender Untersuchung auf ihre Eignung zur Differenzierung deutscher Bestände getestet wurden. Die methodische Vorgehensweise richtete sich im Wesentlichen nach der Vorgehensweise von PFEIFFER et al. (1997). Da zum Zeitpunkt der Analyse nicht absehbar war, ob die empfohlenen SSR-Primer erfolgreich für die Analyse eingesetzt werden können, wurde auf fluoreszenzmarkierte Primer verzichtet und statt dessen kostengünstigere, markierte dNTPs verwendet.

Jedes **Reaktionsgemisch** wurde aus 2,5 µl 10xReaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 2x1,25 µl 10 µM Primer, 2 µl Template-DNA, 0,25 µl DyNAzyme™ DNA Polymerase (2 U/µl) zusammengesetzt und mit sterilem $H_20_{deion.}$ auf 25 µl aufgefüllt. Für die kapillarelektrophoretische Auftrennung wurde das Reaktionsgemisch zusätzlich mit 0,25% fluoreszensmarkierten dNTPs ([R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP; je 100 pmol/µl; APPLIED BIOSYSTEMS, Warrington, UK) ergänzt. Die SSR-PCR erfolgte in einem T-Gradient-Thermocycler (BIOMETRA, Göttingen) nach folgenden Kriterien: 5 min bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der Template-DNA, 37 Zyklen mit 45 sec bei 94°C zur Denaturierung, 45 sec bei 53-60°C für das Annealing (vgl. Tab. 13), 45 sec bei 72°C zur Synthese. Der letzte Syntheseschritt wurde 10 min gehalten.

Die Auswahl der **SSR-Primer** erfolgte entsprechend den Angaben von PFEIFFER et al. (1997). Von den Autoren wurden mit Hilfe des PC-Programms PRIMER 0.5 (E. Lander, Whitehead Inst., Cambridge, USA) insgesamt 36 SSR-Primer hergestellt, die eine entweder durch [AG]- oder durch [AC-*repeats* charakterisierte Mikrosatellitenregion flankieren. Entsprechend den Ergebnissen der Tests zur Eignung der Primer bezüglich der Differenzierung italienischer *Picea abies*-Bestände wurde eine Kategorisierung vorgenommen, die in Tab. 12 dargestellt ist.

Für die vorliegende Untersuchung wurden die von PFEIFFER et al. (1997) der Kategorie 1 zugeordneten Primer ausgewählt. Es handelt sich hier ausnahmslos um Primer mit denen nur ein einziger (polymorpher) Locus nachgewiesen werden konnte. Diese Auswahl ermöglicht aufgrund der geringen Zahl an Markern eine vergleichsweise einfache Differenzierung von Individuen und Populationen (vgl. GEBUREK et al. 1998). Die für die Analyse verwendeten SSR-Primer sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tab. 12: Eignung der von PFEIFFER et al. (1997) entwickelten SSR-Primer zur Differenzierung von *Picea abies*-Beständen

Kategorie	Erläuterung	Anzahl Primer	zu erwartende Polymorphie	Bedeutung für die Differenzierung von Beständen
1	amplifiziert einen einzigen polymorphen Locus	7	gering	prinzipiell geringe Differenzierung zu erwarten, aber aufgrund einfacher Auswertung und hohem Informationsgehalt (Heterozygotiegrad) als geeignet einzustufen
2	amplifiziert zahlreiche Banden	13	hoch	prinzipiell geeignet aber aufgrund zahlreicher Banden schwierig auszuwerten, im Vergleich zu RAPD-PCR kein wesentlicher zusätzlicher Informationsgewinn
3	amplifiziert eine monomorphe Bande	9	keine	kein Nachweis einer Differenzierung von Individuen und Populationen möglich und deswegen nicht geeignet
4	schlechte Amplifikation	7	unbestimmt	nicht reproduzierbar und nicht fehlerfrei auszuwerten, nicht geeignet

Tab. 13: Eckdaten der verwendeten SSR-Primer (nach Pfeiffer et al. 1997)

Primer	Primersequenz (5'-3')	T_a [°C]	Motiv	erwartete Allelgröße [bp]	Allel-zahl	beobachtete Allelgröße [bp]
SpAG2	GCTCTTCACGTGTACTTGATC TTCGAAGATCCTCCAAGATAC	53	$(TC)_{16}$	105	10	96-114
SpAGC1	TTCACCTTAGCCGAGAACC CACTGGAGATCTTCGTTCTGA	57	$(TC)_5TT(TC)_{10}$	103	8	79-117
SpAGC2	TACCATTCAACGCAAGGG GTGTATGGTTTTCTTTTCGCA	57	$(TA)_{11}(GA)_{20}$	126	11	86-146
SpAGD1	GTCAACCAACTTGTAAAGCCA ACTTGTTTGGCATTTTCCC	57	$(AG)_{25}$	147	22	124-204
SpAGG3	CTCCAACATTCCCATGTAGC AGCATGTTGTCCCATATAGACC	57	$(GA)_{24}$	136	17	110-148
SpAC1F7	TTCCTCCACTGCATTCTAGC TGTTGGCCTTGCAAGTTATAG	57	$(AC)_{12}$	109	6	100-118
SpAC1H8	CCCAAGAAAAAAGTCATGGAT TCATTGGGATATGTGATACTTCC	60	$(GT)_{27}$	135	18	100-168

Im Anschluss an die SSR-PCR wurde jeweils 1 µl der PCR-Produkt-Lösung mit 12 µl Formamid und 0,25 µl GeneScan™-500 ROX™ Size Standard (jeweils APPLIED BIOSYSTEMS, Warrington, UK) versetzt, bei 95°C für 5 min im Thermoblock denaturiert und in einem ABI Prism 310-Analyzer (PERKIN ELMER, Foster City, USA) per Laserfluoreszenz analysiert. Die Kapillare (47 cm, 50 µm) wurde mit dem Polymer POP-4™ gefüllt, als Laufpuffer wurde 1x Genetic Analyzer-Puffer (APPLIED

BIOSYSTEMS, Warrington, UK) verwendet. Die verwendete Injektionszeit bei einer Spannung von 15 kV und 60°C betrug 4 Sekunden.

In einer parallel ermittelte Referenzprobe wurden die Amplifikationsprodukte in einem mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzten 2,5%igen Agarose-Gel (Agarose I, AMRESCO Inc, Solon, Ohio, USA) mit 4 V/cm in einem 1XTBE-Puffer für eine Stunde aufgetrennt und über einem UV-Transilluminator (312 nm) photographiert (KODAK Digital Science™ EDAS120).

4.2.6 EST-Analyse

Durch die Arbeiten von SCHUBERT et al. (1997, 2001) und RIEGEL (2001) wurden die Grundlagen für molekulargenetische Analysen an exprimierten DNA-Sequenzen, sogenannte *expressed sequence tags* (ESTs), von *Picea abies* gelegt. Ziel dieser Untersuchungen war die Entwicklung von Markern, die die molekulargenetische Analyse von Anpassungsprozessen in Freilandpopulationen dadurch ermöglichen, dass sie im selektionsunterworfenen Bereich der DNA ansetzen (vgl. RIEGEL 2001).

Die methodische Vorgehensweise in vorliegender Untersuchung orientiert sich deshalb hauptsächlich an den Angaben von SCHUBERT et al. (2001): Jedes **Reaktionsgemisch** wurde aus 2,5 µl 10xReaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 2,5 µl 10 µM Primer, 2 µl Template-DNA (50-150 ng), 0,25 µl DyNAzyme™ DNA Polymerase (2 U/µl) zusammengesetzt und mit sterilem $H_20_{deion.}$ auf 25 µl aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte in einem T-Gradient-Thermocycler (BIOMETRA, Göttingen) nach den in Tab. 14 aufgeführten Programmen. Abweichungen von der Vorgehensweise in der Originalarbeit bestanden lediglich darin, dass durch die Auftrennung der PCR-Produkte in einem mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel auf die Cy5-Fluoreszenzmarkierung der Primer verzichtet werden konnte.

Tab. 14: PCR-Programme für EST-PCR mit Picea abies (nach Schubert et al. 2001)

Programm	Primer	Temp.	Dauer	
RR2	PA0034, PA0066	94°C	4 min	
		94°C	60 sec	34 Zyklen
		50°C	60 sec	
		72°C	60 sec	
		72°C	5 min	
RR3	PA0043	94°C	4 min	
		94°C	60 sec	30 Zyklen
		55°C	60 sec	
		72°C	90 sec	
		72°C	10 min	

Hinsichtlich der **Primerauswahl** wurden die Untersuchungen von SCHUBERT et al. (2001) und RIEGEL (2001), die für 15 cDNA-Sequenzen (NAGEISKY 1999) klonspezifische Primerpaare entworfen haben, als Grundlage genommen. Spezieller Schwerpunkt bei der Entwicklung der 15 Primer lag auf hohen Schmelztemperaturen und Sequenzspezifität, sowie darauf, dass die Primer keine Sekundärstrukturen bilden. Um eine gute Analyse der genomischen PCR-Produkte zu ermöglichen, wurde die Größe der Amplifikationsprodukte durch Vorwärts- und Rückwärtsprimer auf 150-450 bp begrenzt (RIEGEL 2001).

Für die vorliegende Untersuchung erfolgte eine Vorauswahl aus diesen 15 empfohlenen klonspezifischen Primerpaaren. Grundlage dieser Vorauswahl war zum einen der Markertyp und zum anderen der Vererbungsmodus. In die Untersuchung einbezogen wurden lediglich ohne zusätzlichen Restriktionsverdau längenpolymorphe Genorte in Kombination mit codominantem Vererbungsmodus. Dies Kombination war nur bei drei der 15 EST-Primerpaaren gegeben. Die drei ausgewählten Markergenorte bzw. die Spezifizierung ihrer Primer sind in Tab. 15 und Tab. 16 dargestellt.

Tab. 15: Beschreibung der Fichten-cDNA-Sequenzen, die für die Entwicklung von EST-Markern herangezogen wurden (nach RIEGEL 2001)

cDNA-Klon	EMBL-Ident.	Länge [bp]	Länge [as]	Genfunktion anhand der vorhandenen AS-Sequenzhomologie mit Genen anderer Organismen
pPA0034	*AJ132532*	300	-	keine Homologie gefunden, beinhaltet eine unvollkommene Repeatsequenz $(CT)_6TT(CT)_5$
pPA0043	*AJ132533*	1658	432	86% Identität mit dem 78 KD glucoseregulierten Protein von *Nicotiana tabacum* (gehört zu HSP 70-Hitzeschockgenfamilie)
pPA0066	*AJ132537*	932	207	78% Identität mit dem 60 S ribosomalen Protein L13-2 (Kälte-induziertes Protein 24B) von *Brassica napus*

Tab. 16: Eckdaten der verwendeten EST-Primer (nach Riegel 2001)

Marker-genort	DNA-Sequenzen der Primer	erwartete Produkte [bp]	nachgewiesene Produkte [bp]
PA0034	5' AGG TCT GCT AAT GGT TCT G 3' 5' Cy5-GTG AAC CTC TAC AGA AAC ACA A 3'	228	212, 214, 226, 228, 230
PA0043	5' AAA ACT GGA GGA CCT TCT GG 3' 5' Cy5-TTA GAT GAT ATG CAA TGT AGA TTG A 3'	372	368, 372, 389, 420
PA0066	5' CAA GCG GTT GGT TGG AGT TCG GTT G 3' 5' Cy5-GCA GCA AAA ACT GCA CCT CTC TTC TG 3'	161	154, 161, 171, 178

Die Auftrennung der mit diesen Primern erzielten PCR-Produkte erfolgte demnach über ein mit 1 µg/ml Ethidiumbromidlösung versetztes 2,5%igen Agarosegel (Agarose I, AMRESCO Inc., Solon, Ohio, USA) mit 4 V/cm unter Verwendung eines 0,5x-TBE-Puffers. Die Laufzeit betrug mit den Primern PA0034 und PA0043 ca. 60 min und mit Primer PA0066 180 min. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte mittels des oben bereits erwähnten KODAK Digital Science™ EDAS120-

Systems auf einem UV-Transilluminator (312 nm) abgelichtet. Die Auswertung der Gele erfolgte mittels KODAK Digital Science™ Standard-Software. Unter identischen Bedingungen ermittelte Fragmente gleicher Größe wurden auch hier als homologe Marker betrachtet (vgl. RIESEBERG 1996, DE BUSTOS et al. 1998).

4.3 Statistische Auswertung

Trotz der mittlerweile mehrjährigen Anwendung PCR-gestützter Verfahren existiert zur Zeit weder ein einheitliches Verfahren zur Auswertung dominanter noch codominanter DNA-Marker (vgl. SILVA & RUSSO 2000). Während zu Beginn der Nutzung **dominanter Marker** statistische Verfahren vom *multilocus* DNA-Fingerprinting übertragen wurden (LYNCH 1988, 1990, 1991), wurden gegen Mitte der 1990er Jahre einige spezielle Verfahren entwickelt, die aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Bewertung nicht konsequent umgesetzt wurden (z.B. CLARK & LANIGAN 1993, LYNCH & MILLIGAN 1994, ZHIVOTOVSKY 1999). Da neben der statistischen Auswertung auch die Auswahl von Markern sehr unterschiedlich gehandhabt wird, ist in der Folge die dieser Untersuchung zugrunde liegende Markerauswahl detailliert beschrieben.

Die nach PCR und Elektrophorese erhaltenen Muster wurden unabhängig von der Signalstärke der Fragmente nach Festlegung eines reproduzierbaren Auswertebereiches, wie in Abb. 18 dargestellt, in eine 0/1-Matrix übertragen. Für die statistische Auswertung wurde jede potenzielle Bandenposition (Locus) als durch ein DNA-Fragment besetzt (1) oder unbesetzt (0) gewertet. Zusätzlich wurden die DNA-Fragmente innerhalb des Auswertebereichs gezählt und in polymorphe und monomorphe Banden unterschieden. Polymorphe Banden sind Fragmente, die nicht in allen untersuchten Individuen vorkommen, wohingegen monomorphe Banden in allen Individuen detektierbar sind. Der Anteil monomorpher Banden kann als Maß für die Einheitlichkeit der untersuchten Proben herangezogen werden. Es wurden alle nach diesem Schema detektierten DNA-Fragmente in die Berechnung einbezogen, ein Ausschluss monomorpher Fragmente erfolgte nicht.

Im Falle der dominanten RAPD-Marker muss jedes als „vorhanden“ bewertete Fragment als für diesen Locus dominant gewertet werden, während ein als „fehlend“ eingestuftes Fragment als rezessiv behandelt wird. Da durch dieses Verfahren homozygot dominante und heterozygote Genotypen diploider Organismen nicht unterschieden werden können, werden die Datensätze im Sinne haploider Daten ausgewertet. Der dadurch bedingte Informationsverlust kann durch eine höhere Markerzahl kompensiert werden (BURKE et al. 1991, HADRYS et al. 1991, BOWDITCH et al. 1993). Aus diesem Grund erfolgt die statistische Auswertung nicht separat für jeden verwendeten RAPD- bzw. ISSR-Primer, sondern durch Kombination der verwendeten Primer.

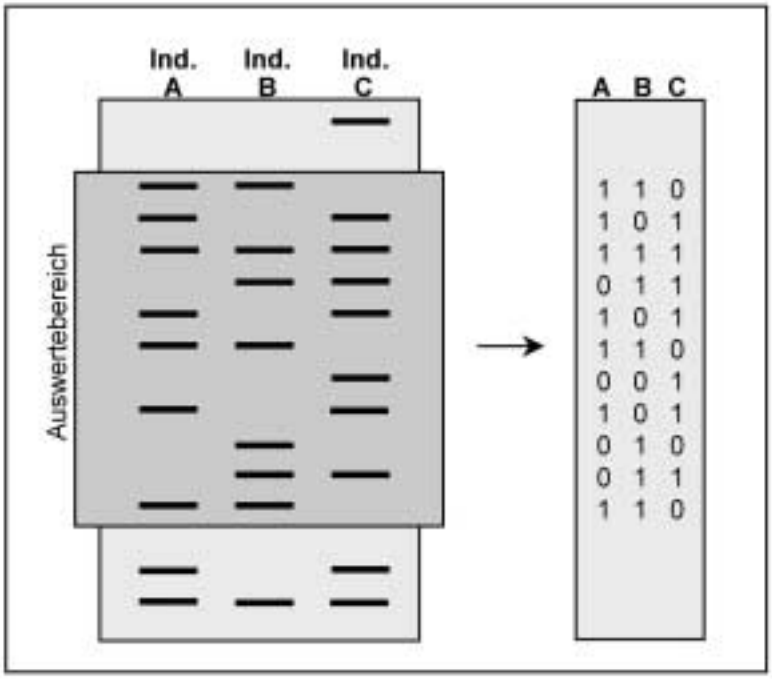


Abb. 18: Schematische Darstellung der Auswertung eines Elektrophoresegels durch Festlegung eines reproduzierbaren Auswertebereichs und Übertrag der Informationen in eine 0/1-Matrix

Die Vorgehensweise der Auswertung der **codominanten Markersysteme** entspricht im Wesentlichen der oben beschriebenen, wenngleich durch entsprechende Vorarbeiten (PFEIFFER et al. 1997, SCHUBERT et al. 2001) die Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente bekannt ist und der Auswertebereich dementsprechend definiert wurde. Für die Auswertung codominanter Marker existieren ebenfalls mehrere statistische Verfahren (vgl. GOLDSTEIN et al. 1995, BOROWSKY 2000, BALLOUX & LUGON-MOULIN 2002). Da der Schwerpunkt der SSR- und EST-Analyse in vorliegender Untersuchung aber auf dem zusätzlichen Informationsgewinn durch die Unterscheidung heterozogoter und homozygoter Individuen lag, erfolgten die Berechnungen ausschließlich mit Hilfe des Programmes POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999). Heterozygote Individuen wurden nur dann als solche angesprochen, wenn beide Fragmente in annähernd identischer Intensität zu erkennen waren.

4.3.1 Deskriptive Verfahren

4.3.1.1 Ähnlichkeitsmaß

Zur Berechnung der genetischen Identität bzw. Ähnlichkeit von Individuen und Populationen wurden zwei verschiedene Maße verwendet. Als Ähnlichkeitsmaß für die Analyse der binären (Roh)Daten wurde das Verfahren nach NEI & LI (1979), auch bekannt als Ähnlichkeitsmaß nach Dice, Czekanowski oder Sörensen bzw. als Band-Sharing-Rate (BSR), verwendet (vgl. VAN DE VEN & MCNICHOL 1995).

Die **Band-Sharing-Rate (BSR)** ist als Parameter für das Vorhandensein gemeinsamer DNA-Fragmente ein Maß für die Verwandtschaft von Individuen. Es handelt sich hier um einen speziell für binäre Daten anzuwendenden Index, in welchem gemeinsam fehlende Größen aus der Betrachtung ausgeschlossen werden, während Übereinstimmungen doppelt gewichtet werden (vgl. LAMBOY 1994a). Sie lässt sich nach LYNCH (1991) wie folgt berechnen:

$$BSR = \frac{2 \cdot n_{xy}}{n_x + n_y}$$

mit n_{xy} als der Anzahl gemeinsamer Banden der Individuen *x* und *y* sowie n_x bzw. n_y als der Anzahl der Banden bei Individuum *x* bzw. *y*. Danach haben Individuen mit ähnlichen Amplifikationsmustern eine hohe BSR, und unterschiedliche Bandenmuster ergeben eine geringe BSR. Im Höchstfall ergeben absolut identische Muster eine BSR = 1, während bei keiner gemeinsamen Bande eine BSR = 0 als Minimum errechenbar ist.

Im Rahmen der Analyse der gepoolten Proben (vgl. Kap. 5.4) wurde – da die BSR die Ähnlichkeit von Mischproben überschätzt – zusätzlich das Maß der **Einfachen Übereinstimmung (SM, *simple matching coefficient*)** verwendet. Es handelt sich hierbei um das Verhältnis der Übereinstimmungen zur Gesamtzahl der Werte. Übereinstimmungen und Nichtübereinstimmungen werden gleich gewichtet. Die Berechnung der beiden Ähnlichkeitsmaße erfolgte mittels SPSS 11.0 (SPSS Inc.).

4.3.1.2 Clusteranalyse

Ziel der Clusteranalyse ist es mit Hilfe des angewandten Algorithmus homogene Gruppen zu identifizieren und diese in separate Cluster einzuordnen. Dabei wird paarweise zwischen den zu beurteilenden Objekten die Ähnlichkeit gemessen. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe dieser Ähnlichkeiten Gruppen gebildet, wobei der Abstand zwischen den Objekten einer Gruppe stets kleiner ist als zwischen den Gruppen (BORTZ et al. 1990, BORTZ 1993, BÜHL & ZÖFEL 2000). Die nach diesem Verfahren erzeugten Dendrogramme können dazu dienen, Distanzen auf der Basis von Allelfrequenzen oder genetischer Distanzmaße graphisch darzustellen.

Zur Gruppierung nach Ähnlichkeiten wurde die ermittelte 0/1-Matrix deshalb einer Clusteranalyse unterzogen. Die Clusteranalyse wurde mit Hilfe des Programmes STATISTICA 5.0 (STATSOFT Inc., Tulsa, USA) durchgeführt. Als Fusionskriterium wurde die häufig verwendete „average linkage“ in der Ausprägung als „unweighted pair group average“ (UPGMA) genutzt (SNEATH & SOKAL 1973).

Dieses Verfahren spiegelt die Datenstruktur nur dann korrekt wider, wenn die Distanzen ultrametrisch sind (WÄGELE 2001). Diese Annahme trifft auf biologische Daten in der Regel nicht zu, da die Evolutionsprozesse normalerweise nicht regelmäßig ablaufen. Aus diesem Grund wurden zur Dendrogrammdarstellung die mittels POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) generierten Distanzmaße zusätzlich in das Programm TREEVIEW 1.66 (PAGE 2001) eingelesen und in der Form eines *unrooted*

*tre*e dargestellt. Auch hierbei handelt es sich bei dem verwendeten Fusionskriterium um die UPGMA-Methode, allerdings sind die Distanzmaße mittels PHYLIP 3.57c (FELSENSTEIN 1995) entsprechend der *Neigbor-Joining*-Methode (SAITOU & NEI 1987) modifiziert. Dieses häufig eingesetzte Verfahren benötigt keine ultrametrischen Distanzen, toleriert also taxaspezifische Abweichungen in den Evolutionsraten, die durch unterschiedliche Astlängen dargestellt werden.

4.3.1.3 Faktorenanalyse

Zur zusätzlichen Erläuterung der genetischen Variation der untersuchten Populationen wurde eine Faktorenanalyse in der Ausprägung als Hauptkomponentenanalyse (HKA, oder *principal component analysis*, PCA) durchgeführt (SPSS 11.0, SPSS Inc.). Die Faktorenanalyse ist ein datenreduzierendes und hypothesengenerierendes Verfahren, das eine große Anzahl von Variablen gemäß ihrer korrelativen Beziehungen in wenige, voneinander unabhängige Variablengruppen ordnet. Hierzu wurden nach Berechnung einer Vierfelder-Korrelationsmatrix zum einen die binären Informationen zu den Einzelindividuen, zum anderen aber auch die der gepoolten Proben auf einige wenige Hauptkomponenten reduziert (BÜHL & ZÖFEL 2000). Dies ermöglicht gegebenenfalls den Nachweis von Kopplungen von Informationen bzw. von Trends in der Datenstruktur (NESBITT et al. 1995). Durch diese Datenreduktion kann ein Großteil der im Datensatz enthaltenen Variation graphisch dargestellt werden (MANLY 1994). Die graphische Darstellung der mit meist drei Faktoren (bzw. Eigenwert>1) durchgeführten Extraktion erfolgte in einer varimax-rotierten Komponentenmatrix.

4.3.2 Populationsgenetische Analysen

Die statistische Auswertung der populationsgenetischen Analysen basiert weitestgehend auf dem Schätzverfahren nach LYNCH & MILLIGAN (1994). Dieses Verfahren wurde entwickelt, um dem Dominanzfehler dominanter Marker entgegen zu wirken. Zur Ergänzung der hiermit gewonnenen Daten wurden zwei weitere Verfahren in die Untersuchung einbezogen. Mit Hilfe der beiden PC-Programme POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) und ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000) wurden Berechnungen durchgeführt, die zusätzliche Aussagen zum Genfluss zwischen Populationen und der genetischen Variation zwischen hypothetisch angenommenen Gruppen ermöglichen.

4.3.2.1 Allelfrequenz

Die Allelfrequenz ist die Häufigkeit eines Merkmals in einer Population und stellt in populationsgenetischen Untersuchungen meist die statistische Grundlage der Differenzierung von Individuen und den aus ihnen zusammengesetzten Populationen dar. Unter der Voraussetzung, dass sich eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, ist $x = q^2$ und $\sqrt{x}$ entspricht der

Frequenz des Nullallels. Danach kann deren Frequenz nach LYNCH & MILLIGAN (1994) geschätzt werden:

$$\hat{q} = \sqrt{\hat{x}} \cdot \left(1 - \frac{Var(\hat{x})}{8 \cdot \hat{x}^2}\right)^{-1}$$

$$\text{mit } Var(\hat{q}) = \frac{1 - \hat{x}}{4 \cdot n}$$

Die Varianz der Frequenz von Homozygoten für das Nullallel wird dabei wie folgt berechnet:

$$Var(\hat{x}) = \frac{\hat{x} \cdot (1 - \hat{x})}{n}$$

4.3.2.2 Genetische Diversität

Zur Berechnung der genetische Diversität einer oder mehrerer Populationen existieren zahlreiche statistische Verfahren. Im Rahmen der Anwendung dieses Maßes für dominante Marker wurde von LYNCH & MILLIGAN (1994) ein Schätzverfahren entwickelt, dass die Nachteile anderer Verfahren kompensiert und heute am häufigsten für die Auswertung von RAPD- und ISSR-Daten Verwendung findet (vgl. ZHIVOTOVSKI 1999, KRAUSS 2000).

Nach LYNCH & MILLIGAN (1994) kann die genetische Diversität an einem Locus wie folgt geschätzt werden:

$$\hat{H}_j(i) = 2\hat{q}_j(i) \cdot \left[1 - \hat{q}_j(i)\right] + 2 \cdot Var\left[\hat{q}_j(i)\right]$$

$$\text{mit } Var\left[\hat{H}_j(i)\right] = 4 \cdot \left[1 - 2\hat{q}_j(i)\right]^2 \cdot Var\left[\hat{q}_j(i)\right]$$

Die durchschnittliche genetische Diversität der *j*-ten Population über alle Loci ist dementsprechend:

$$\hat{H}_j = \frac{1}{L} \cdot \sum_{i=1}^{L} \hat{H}_j(i)$$

$$\text{mit } Var_j\left(\hat{H}_j\right) = \frac{1}{L^2} \cdot \sum Var\left[\hat{H}_j(i)\right]$$

Unter Betrachtung von *n* Populationen wird die genetische Diversität innerhalb der Populationen wie folgt geschätzt:

$$\hat{H}_W = \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^{n} \hat{H}_j$$

Die durchschnittliche genetische Diversität über alle Loci zwischen den Populationen *j* und *k* entspricht:

$$\hat{H}_{jk} = \frac{1}{L} \cdot \sum_{i=1}^{L} \hat{H}_{jk}(i)$$

$$\text{mit } Var\left(\hat{H}_{jk}\right) = \frac{1}{L \cdot (L-1)} \cdot \sum_{i=1}^{L} \left[\hat{H}_{jk}(i) - \hat{H}_{jk}\right]^2$$

Unter Betrachtung von *n* Populationen kann die durchschnittliche genetische Diversität zwischen *n* Populationen über

$$\hat{H}_B = \frac{2}{n \cdot (n-1)} \cdot \sum_{j<k} \hat{H}_{jk}$$

$$\text{mit } Var\left(\hat{H}_B\right) = \frac{2 \cdot \left[V_B + 2 \cdot (n - 2C_B)\right]}{n \cdot (n-1)}$$

angenähert werden. *VB* und *CB* ergeben sich aus der Standarddefinition von Varianz und Covarianz für $\hat{H}_{jk}$. Bei dem Vergleich von zwei Populationen (n = 2) wird $\hat{H}_B = \hat{H}_{jk}$.

Mit Hilfe des von YEH et al. (1999) entwickelten PC-Programmes POPGENE (Version 1.32) wurde zusätzlich über die *observed number of alleles* (n_a, nach KIMURA & CROW 1964) und *effective number of alleles* (n_e, HARTL & CLARK 1997) die erwartete Heterozygotie nach NEI (1973) sowie der ebenfalls als Maß der genetischen Diversität bewertete Shannon-Information-Index bestimmt. Die erwartete Heterozygotie nach NEI (1973) (*Nei's esxpected heterozygosity*) errechnet sich mittels POPGENE 1.32 nach folgender Formel:

$$H_T = 1 - \sum \left(\frac{\sum p_{ik}}{n} \right)^2 \cdot k$$

mit p_{ik} als Frequenz des *k*-ten Allels der Popularion *i* und *n* als der Anzahl der untersuchten Populationen.

Der Shannon-Information-Index nach LEWONTIN (1972) beruht auf der Spezies-Diversität nach SHANNON (1949) und ist als Maß für die relative Variabilität der Allelverteilung in einer Population definiert. Er errechnet sich über

$$HS = \sum_{i=1}^{n} p_i \cdot \ln p_i$$

mit p_i als der relativen Abundanz des *i*-ten Amplifikationsproduktes und *n* als der Anzahl der Loci. Er gilt als vergleichsweise unempfindlich hinsichtlich der Effekte, die durch dominante Marker hervorgerufen werden, ist aber auch für codominante Marker anwendbar.

4.3.2.3 Populationsunterteilung

Als Grundlage der Berechnung genetischer Distanzen und der *F*- bzw. *Φ*-Statsitik bedarf es nach dem Verfahren von LYNCH & MILLIGAN (1994) der Schätzung der Populationsunterteilung über

$$\hat{H}'_{jk}(i) = \hat{q}_j(i) + \hat{q}_k(i) - 2\cdot\left[\hat{q}_j(i)\cdot\hat{q}_k(i)\right]$$

$$\text{mit } Var\left(\hat{H}'_{jk}(i)\right) = \left[1-2\hat{q}_k(i)\right]^2\cdot Var\left[\hat{q}_j(i)\right] + \left[1-2\hat{q}_j(i)\right]^2\cdot Var\left[\hat{q}_k(i)\right] - 4\cdot Var\left[\hat{q}_j(i)\right]\cdot Var\left[\hat{q}_k(i)\right]$$

Wenn keine Populationsunterteilung vorliegt, dann sind die Allelfrequenzen aller untersuchten Populationen gleich und es gilt:

$$\hat{H}_{jk}(i) = \hat{H}_j(i) = \hat{H}_k(i)$$

Nach LYNCH & MILLIGAN (1994) kann demnach WRIGHT's F_{ST}-Wert wie folgt geschätzt werden:

$$\hat{F}_{ST} = \frac{\hat{H}_B}{\hat{H}_T}\cdot\left(1-\frac{\hat{H}_B\cdot Var\left(\hat{H}_W\right) - \hat{H}_W\cdot Var\left(\hat{H}_B\right) + \left(\hat{H}_B-\hat{H}_W\right)\cdot Cov\left(\hat{H}_B\cdot\hat{H}_W\right)}{\hat{H}_B\cdot\hat{H}_T^{\,2}}\right)^{-1}$$

$$\text{mit } Cov\left(\hat{H}_B,\hat{H}_W\right) = \frac{1}{n}\cdot\left[\frac{1}{n\cdot(n-1)}\cdot\left(\sum_{j=1}^{n}\hat{H}_j\cdot\sum_{\substack{k=1\\k\neq j}}^{n}\hat{H}_{jk}\right) - \left(\hat{H}_W\cdot\hat{H}_B\right)\right]$$

$$\text{und } Var\left(\hat{F}_{ST}\right) = \left(\frac{\hat{F}_{ST}}{\hat{H}_B}\right)^2\cdot\left[\left(\frac{\hat{H}_W}{\hat{H}_B}\right)^2\cdot Var\left(\hat{H}_B\right) - 2\cdot\left(\frac{\hat{H}_W}{\hat{H}_B}\right)\cdot Cov\left(\hat{H}_B,\hat{H}_W\right) + Var\left(\hat{H}_W\right)\right]$$

4.3.2.4 Genetische Distanz

Auf dem Schätzwert der genetischen Distanz nach NEI (1972) aufbauend kann die genetische Distanz nach LYNCH & MILLIGAN (1994) wie folgt geschätzt werden:

$$\hat{D}_{jk} = -\ln\cdot\left(\frac{\hat{J}_{jk}}{\sqrt{\hat{J}_j\cdot\hat{J}_k}}\right) - \frac{Var\left(\hat{H}'_{jk}\right)}{2\cdot\hat{J}_{jk}^{\,2}} + \frac{Var\left(\hat{H}_j\right)}{4\cdot\hat{J}_j^{\,2}} + \frac{Var\left(\hat{H}_k\right)}{4\cdot\hat{J}_k^{\,2}}$$

$$\text{mit } Var\left(\hat{D}_{jk}\right) = \frac{Var\left(\hat{H}_j\right)}{4\cdot\hat{J}_j^{\,2}} + \frac{Var\left(\hat{H}_k\right)}{4\cdot\hat{J}_k^{\,2}} + \frac{Var\left(\hat{H}'_{jk}\right)}{\hat{J}_{jk}^{\,2}} - \frac{Cov\left(\hat{H}_j,\hat{H}'_{jk}\right)}{\hat{J}_j\cdot\hat{J}_{jk}} - \frac{Cov\left(\hat{H}_k,\hat{H}'_{jk}\right)}{\hat{J}_k\cdot\hat{J}_{jk}}$$

Neben diesem Verfahren wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit der Daten mit anderen Untersuchungen mittels POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) zusätzlich die genetische Distanz nach NEI (1972) bzw. in der *unbiased version* nach NEI (1978) berechnet. Sie berechnet sich über

$$Ds = -\log \cdot \left(\frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x \cdot J_y}} \right)$$

mit J_x bzw. J_y als der Zahl der Allele in Population x bzw. y und J_{xy} als der Zahl der den beiden Populationen gemeinsamen Allele.

4.3.2.5 Genfluss

Auf der Hypothese der Untergruppenvariation aufbauend wurde mit Hilfe von POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) der Genfluss (Ne_m bzw. Nm^*) zwischen den Individuen innerhalb und außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes errechnet. Genfluss ist definiert als der Austausch von Allelen zwischen Populationen (vgl. SLATKIN 1973, 1981, 1985). Die wichtigste Auswirkung von Genfluss ist die Einbringung neuer Allele und damit die Erhöhung der genetischen Variabilität. Ist $Ne_m<1$, gelten die untersuchten Populationen als räumlich getrennt (WRIGHT 1978, JORDE et al. 1999). Der Genfluss zwischen Populationen ist zum einen abhängig von der geographischen Distanz zwischen ihnen (JAIN & BRADSHAW 1966), zum anderen aber auch von den Vermehrungs- und Verbreitungsmechanismen einer Art.

Es handelt sich hier um ein Verfahren, das auf der Schätzung des Genflusses über die Schätzung des G_{ST} bzw. F_{ST} (nach SLATKIN & BARTON 1989) basiert und über den Φ_{ST}-Wert (nach WEIR & COCKERHAM 1984) berechnet werden kann:

$$Nem \approx 0{,}25 \cdot \left(\frac{1}{\Phi_{ST} - 1} \right)$$

Die Erläuterung zur Berechnung des Φ_{ST}-Wertes (nach WEIR & COCKERHAM 1984) findet sich in Kap. 4.3.2.6.

4.3.2.6 Genetische Variation in Untergruppen

Im Rahmen der Untersuchung wurde die Hypothese aufgestellt, dass es innerhalb des Sets untersuchter Individuen Kopplungen gibt. Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurde mit Hilfe des PC-Programms ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000) überprüft, ob eine Unterteilung der genetischen Populationsstruktur auftritt und Variationen innerhalb von Untergruppen der Grundgesamtheit nachweisbar sind. Das Verfahren basiert auf der für RFLP-Daten konzipierten

analysis of molecular variance (AMOVA, EXCOFFIER et al. 1992) und wurde für Anwendung auf dominante Marker erweitert (vgl. z.B. HUFF et al. 1993).

Bei diesem Verfahren wird die Gesamtvarianz des Datensatzes einzelnen Varianzkomponenten zugeordnet. Es werden die Varianzkomponenten „innerhalb von Populationen“ und „zwischen Populationen“ unterschieden und prozentuale Anteile an der Variation definiert. Der sog. Φ_{ST}-Wert (nach WEIR & COCKERHAM 1984) berechnet sich dementsprechend aus

$$\Phi_{ST} = \frac{\sum i \cdot \sum u\sigma^2{}_B}{\sum i \cdot \sum u\sigma^2{}_T}$$

wobei *i* bzw. *u* für die Anzahl der Allele bzw. Loci stehen und die Gesamtvarianz der Allelfrequenz über die Summe ihrer Komponenten errechnet wird:

$$\sigma^2{}_T = \sigma^2{}_B + \sigma^2{}_W + \sigma^2{}_I$$

mit σ_B als Varianz der Allelfrequenzen zwischen Subpopulationen, σ_W als Varianz der Allelfrequenzen zwischen Individuen einer Subpopulationen und σ_I als der Varianz zwischen Gameten innerhalb des Individuums.

5 Ergebnisse

5.1 Morphologisch-biometrische Charakterisierung der untersuchten Individuen

Wie in Kap. 3 bereits beschrieben, entstammen die untersuchten Individuen klimatisch sehr unterschiedlichen Gebieten. Die klimatische Variabilität der Standorte kann, wie auch in den Kap. 2.2 und 2.3 erläutert wurde, zu einer ausgeprägten morphologischen Variabilität führen.

Um eine morphologische Charakterisierung der Individuen an den einzelnen Untersuchungsflächen darstellen zu können, wurden sowohl ausgewählte morphologische Parameter am beprobten Baum als auch an den beprobten einjährigen Trieben erfasst. Einige geeignete Parameter wurden zusätzlich für die Berechnung biometrischer Relationen verwendet (vgl. Kap. 4.2.1). Es handelt sich hierbei um Größen, die in forstlichen Bonituren (vgl. u.a SCHMIDT-VOGT 1972a, FAENSEN-THIEBES et al. 1999, DIETRICH & HEITZ 2003), Waldzustandsberichten (vgl. z.B. Ministerium für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg 2002) und anderen Untersuchungen zur Morphologie und Biometrie von Fichten (z.B. PAULUS et al. 1995, BARTEL et al. 2002, 2003a) häufig Verwendung finden. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Höhenlage – ein Standortfaktor, der auch klimatische Unterschiede berücksichtigt – werden die Ergebnisse nach Höhenlage über NN sortiert dargestellt (vgl. Tab. 6, S. 32).

Prinzipiell muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die meisten der nachfolgend genannten Parameter abhängig von den in Kap. 2.3 beschriebenen **Wuchs- bzw. Verzweigungstypen** sind. Diese sind jedoch je nach Bestandesdichte von der Stammbasis aus nicht immer eindeutig definierbar. Wegen fließender Übergänge zwischen den beschriebenen Typen ist die exakte Ansprache auch zudem zu fehlerbehaftet, um reproduzierbar ausgewertet werden zu können. Aufgrund der bestehenden Unsicherheit wurde dieser Parameter bei der Erhebung morphologischer Merkmale nicht berücksichtigt.

Die in der Folge dargestellten Erhebungen erfolgten an den Untersuchungsstandorten Berchtesgaden, Bayerischer Wald, Harz, Solling und Warndt an den jeweils 30 auch molekulargenetisch analysierten Individuen. An den Untersuchungsstandorten Hunsrück und Belau wurde die morphologische Charakterisierung lediglich an 15 Individuen durchgeführt.

Beim Vergleich standortkundlich deutlich unterschiedlicher Untersuchungsflächen stellen – zumindest bei vergleichbarem Alter der Bäume – der Stammumfang und die Baumhöhe als Maße für die Wachstumsbedingungen an den jeweiligen Standorten bedeutsame Größen dar. Wie aus Abb. 19 hervorgeht, zeigen die Bäume in Berchtesgaden den größten **Stammumfang**. Wenn auch die Bäume des Standortes mit geringster Meereshöhe (Belau) den geringsten durchschnittlichen Stammumfang

aufweisen, ist eine direkte Höhenabhängigkeit dieses Parameters nicht zu erkennen; lediglich der Bestand westlich des Belauer Sees ist aus Bäumen mit signifikant ($p<0,05$) geringerem Brusthöhenumfang zusammengesetzt (vgl. Tab. 17). Dieser Unterschied ist sicherlich aber auch darauf zurückzuführen, dass die Bäume in Berchtesgaden ein deutlich höheres Alter aufweisen, während die Fichten von Belau mit etwa 60 Jahren die jüngsten Individuen in vorliegender Untersuchung darstellen (vgl. Anhang III).

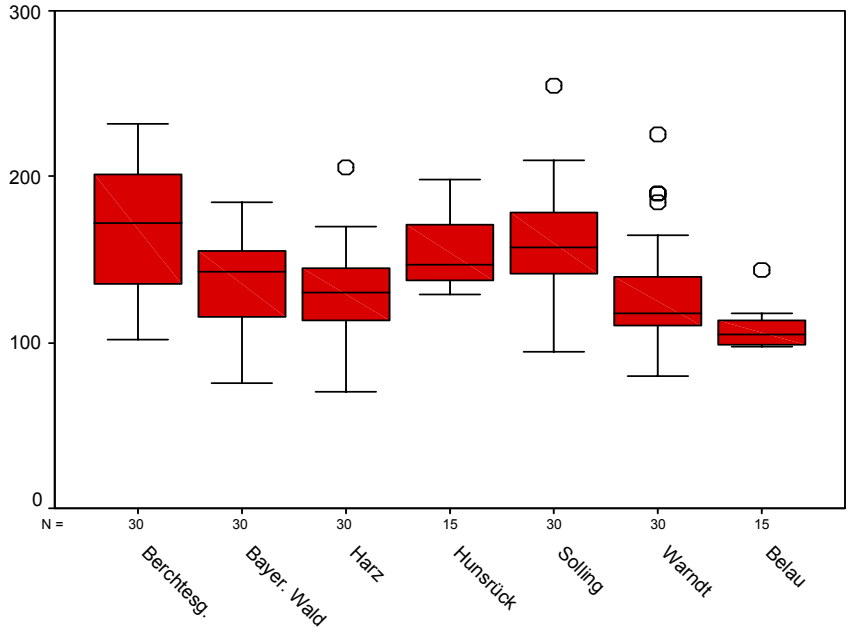


Abb. 19: Stammumfänge [cm] der beprobten Individuen

Tab. 17: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Stammumfänge (vgl. Abb. 19) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)

	n	1	2	3	4
Belau	15	108,40			
Warndt	30		127,67		
Harz	30		128,97		
Bayer. Wald	30		137,33	137,33	
Hunsrück	15			154,87	154,87
Solling	30				162,90
Berchtesg.	30				172,00
Signifikanz		1,000	0,316	0,052	0,072

In Abb. 20 wird hingegen ersichtlich, dass die **Baumhöhe** mit abnehmender Höhenlage tendenziell zunimmt. Die ca. 100-jährigen Bestände von Hunsrück, Solling und Warndt weisen einen durchschnittlich höheren Wuchs als die deutlich älteren Bestände von Berchtesgaden und aus dem Bayerischen Wald auf. Die Baumhöhen der Individuen von Berchtesgaden und Bayerischer Wald unterscheiden sich signifikant ($p<0,05$) von den Individuen der Bestände von Harz, Warndt, Hunsrück und Solling (vgl. Tab. 18). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Meereshöhe einen Einfluss auf die Baumhöhe hat und sich die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in morphologischen Differenzierungen zwischen den Individuen unterschiedlicher Standorte äußern.

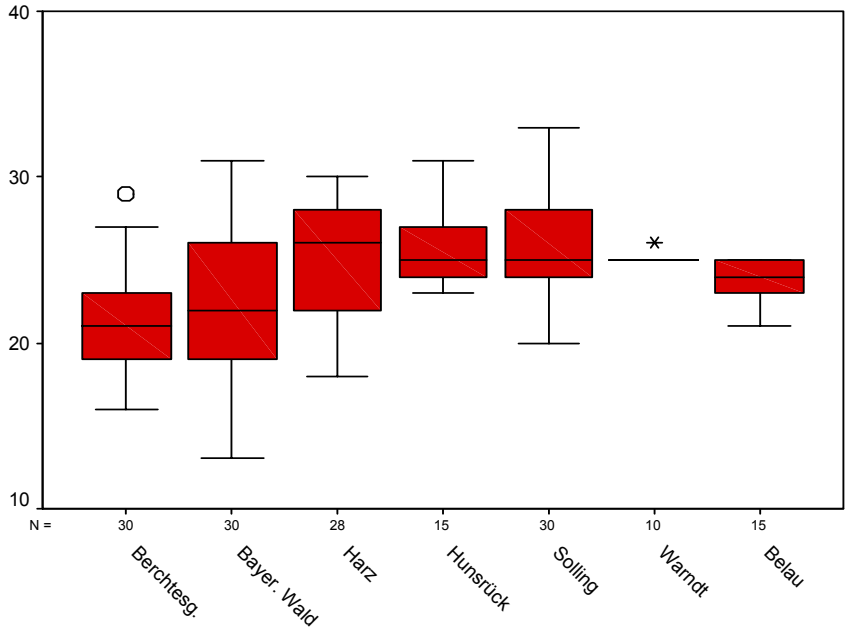


Abb. 20: **Baumhöhen [m] der beprobten Individuen**

Tab. 18: **Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Baumhöhen (vgl. Abb. 20) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)**

	n	1	2
Berchtesg.	30	21,37	
Bayer. Wald	30	22,30	
Belau	15	23,53	23,53
Harz	28		24,89
Warndt	10		25,10
Hunsrück	30		25,53
Solling	15		25,73
Signifikanz		0,059	0,071

Die **Trieblänge** (vgl. Abb. 21) wird insbesondere in der Umweltanalytik als wichtiger morphologischer Parameter betrachtet (vgl. PAULUS et al. 1995, KLEIN & PAULUS 1997). Neben der Tatsache, dass durch sie das Wuchsverhalten der Fichte in den einzelnen Untersuchungsgebieten charakterisiert wird, ist sie ein Faktor für die Eigenschaft der Fichtentriebe als „Fangsubstrat“ für Luftverunreinigungen zu dienen. Die mittleren Trieblängen sind außer von klimatischen Faktoren und der Ernährungssituation auch vom physiologischen Zustand der Fichte abhängig, insbesondere vom Alter und den Fruktifikationsphasen. Die mittleren Trieblängen zeigen deutlich die Standortsunterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsgebieten und korrelieren deutlich negativ mit der Höhenlage (R^2 = 0,638). Anhand dieses Parameters lassen sich alle Bestände – mit Ausnahme Bayerischer Wald/Harz und Hunsrück/Solling – signifikant ($p<0,05$) voneinander unterscheiden (vgl. Tab. 19).

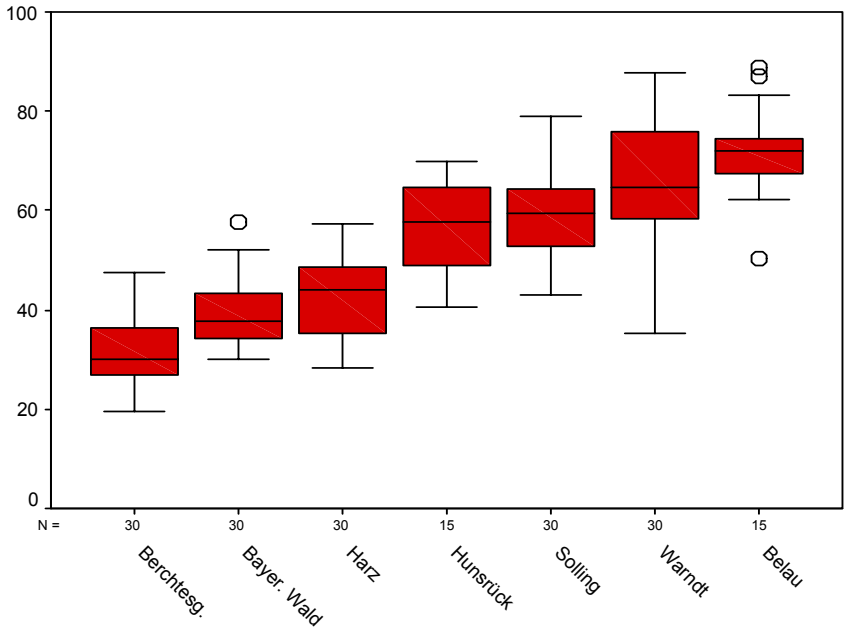


Abb. 21: Trieblängen [mm] der beprobten einjährigen Fichtentriebe

Tab. 19: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Trieblängen (vgl. Abb. 21) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)

	n	1	2	3	4	5
Berchtesg.	30	32,007				
Bayer. Wald	30		40,217			
Harz	30		42,447			
Hunsrück	15			56,440		
Solling	30			58,573		
Warndt	30				65,297	
Belau	15					72,013
Signifikanz		1,000	0,400	0,420	1,000	1,000

Die **Tausendnadelgewichte** (TNG) hängen grundsätzlich von den bereits angeführten Faktoren ab. Sie gelten als Maß für die Nährstoffversorgung der Bäume, es wird aber angenommen, dass sie stärker genetisch fixiert sind (vgl. SCHMIDT-VOGT 1977). Die Bedeutung dieses Parameters besteht hauptsächlich darin, dass durch das TNG die Nadeloberfläche mitberücksichtigt wird. Dies ermöglicht Aussagen zum Stoffwechsel der Pflanze, da beispielsweise bei hohen TNGs hohe Stoffwechselraten zu erwarten sind. Bei geringer Oberfläche (z.B. durch kurze Triebe) kann dies als Verdunstungsschutz bzw. als Schutz vor Schnee- oder Eisbruch gewertet werden. In Abb. 22 werden allerdings nur sehr geringe regionale Unterschiede ersichtlich. Die hohen Schwankungsbreiten innerhalb der Probenkollektive erlauben zum einen keine Unterscheidung zwischen den Untersuchungsgebieten und zum anderen keine Zuordnung der mittleren TNG zu den einzelnen Höhenlagen.

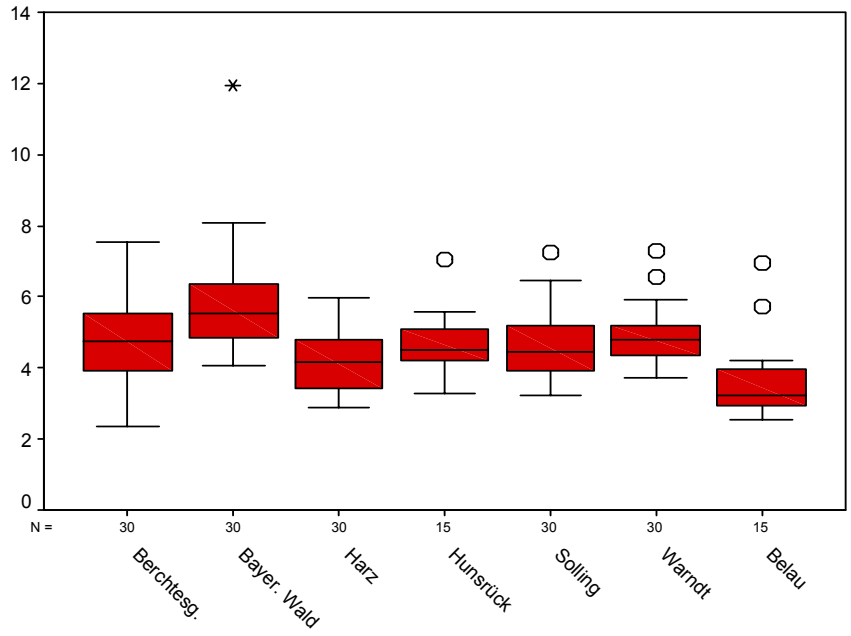


Abb. 22: Tausendnadelgewichte [g] der beprobten Individuen

Der **Benadelungsgrad** gilt insbesondere als immissionsökologisch interessanter Parameter und wird als Indikator für die Luftqualität betrachtet (KNABE 1981, 1982). Man geht davon aus, dass in vergleichsweise unbelasteten Gebieten mehr Nadeljahrgänge an den Bäumen verbleiben, so dass der Benadelungsgrad hier durchschnittlich höher liegt. Er wird als Summenprozent-Angabe über die Jahre berechnet und kann bei maximal sieben zu betrachtenden Jahrgängen 700% erreichen. In Abb. 23 wird deutlich, dass zwar im Bayerischen Wald und in Berchtesgaden die höchsten Benadelungsgrade berechnet werden, aber die zuvor dargestellte Höhenabhängigkeit der Trieblänge nicht erreicht wird. Während die Individuen des Bayerischen Waldes durchschnittlich mehr als 600% erreichen, sind die Benadelungsgrade der Bäume aus Berchtesgaden nicht von den übrigen tiefer liegenden Standorten differenzierbar. In diesem Zusammenhang muss allerdings auch darauf hingewiesen werden, dass

auch andere Faktoren, insbesondere Fraßschäden und Pilzinfektionen, die mittlere Lebensdauer der Nadeln reduzieren.

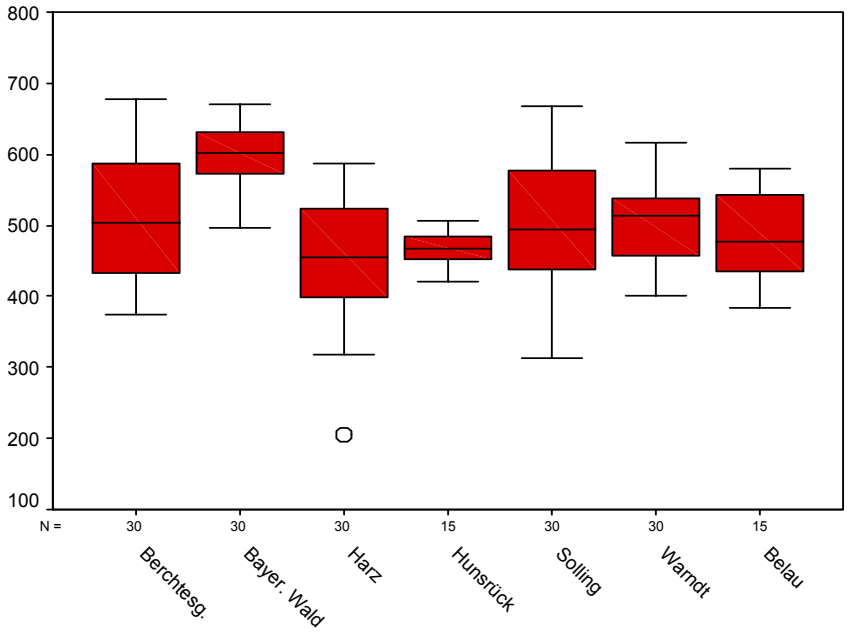


Abb. 23: Benadelungsgrade [Summen%] der beprobten Individuen

Das mittlere Triebgewicht der beprobten einjährigen Triebe kann ebenfalls als Maß für die Wuchsbedingungen an den Untersuchungsstandorten herangezogen werden. Aufgrund der Trennung von Nadeln und Sprossachsen bei der Aufbereitung der Proben sind in der Folge die **Trockengewichte der Nadeln** (vgl. Abb. 24) und **der Sprossachsen** (vgl. Abb. 25) getrennt aufgeführt. Aus den Abbildungen geht hervor, dass die beiden Werte stark voneinander abhängen (R^2=0,622). Eine Differenzierung der untersuchten Standorte anhand der beiden Parameter ist nicht möglich.

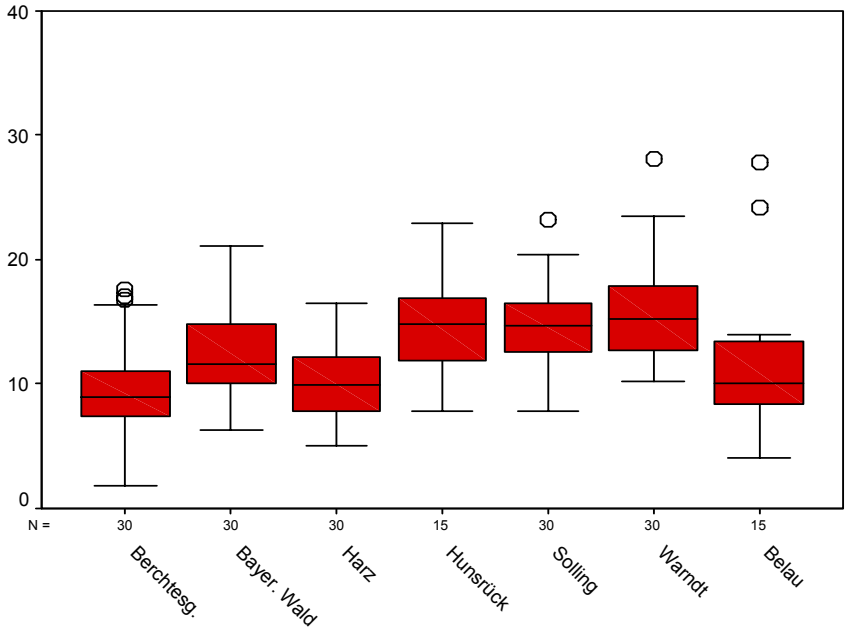


Abb. 24: Nadel-Trockengewichte [g] von jeweils 25 zufällig ausgewählten Trieben

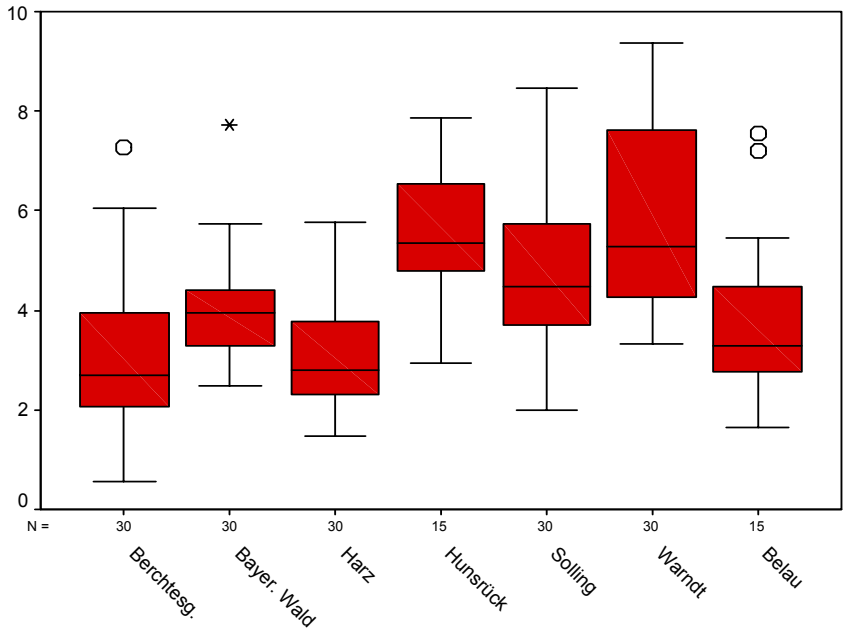


Abb. 25: Spross-Trockengewichte [g] von jeweils 25 zufällig ausgewählten Trieben

Wie bereits erwähnt, wurden aus den oben dargestellten morphologischen Parametern einige ausgewählte biometrische Relationen berechnet, die dazu dienen sollen weitergehende Aussagen zur morphologischen Differenzierung der untersuchten Bestände zu ermöglichen.

Die **Stammumfang-Höhen-Relation** kann als Maß für die Wuchsform der Fichten herangezogen werden, da anhand dieses Verhältnisses der Habitus (z.B. kräftig, schlank) der Bäume bestimmt werden kann. Aus Abb. 26 wird dementsprechend deutlich, dass beim Vergleich der untersuchten Probenahmeflächen die Individuen der Probenahmefläche Berchtesgaden bei vergleichsweise geringer Wuchsleistung ein signifikant ($p<0,05$) stärkeres Dickenwachstum zeigen als alle anderen untersuchten Bäume (vgl. Tab. 20). Die am weitesten vom natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte entfernten Individuen der Untersuchungsfläche Belau weisen im Gegensatz dazu ein deutlich schlankeres Wachstum auf, wenngleich auch hier berücksichtigt werden muss, dass es sich bei Letzteren um wesentlich jüngere Bäume handelt (vgl. Anhang III).

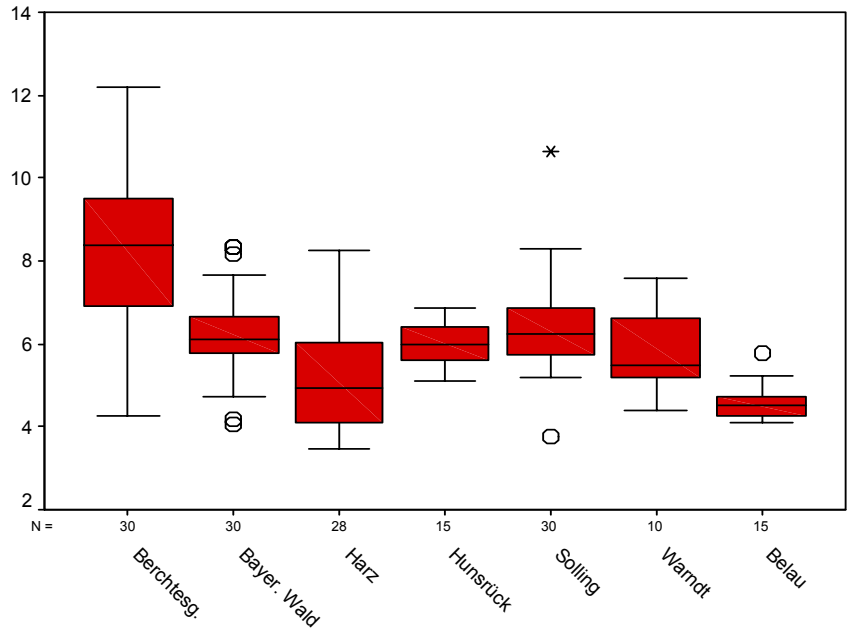


Abb. 26: Stammumfang-Baumhöhen-Relationen der beprobten Individuen

Tab. 20: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Stammumfang-Baumhöhen-Relationen (vgl. Abb. 26) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)

	n	1	2	3	4
Belau	15	4,6078			
Harz	28	5,2406	5,2406		
Warndt	10		5,8108	5,8108	
Hunsrück	15		6,0068	6,0068	
Bayer. Wald	30			6,2380	
Solling	30			6,4212	
Berchtesg.	30				8,1482
Signifikanz		0,125	0,078	0,180	1,000

Des Weiteren wurde das **Tausendnadelgewicht** zur **Trieblänge** in **Relation** gesetzt (Abb. 27). Dies ist vor allem deswegen sinnvoll, weil beide Parameter als stark klimatisch geprägt gelten und dementsprechend ebenfalls als Maß für die Wachstumsbedingungen an einem Standort eingesetzt werden können. Aus Abb. 27 wird ersichtlich, dass die Fichten von Berchtesgaden nicht nur mit dem kürzesten Triebwachstum (vgl. Abb. 21), sondern im Vergleich zu den übrigen Probenahmeflächen auch mit den schwersten Nadeln bei vergleichsweise kurzen Trieben ausgezeichnet sind. Die Darstellung macht deutlich, dass sich diese „kompakte“ Erscheinung – Verhältnis von hohem TNG in Verbindung mit kurzen Trieben – mit abnehmender Höhenlage wesentlich ändert und in dem Belauer Bestand verhältnismäßig lange Triebe mit leichten Nadeln zu finden sind ($p<0,05$) (vgl. Tab. 21).

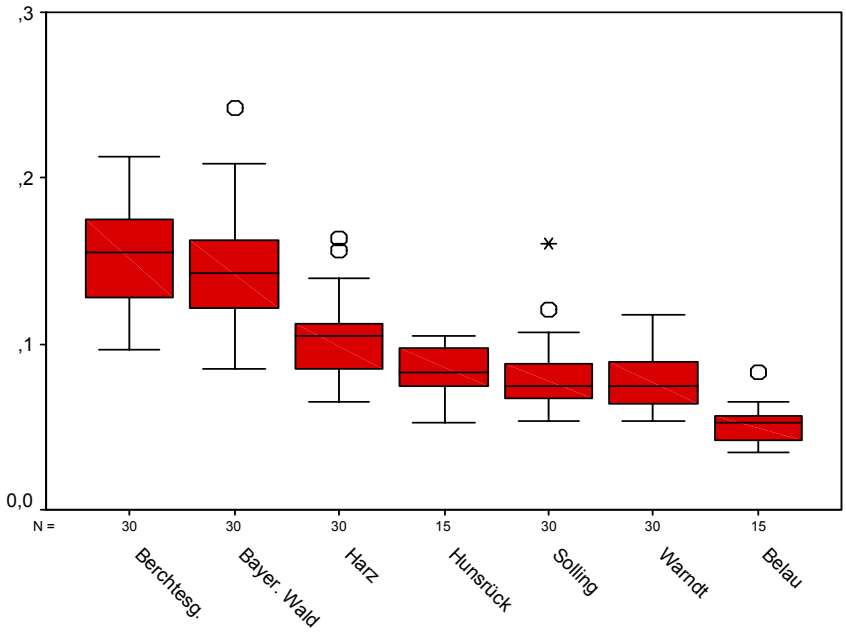


Abb. 27: **TNG-Trieblänge-Relationen der beprobten Individuen**

Tab. 21: **Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der TNG-Trieblänge-Relationen (vgl. Abb. 27) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)**

	n	1	2	3	4
Belau	15	0,051			
Warndt	30		0,077		
Solling	30		0,081		
Hunsrück	15		0,084	0,084	
Harz	30			0,102	
Bayer. Wald	30				0,152
Berchtesg.	30				0153
Signifikanz		1,000	0,457	0,051	0,907

Während das reine Gewichtsverhältnis eine gewisse Höhenabhängigkeit zeigte, wurde als letztes Maß für die Wachstumsbedingungen an einem Standort die **Relation von Trieblänge zu Triebgewicht** berechnet (Abb. 28). Hohe Werte sind dabei mit verhältnismäßig langen und dünnen Trieben gleichzusetzen, während ein niedriger Wert kurze und kräftige Triebe charakterisiert. Bei Letzterem handelt es sich um ein klassisches Anpassungskriterium an kalte und windbelastete Standorte. Demnach zeigen die Bäume des Standortes Belau bei wenig differenten Jahrestriebgewichten vergleichsweise lange Triebe ($p<0,05$) (vgl. Tab. 22). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass diese Unterschiede nicht überbewertet werden dürfen, da bei der Berechnung des Verhältnisses in Berchtesgaden und im Harz einige statistische Ausreißer zu verzeichnen sind.

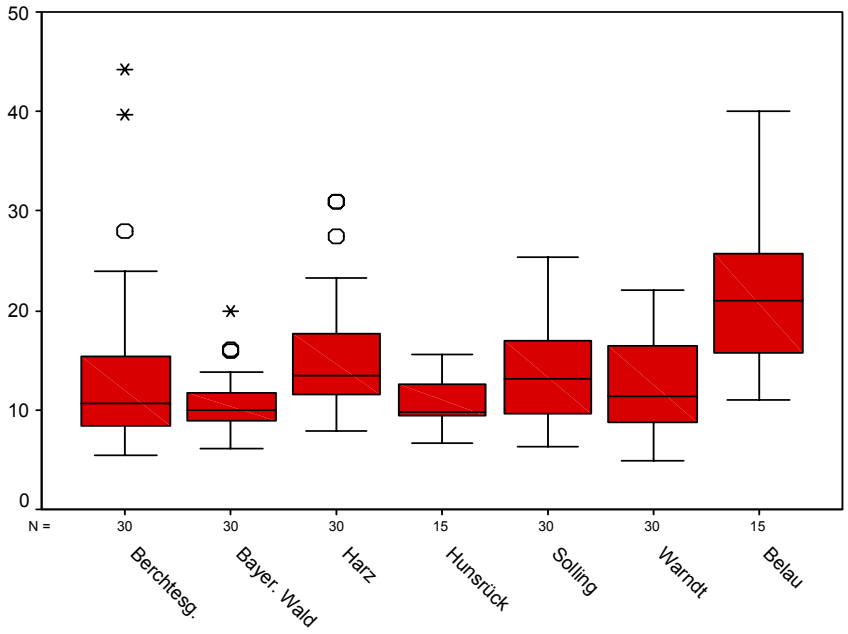


Abb. 28: Trieblänge-Triebgewicht-Relationen der beprobten Individuen

Tab. 22: Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der Trieblänge-Triebgewicht-Relationen (vgl. Abb. 28) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)

	n	1	2	3
Bayer. Wald	30	10,555		
Hunsrück	15	10,776		
Warndt	30	12,453	12,453	
Solling	30	13,718	13,718	
Berchtesg.	30	13,981	13,981	
Harz	30		15,406	
Belau	15			21,782
Signifikanz		0,079	0,123	1,000

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der morphologischen und biometrischen Analyse, dass zwischen den untersuchten Populationen morphologische Differenzierungen zu verzeichnen sind, signifikante Unterschiede aber hauptsächlich für die beiden „Extremstandorte“ Berchtesgaden und Belau nachgewiesen werden. In der Einzelbetrachtung der Parameter konnte deutlich gemacht werden, dass insbesondere die Trieblänge klimageprägt bzw. höhenabhängig zu sein scheint. Hinsichtlich der morphologisch-biometrischen Charakterisierung der Populationen bleibt im einzelnen Folgendes festzuhalten:

Die **Population von Berchtesgaden** ist mit vergleichsweise schwach- bzw. niedrigwüchsigen, aber kräftigen Bäumen ausgestattet. Die einjährigen Triebe dieser Population zeichnen sich durch geringe Trieblänge bei ebenfalls eher niedrigen Triebgewichten (Nadel- und Sprosstrockengewichte) aus. Daraus ergibt sich sowohl hinsichtlich der Baumform als auch hinsichtlich der Gestalt der Triebe eine kompakte Struktur.

Die Individuen der **Population von Belau** sind – unter Berücksichtigung des deutlich geringeren Baumalters – durch starkes Höhenwachstum bei niedrigem Stammdickenwachstum und somit durch ein schlankes Erscheinungsbild charakterisiert. Die einjährigen Triebe zeigen verhältnismäßig großes Längenwachstum bei geringen Nadel- und Sprossachsengewichten. Diese Kombination führt auch bei den Trieben zu einer „schlanken“ Struktur.

Die **übrigen Populationen** sind je nach betrachtetem Parameter eher der einen oder der anderen Form zuzuordnen und stehen sowohl hinsichtlich der Baumform als auch der Form der Triebe zwischen diesen beiden Extremen. Beispielhaft seien die Triebe der Warndt-Population charakterisiert: Während sich die Trieblängen der Warndt-Population nicht von den der Belauer Individuen unterscheiden, werden hier gleichzeitig deutlich höhere TNG und Triebgewichte ermittelt. Dies äußert sich in einer wesentlich dichteren Benadelung der Triebe. Mögliche Ursachen der morphologischen Differenzierung der untersuchten Populationen werden in Kap. 6.2 diskutiert.

Zusätzlich zur morphologisch-biometrischen Charakterisierung der einzelnen Populationen wurden diese unter Berücksichtigung ihrer geographischen Verteilung zusätzlich in zwei Gruppen zusammengefasst und diese Gruppen einander gegenübergestellt. Es wurde angenommen, dass sich die Standorte, die sich im natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte befinden, zu einem gewissen Teil aus autochthonen Individuen bzw. aus ortsangepasster Naturverjüngung aufbauen und sich deshalb gegenüber den übrigen, aus forstlichem Saat- bzw. Pflanzgut aufgebauten Beständen abgrenzen lassen müssten. Dementsprechend wurden die Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz als „natürliche“ Gruppe der Populationen zusammengefasst, die sich innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte befinden, und der „künstlichen“ Gruppe außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes (Hunsrück, Solling, Warndt und Belau) gegenübergestellt. Auch hier wurden die oben bereits genannten morphologischen und biometrischen Parameter berechnet. Aus Abb. 29 und Abb. 30 wird deutlich, dass sich die beiden Gruppen nur hinsichtlich weniger Parameter signifikant voneinander unterscheiden. Während die für die oben beschriebenen Wuchsformen

verantwortlichen Parameter Stammumfang und Baumhöhe und ihre Relation deutliche Differenzierungen hinsichtlich der Meereshöhe erbrachten, unterscheiden sich die Gruppen hinsichtlich dieser Parameter nicht (p = n.s.). Differenzierungen zwischen den beiden Gruppen können lediglich an den Parametern Trieblänge, Nadel- und Sprosstrockengewicht und TNG-Trieblängen-Relation festgemacht werden (p<0,05). Es muss in diesem Zusammenhang aber darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den drei „natürlichen“ Populationen auch um die drei Standorte mit den höchsten Meereshöhen handelt. Deshalb ist davon auszugehen, dass in dieser Darstellung sicherlich die Höhenabhängigkeit der genannten Faktoren eine wesentliche Rolle spielt und „natürliche“ Populationen nicht automatisch durch kürzere Triebe und niedrigere Triebgewichte charakterisiert sind.

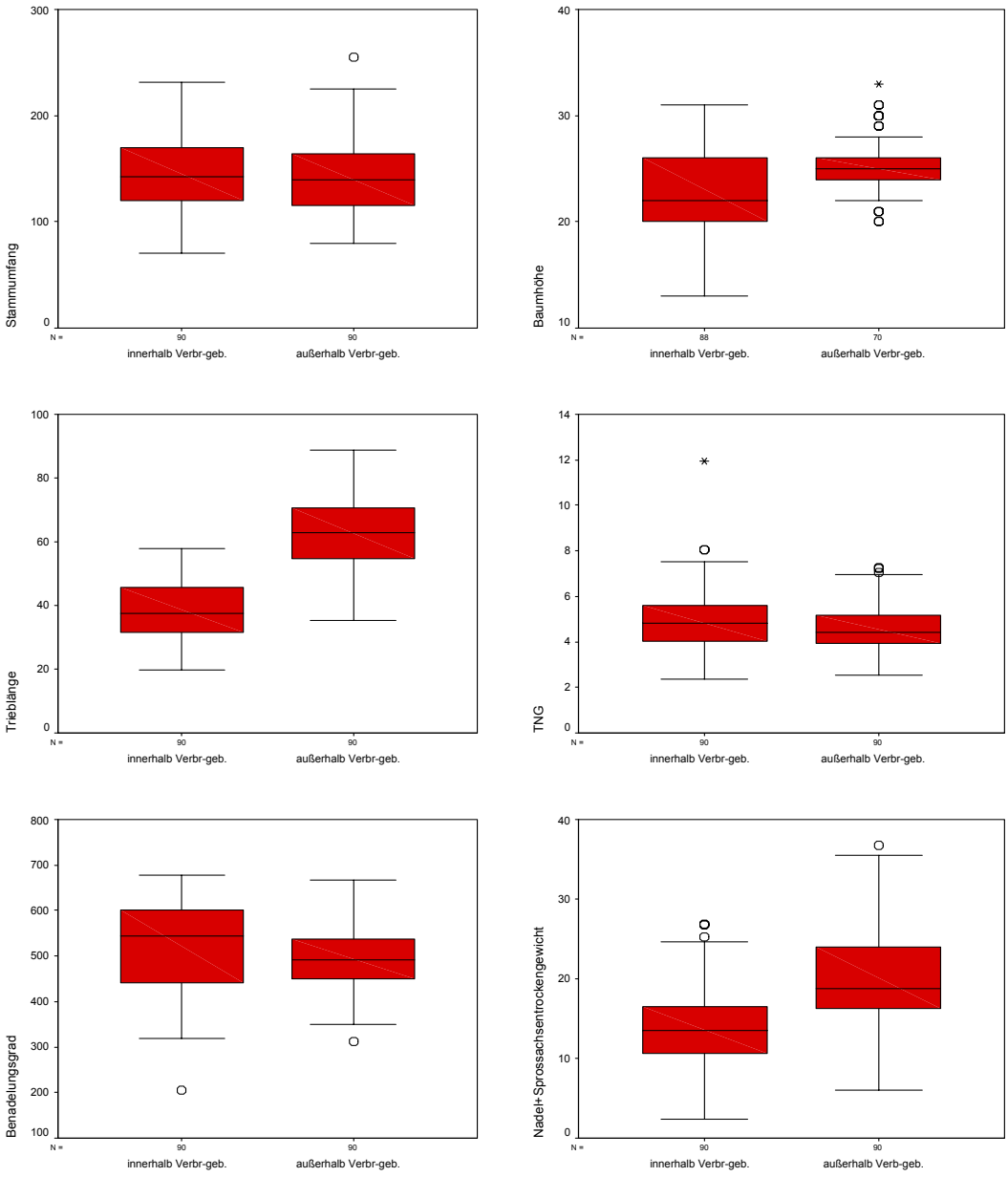


Abb. 29: Box&Whisker-Plots der für die beiden angenommenen Gruppen ermittelten morphologischen Parameter

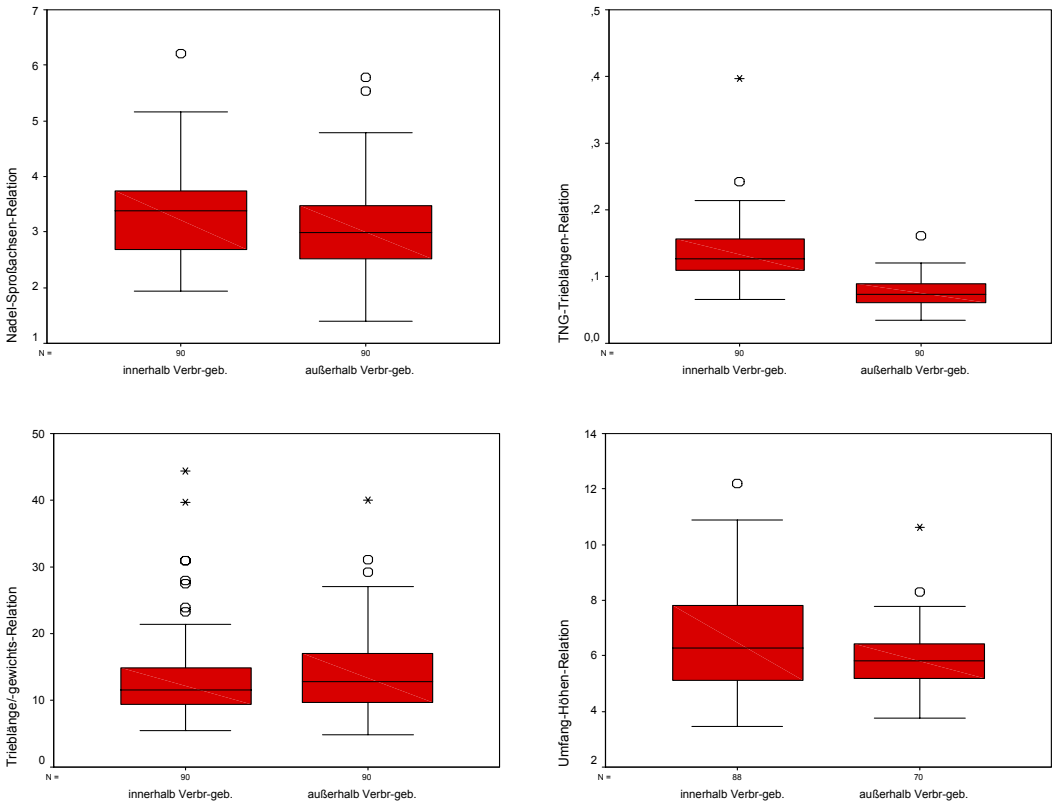


Abb. 30: **Box&Whisker-Plots der für die beiden angenommenen Gruppen errechneten biometrischen Relationen**

5.2 Populationsgenetische Analyse der Einzelbäume

5.2.1 RAPD-PCR

Im Rahmen der populationsgenetischen Untersuchung der Fichtenbestände wurden 14 decamere RAPD-Primer verwendet. Mit diesen konnten insgesamt 234 DNA-Fragmente amplifiziert werden, von denen 225 als polymorphe RAPD-Marker einzustufen sind, während 9 Marker in allen 210 untersuchten Individuen vorhanden waren (vgl. Tab. 23).

Tab. 23: **Markerzahl (n_M) und Anzahl polymorpher Marker (n_p), aufgeschlüsselt nach verwendeten RAPD-Primern**

	A12	B05	B09	B13	B14	B16	D06	D12	D17	D19	C203	C452	C479	C628	Sum
n_M	19	13	14	17	19	20	20	15	10	20	16	15	22	14	234
n_p	19	12	12	15	18	20	20	14	9	20	16	15	21	14	225

Populationsspezifische Marker bzw. **Markerkombinationen**, d.h. DNA-Fragmente, die nur in einem der untersuchten Bestände ermittelt wurden bzw. kombiniert auftraten, konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Differenzierung der Bestände anhand eines einzelnen Markers oder anhand von Markergruppen war somit nicht möglich. Allerdings konnten einige Marker nachgewiesen werden, die hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens eine Zuordnung einer Probe zu einem bestimmten Bestand ermöglichten (vgl. Tab. 24). Beispielhaft sei in diesem Zusammenhang insbesondere auf den Marker D12-600 hingewiesen, der hohe Häufigkeiten in den Populationen von Berchtesgaden und dem Bayerischen Wald erreicht, während er in den übrigen Populationen nicht nachgewiesen werden konnte.

Tab. 24: Abundanzen [%] ausgewählter RAPD-Marker in den untersuchten Populationen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
B13-560	0	3	0	0	100	0	7
B13-520	0	3	53	97	100	3	10
B14-1380	7	97	93	0	100	93	17
B16-820	0	60	100	100	100	100	97
D12-1220	0	43	0	20	100	100	0
D12-1190	50	27	17	100	0	0	0
D12-600	100	97	0	0	0	0	0
D19-1400	93	57	0	93	100	87	87
C479-740	0	27	13	100	67	33	47

Aufgrund des Fehlens eindeutiger Marker wurden, um die genetische Ähnlichkeit der beprobten Bäume innerhalb eines Bestandes sowie die Differenzierungen zwischen den Beständen zu ermitteln, verschiedene Ähnlichkeitsparameter, sowie populationsgenetische Größen wie beispielsweise die **genetische Distanz**, die **genetische Diversität** und die **genetische Variation zwischen Gruppen** errechnet. Die Berechnungen erfolgten nach den sich ergänzenden Verfahren nach LYNCH & MILLIGAN (1994), POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) und ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000).

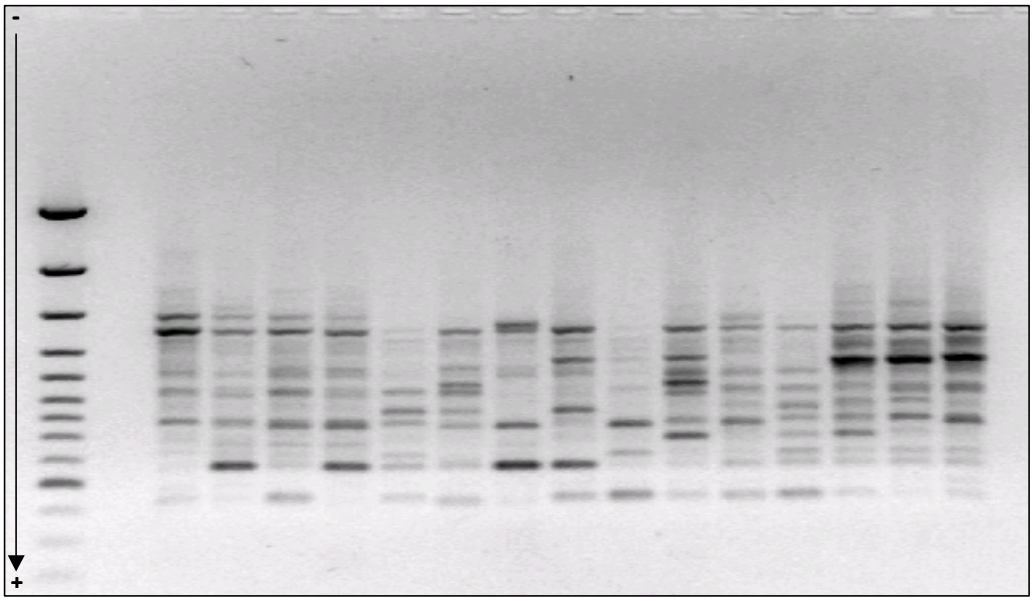


Abb. 31: Beispielhafte Darstellung eines RAPD-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Bayerischer Wald mit Primer D19 (links: Fragmentlängenstandard)

5.2.1.1 Genetische Ähnlichkeit

Wie ein Kap. 4.3.1.1 beschrieben, wurde die Band-Sharing-Rate (BSR) als Ähnlichkeitsmaß ausgewählt. Dieses Verfahren hat bei dominanten Markern den Vorteil lediglich übereinstimmend vorhandene Fragmente in die Bewertung miteinzubeziehen. Formelbedingt ergeben absolut identische Muster eine BSR = 1, während bei keiner gemeinsamen Bande eine BSR = 0 als Minimum errechenbar ist. Die Berechnung der genetischen Ähnlichkeit erfolgt im paarweisen Vergleich von Individuen innerhalb und zwischen den untersuchten Populationen.

Die **innerhalb der untersuchten Populationen** berechneten BSR reichen von BSR = 0,686±0,040 (Bayerischer Wald) bis BSR = 0,748±0,037 (Hunsrück) (vgl. Tab. 34). Die ermittelten Ähnlichkeiten sind mit Ausnahme der Populationen von Berchtesgaden und Bayerischer Wald nicht signifikant unterscheidbar (p=n.s.) (vgl. Abb. 32). Die Individuen der übrigen untersuchten Populationen müssen anhand dieser Daten als untereinander genetisch leicht ähnlicher klassifiziert werden.

Die zwischen den Individuen **verschiedener Populationen** errechneten BSR erlauben eine Aussage über die genetische Ähnlichkeit der Populationen (Tab. 34). Mit Werten von BSR = 0,561±0,035 (Berchtesgaden/Solling) bis BSR = 0,672±0,034 (Harz/Warndt) wird deutlich, dass die Ähnlichkeiten zwischen den Individuen verschiedener Bestände signifikant geringer sind als die innerhalb der Bestände ($p<0,05$). Insbesondere die Individuen des Untersuchungsstandortes Berchtesgaden weisen geringe Ähnlichkeiten mit den übrigen Fichten auf (vgl. auch Abb. 33).

Tab. 25: Ähnlichkeitsmaße (BSR) innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	**0,692±0,043**	0,569±0,033	0,574±0,038	0,573±0,035	0,561±0,035	0,589±0,038	0,592±0,038
Bayer. Wald		**0,686±0,040**	0,641±0,032	0,585±0,030	0,639±0,032	0,628±0,033	0,601±0,031
Harz			**0,740±0,037**	0,633±0,030	0,645±0,033	0,672±0,034	0,635±0,033
Hunsrück				**0,748±0,037**	0,624±0,032	0,632±0,032	0,605±0,033
Solling					**0,728±0,036**	0,643±0,033	0,619±0,032
Warndt						**0,721±0,033**	0,659±0,033
Belau							**0,720±0,038**

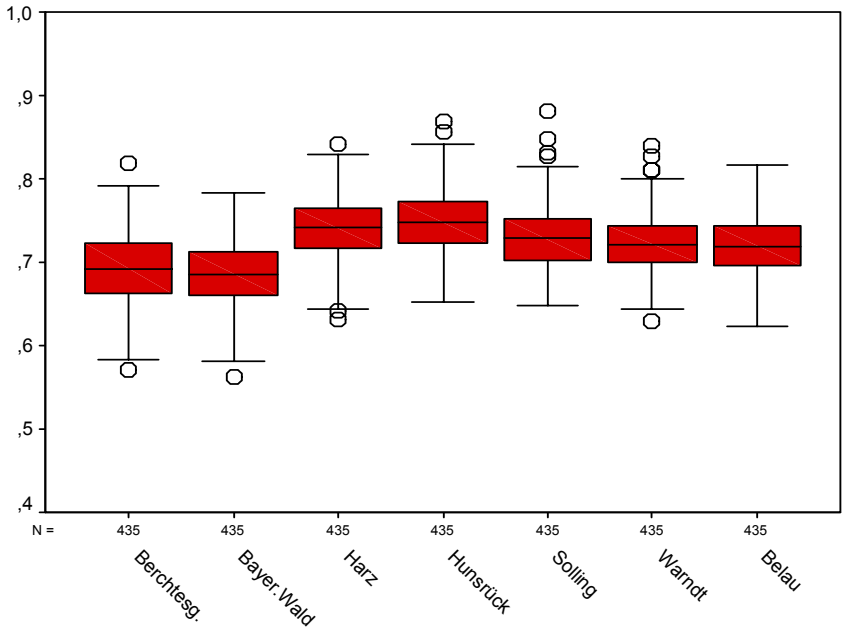


Abb. 32: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels RAPD untersuchten Bestände

Neben der Darstellung der Ähnlichkeitsmaße wurden die binären Daten zur Überprüfung der Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen einer Faktorenanalyse in der Ausprägung der **Hauptkomponentenanalyse** (HKA) unterzogen. Hierzu wurde zum einen eine HKA der binären (Roh-)Daten und zum anderen eine HKA der Allelfrequenzen errechnet.

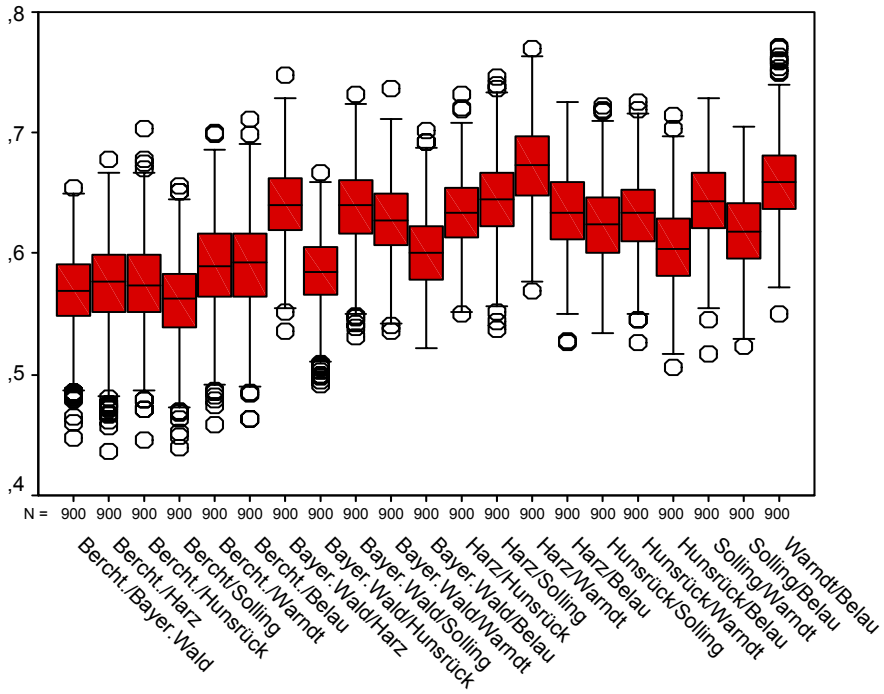


Abb. 33: **Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels RAPD untersuchten Bestände**

Zur Darstellung der binären Daten wurde die 0/1-Ähnlichkeitsmatrix mit Hilfe des Programmes SPSS 11.0 in eine Vier-Felder-Korrelationsmatrix übertragen (BÜHL & ZÖFEL 2000). Im Komponentendiagramm (vgl. Tab. 36) sowie der zugehörigen Komponentenmatrix (vgl. Anhang IX) wird deutlich, dass nach dieser Methode die Individuen von Berchtesgaden, Hunsrück und Solling außerhalb der Gesamtgruppe separiert werden, während alle anderen Populationen nicht weiter zu differenzieren sind.

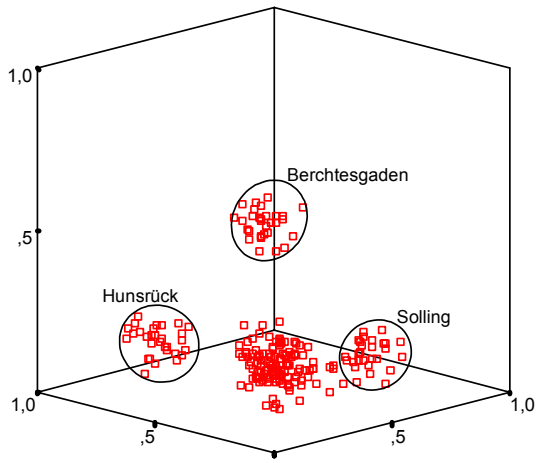


Abb. 34: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der mittels RAPD ermittelten binären Daten (Varimax rotiert) (Komponentenmatrix im Anhang IX)**

Werden die Allelfrequenzen des Nullallels (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) als Rohdaten verwendet, so zeigt sich auch unter Betrachtung der Populationsebene, dass die Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück als leicht differenziert betrachtet werden können, da sie als einzige anderen Komponenten zugeordnet werden (vgl. Abb. 35 und Tab. 26).

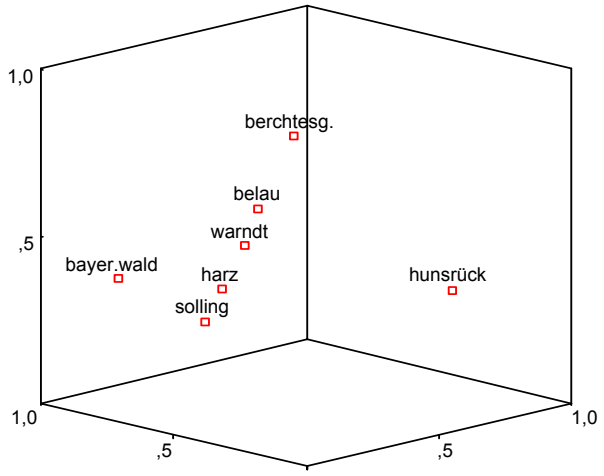


Abb. 35: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) (Varimax rotiert)**

Tab. 26: **Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen (vgl. Abb. 35) (Die Rotation ist in 6 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)**

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,292	,886	,245
Bayer. Wald	,840	,376	,131
Harz	,733	,310	,421
Hunsrück	,327	,299	,874
Solling	,779	,211	,397
Warndt	,667	,451	,434
Belau	,529	,605	,351

Neben diesen deskriptiven Verfahren wurden zur Darstellung der genetischen Ähnlichkeit der untersuchten Individuen und Populationen mit Hilfe des Programmes POPGENE 1.32 weitere deskriptive Parameter erhoben. Aus Tab. 27 wird deutlich, dass nach diesen Angaben die Population Bayerischer Wald mit einem Anteil polymorpher Fragmente von >85% als die genetisch variabelste zu definieren ist, während sich die übrigen Populationen hinsichtlich ihres Polymorphiegrades nicht wesentlich unterscheiden. Die beobachteten (na) sowie die effektiven Allelzahlen (ne) (nach KIMURA & CROW 1964) erhärten diese These, wenngleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen nachweisbar sind.

Tab. 27: Anzahl polymorpher Marker sowie beobachtete und effektive Allelzahl in den mittels RAPD untersuchten Beständen (nach NEI 1987)

	Anzahl polymorpher Marker	%	beobachtete Allelzahl (na)	effektive Allelzahl (ne)
Berchtesgaden	159	67,95	1,680 ± 0,468	1,315 ± 0,332
Bayer. Wald	201	85,90	1,859 ± 0,359	1,431 ± 0,346
Harz	158	67,52	1,675 ± 0,469	1,329 ± 0338
Hunsrück	164	70,09	1,701 ± 0,459	1,297 ± 0,325
Solling	165	70,51	1,705 ± 0,457	1,368 ± 0,350
Warndt	166	70,94	1,709 ± 0,455	1,333 ± 0,329
Belau	160	68,38	1,684 ± 0,467	1,339 ± 0,346

Die mittels POPGENE 1.32 ermittelte **genetische Identität zwischen den Populationen** wurde nach zwei verschiedenen Verfahren (NEI 1972, 1978) berechnet. Die Ergebnisse beider Verfahren sind in Tab. 28 dargestellt. Da diese allerdings lediglich geringfügig voneinander abweichen, wird in der Folge lediglich der Wert nach NEI (1972) diskutiert. Aus Tab. 28 wird deutlich, dass die Werte der genetischen Identität über alle Populationen betrachtet sehr hoch liegen. Die mit ID_{Nei} = 0,870 geringste genetische Identität wurde zwischen den Beständen Berchtesgaden und Hunsrück errechnet, während die höchsten Identitäten mit ID_{Nei} = 0,955 (Belau/Warndt) ermittelt wurden. Im Vergleich aller Populationen handelt es sich bei den Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück um die Bestände mit den durchschnittlich geringsten genetischen Identitäten, während die Individuen des Warndts die höchsten Identitäten mit allen übrigen untersuchten Fichten aufweisen.

Tab. 28: Genetische Identitäten nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen

	Berchtesgaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,919	0,897	0,870	0,894	0,915	0,924
Bayer. Wald	0,923	-	0,937	0,895	0,929	0,944	0,924
Harz	0,901	0,941	-	0,913	0,921	0,952	0,927
Hunsrück	0,900	0,899	0,916	-	0,909	0,918	0,904
Solling	0,898	0,933	0,924	0,912	-	0,932	0,914
Warndt	0,918	0,948	0,956	0,921	0,936	-	0,955
Belau	0,927	0,929	0,931	0,908	0,918	0,959	-

5.2.1.2 Genetische Distanz und Genfluss

Die genetische Distanz stellt das in der Populationsgenetik am weitesten verbreitete Maß zur Charakterisierung der Differenzierung von Populationen dar. Sie gilt als Maß für die durchschnittliche Anzahl an Mutationen, die zur Trennung von zwei Populationen führt. Ähnlich den bereits ausgeführten deskriptiven Verfahren zur Beschreibung der Ähnlichkeit oder genetischen Identität gibt es auch zur Ermittlung genetischer Distanzen zahlreiche Berechnungsgrundlagen (vgl. GOUDET et al. 1996, KALINOWSKI 2002). Die Berechnung der genetischen Distanz erfolgte zum einen durch Schätzungen nach der Vorgehensweise von LYNCH & MILLIGAN (1994) und zum anderen mittels POPGENE 1.32 nach NEI (1972, 1978).

Die Schätzungen der genetischen Distanz nach LYNCH & MILLIGAN (1994) beruhen auf der Allelfrequenz des Nullallels (vgl. Kap. 4.3.2.1). Aus Tab. 29 wird deutlich, dass keine wesentlichen Differenzierungen in den Allelfrequenzen der untersuchten Bestände nachweisbar waren. Die Berechnung der genetischen Distanz nach LYNCH & MILLGAN (1994) weist mit Werten von $D_{BS/Wa}$ = 0,030 bis $D_{Be/So}$ = 0,090 sehr geringe Distanzen zwischen den Populationen auf.

Tab. 29: Genetische Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,066	0,088	0,088	0,090	0,071	0,062
Bayer. Wald		-	0,047	0,089	0,053	0,041	0,060
Harz			-	0,071	0,062	0,032	0,057
Hunsrück				-	0,075	0,066	0,080
Solling					-	0,051	0,070
Warndt						-	0,030
Belau							-

Betrachtet man die durchschnittlichen Distanzwerte einer Population im Vergleich aller Bestände, so wird deutlich, dass für die Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück durchschnittlich leicht höhere mittlere Distanzwerte errechnet wurden, während der Warndt durch niedrigere Distanzwerte charakterisiert wird (vgl. Abb. 36 und Tab. 30).

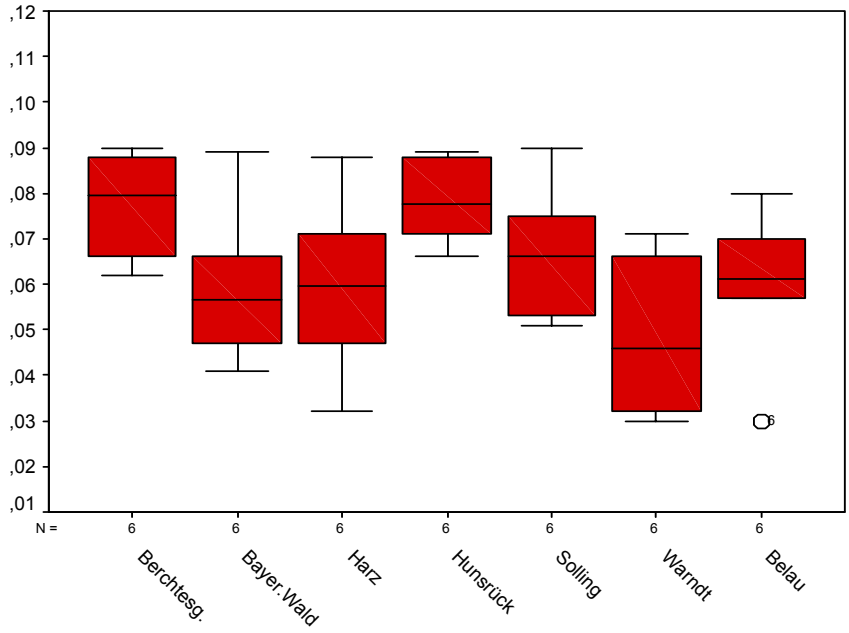


Abb. 36: **Box&Whisker-Plots der durchschnittlichen genetischen Distanzen (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen**

Tab. 30: **Überprüfung der Mittelwertsunterschiede der genetischen Distanzen (vgl. Abb. 36) mittels einfaktorieller Anova nach Duncan (Untergruppe für Alpha = 0,05)**

	n	1	2
Warndt	6	0,0485	
Bayer. Wald	6	0,0593	0,0593
Harz	6	0,0595	0,0595
Belau	6	0,0598	0,0598
Solling	6	0,0668	0,0668
Berchtesg.	6		0,0775
Hunsrück	6		0,0782
Signifikanz		0,076	0,073

Die nach diesem Verfahren errechneten Distanzmaße dienten als Grundlage für eine Clusteranalyse. In der Dendrogrammdarstellung (vgl. Abb. 37) wird deutlich, dass die beiden genannten Populationen in einer Gruppe zusammengefasst und der anderen Gruppe aus den fünf übrigen Populationen gegenübergestellt werden. Dieses Ergebnis darf aufgrund der geringen Distanzmaße allerdings nicht überbewertet werden. Da die Bestände von Berchtesgaden und Hunsrück mit $D_{Be/Hu}$ = 0,088 vergleichsweise weit voneinander differenziert zu sein scheinen, ist die gemeinsame Gruppierung im Dendrogramm durch generell hohe Distanzen der beiden Populationen im Vergleich zu den übrigen Populationen zu begründen. Aus demselben Grund wird die Population des Warndt – mit durch-

schnittlich geringen genetischen Distanzen zu allen anderen untersuchten Beständen – intermediär der zweiten Gruppe zugeordnet.

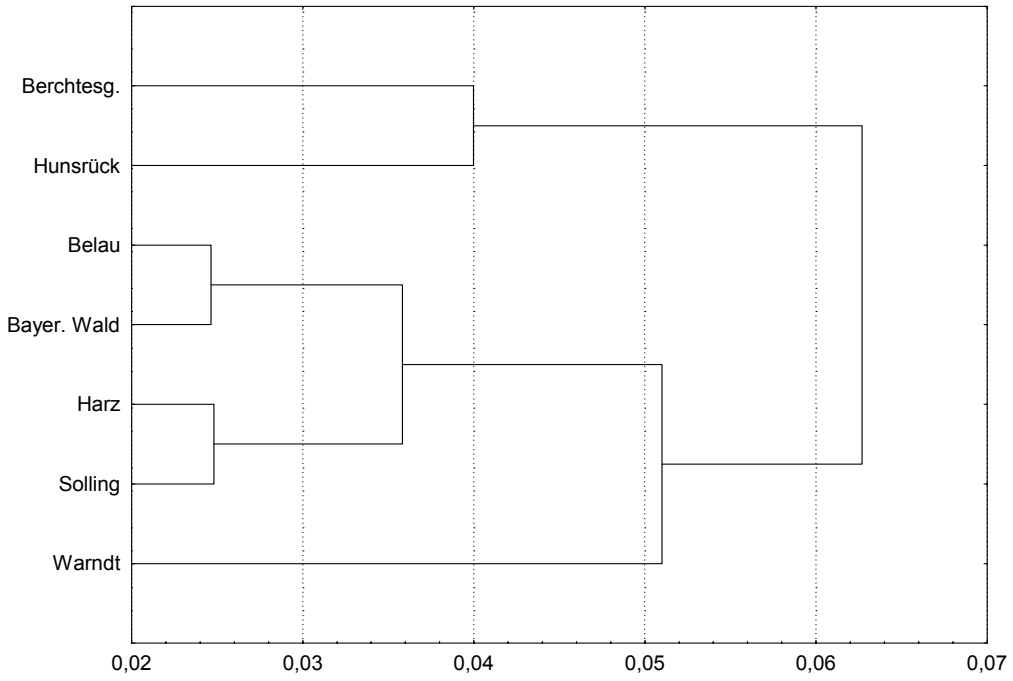


Abb. 37: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen (UPGMA, Eukl. Distanzen)

Die mittels POPGENE 1.32 zusätzlich errechneten Maße der genetischen Distanz liegen in vergleichbarer Größenordnung – auch sie zeigen lediglich geringe genetische Differenzierungen zwischen den untersuchten Populationen an (vgl. Tab. 31). Wie bereits erwähnt, wurde die genetische Distanz nach zwei unterschiedlichen Verfahren berechnet (NEI 1972, 1978). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Ergebnisse der beiden Verfahren nur unwesentlich unterscheiden und die Abstände zwischen den Populationen nach beiden Verfahren identisch sind, werden – wie bei der genetischen Identität nach NEI (1972, 1978) – in der Folge lediglich die Ergebnisse nach NEI (1972) diskutiert. Auch hier zeigen die Individuen der Population Warndt die durchschnittlich geringsten genetischen Differenzierungen, während für Berchtesgaden und Hunsrück die höchsten Distanzmaße errechnet werden (vgl. Tab. 31).

Die Dendrogrammdarstellung der Clusteranalyse weist hinsichtlich der Gruppierung der untersuchten Populationen ein annähernd identisches Bild zu den Distanzmaßen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) auf (vgl. Abb. 38).

Tab. 31: Genetischen Distanzen nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Populationen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,085	0,108	0,109	0,112	0,089	0,079
Bayer. Wald	0,080	-	0,065	0,111	0,074	0,058	0,065
Harz	0,105	0,061	-	0,091	0,083	0,049	0,075
Hunsrück	0,105	0,106	0,087	-	0,096	0,086	0,101
Solling	0,108	0,069	0,079	0,092	-	0,070	0,090
Warndt	0,086	0,053	0,045	0,082	0,066	-	0,046
Belau	0,076	0,074	0,072	0,097	0,086	0,042	-

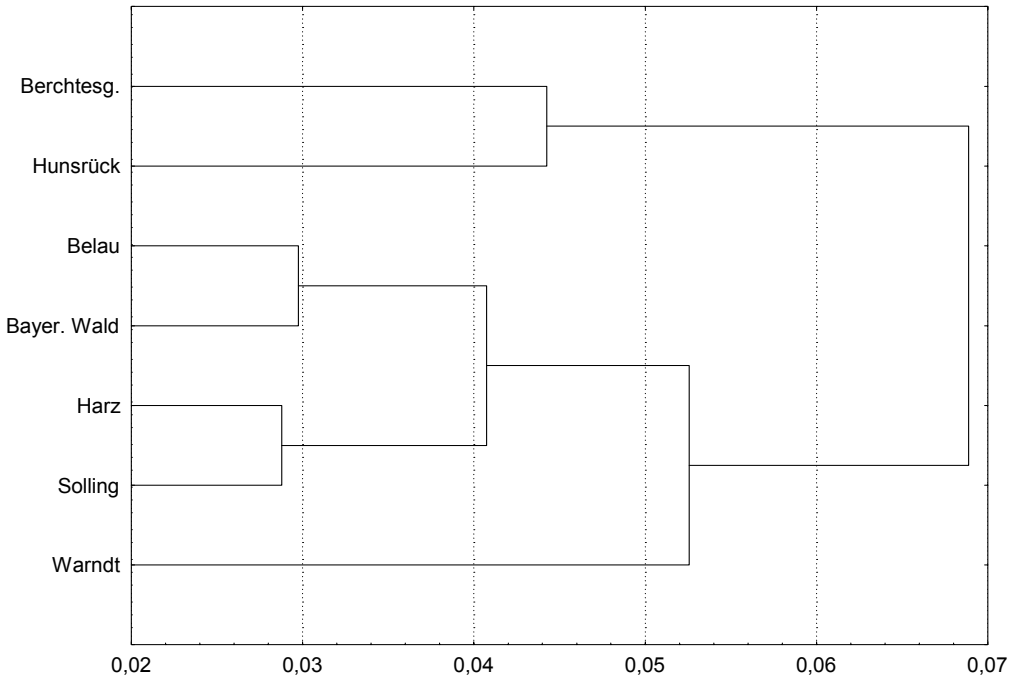


Abb. 38: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen (UPGMA, Eukl. Distanzen)

Durch das mittels TREEVIEW 1.66 (PAGE 2001) erstellte Dendrogramm werden allerdings die tatsächlichen Verhältnisse besser erklärt (vgl. Abb. 39). Durch die Darstellungsweise der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) über einen *unrooted tree* wird deutlich, dass sich die Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück nur auf einem sehr geringen Niveau ähnlicher sind. Zum einen sind die Abstände zwischen den einzelnen Gruppen sehr klein und zum anderen sind die gemessenen Abstände hauptsächlich auf die Astlängen innerhalb der Populationen zurückzuführen.

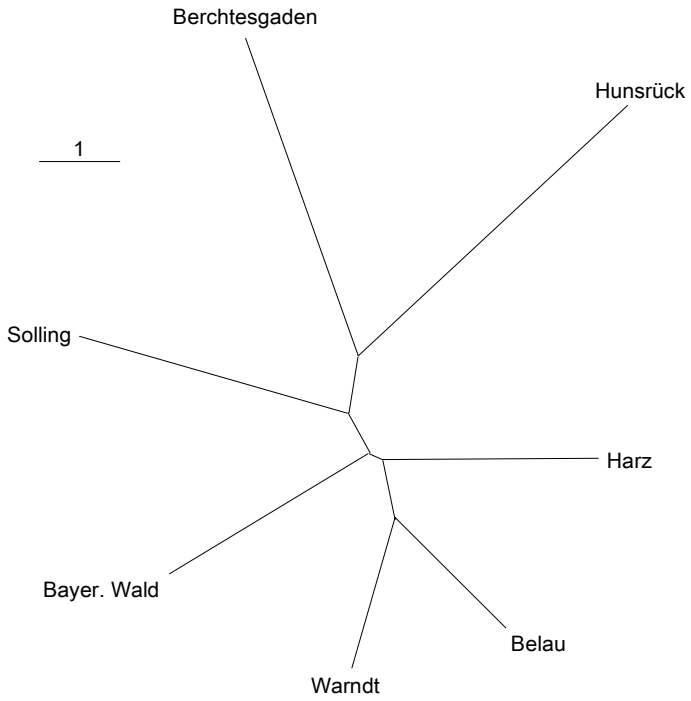


Abb. 39: ***Unrooted tree*** **der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen (UPGMA, modifiziert nach *Neigbor*-Methode mittels PHYLIP 3.5)**

Hinsichtlich der Analyse der genetischen Distanzen der mittels RAPD gewonnenen Daten kann zusammenfassend festgehalten werden, dass zwischen den Populationen lediglich geringe genetische Differenzierungen nachzuweisen sind. Auf diesem geringen Differenzierungsniveau können nur die Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück von den übrigen Populationen als geringfügig distanziert betrachtet werden.

Da eine Differenzierung der Populationen über die Distanzmaße nicht möglich ist, wurde zusätzlich überprüft, ob eine Differenzierung über die geographische Entfernung gegeben ist (*isolation by distance*-Modell). Grundlage dieses Modells ist, dass mit zunehmender geographischer Entfernung die Wahrscheinlichkeit des Genaustauschs sinkt und deshalb die Maße der genetischen Distanz ansteigen. Wie aus Abb. 40 hervorgeht ist allerdings mit einem Bestimmtheitsmaß von R^2= 0,0007 kein Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz feststellbar.

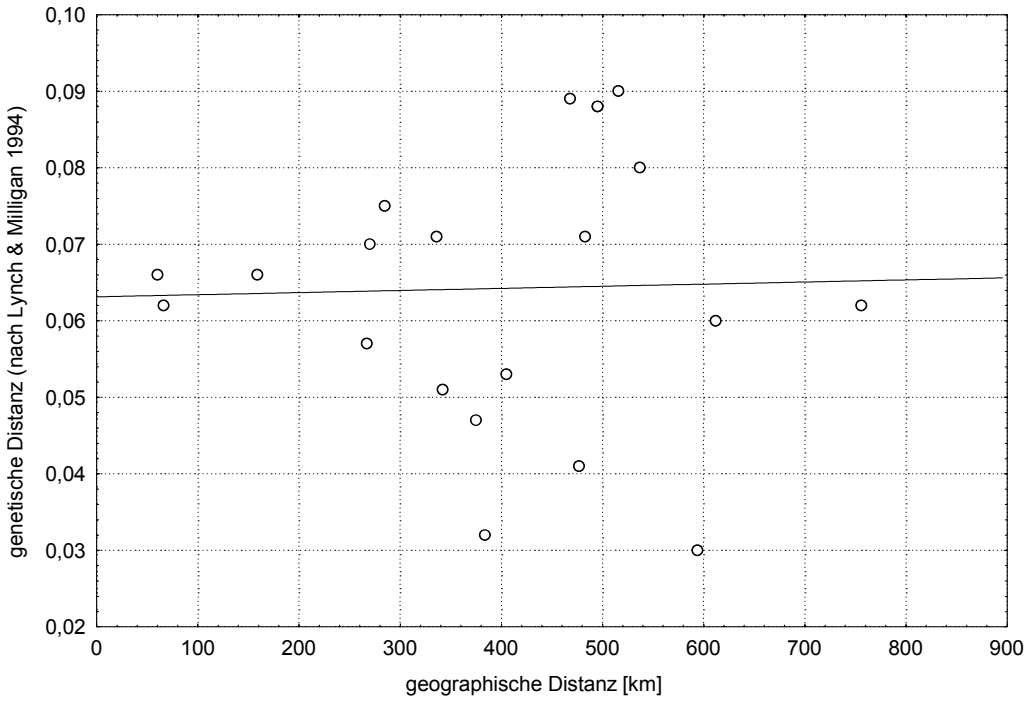


Abb. 40: Regressionsanalyse zur Überprüfung des *isolation by distance*-Modells mit RAPD-Distanz-Daten nach LYNCH & MILLIGAN (1994) (y = 3E-06*x + 0,0631)

Entsprechend den hier vorgestellten Ergebnissen sind keine wesentlichen genetischen Distanzen zwischen den untersuchten Populationen nachweisbar. Eine Differenzierung der Bestände ist in der Einzelbetrachtung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde zusätzlich überprüft, ob **Differenzierungen zwischen Gruppen von Populationen** auftreten. Unter der Annahme die Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz als die Bestände, die im natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte lokalisiert sind, zusammenfassen zu können, wurde folgende Hypothese aufgestellt: Da es sich bei diesen drei Populationen um Bestände handelt, die innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte liegen und deshalb vermutlich größtenteils aus ortsangepasster Naturverjüngung aufgebaut bzw. möglicherweise autochthonen Ursprungs sind, müssten sie als Gruppe gegenüber den aus forstlichem Saat- bzw. Pflanzgut aufgebauten Beständen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes abgrenzbar sein.

Um diese Annahme zu überprüfen wurden zum einen **genetische Distanzen zwischen** den zu den genannten **Gruppen** zusammengefassten Individuen und zum anderen Genflussschätzungen zwischen den Gruppen vorgenommen. Sowohl das nach dem Verfahren von LYNCH & MILLIGAN (1994) errechnete Distanzmaß (H_{jk} = 0,015) als auch die nach NEI (1972 bzw. 1978) ermittelten Werte (Ds = 0,020 bzw. Ds = 0,018) lassen lediglich äußerst geringe Diifferenzierungen zwischen den beiden Gruppen vermuten.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe des Verfahrens nach NEI (1987) der **Genfluss** zwischen den angenommenen Gruppen entsprechend Nm* = 0,5x(1-Gst)/Gst über Gst geschätzt (vgl. MCDERMOTT

& MCDONALD 1993). Mit Nm* = 1,619 bis Nm* = 1,773 wurden vergleichsweise hohe Raten ermittelt. Der Genfluss zwischen den Populationen, die innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte liegen (Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz) scheint dabei in geringem Ausmaß höher zu sein, als zwischen den übrigen Standorten.

Tab. 32: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen (RAPD)

	n	polys	%	Ht	Hs	GST	Nm*
natürliches Verbr.-gebiet	90	221	94,44	0,280±0,028	0,219±0,018	0,220	1,773
außerhalb nat. Verbr.-geb.	120	215	91,88	0,269±0,021	0,205±0,018	0,236	1,619
alle	210	210	96,15	0,286±0,027	0,274±0,025	0,229	1,684

5.2.1.3 Genetische Diversität

Neben der Kenntnis der genetischen Ähnlichkeit und der genetischen Distanz zwischen den untersuchten Populationen ist es zur Erläuterung der gewonnen Daten wichtig, das Maß der genetischen Variabilität innerhalb einer untersuchten Population zu kennen. Als Variabilitätsmaß wurde die genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) sowie nach NEI (1987) herangezogen.

Wie in Kap. 6.1.4 noch näher erläutert wird, sind die ermittelten Ergebnisse in hohem Maße primerabhängig. Die nach LYNCH & MILLIGAN (1994) errechneten genetischen Diversitäten der untersuchten Bestände werden deshalb in Tab. 33 über die einzelnen Primer getrennt dargestellt. Aus dieser Tabelle geht hervor, dass mit den Primern A12, B05 und C628 durchschnittlich hohe Diversitäten ermittelt wurden, während insbesondere durch die Primer B13, D12 und D17 homogenere Verteilungen angezeigt werden.

In der Einzelbetrachtung der Primer stellt der untersuchte Bestand des Bayerischen Waldes die diverseste Population dar, da sie in fünf Fällen über der Schwankungsbreite liegende Diversitäten anzeigt. Während nach dieser Vorgehensweise der Bestand des Solling ebenfalls als vergleichsweise divers klassifiziert werden muss, ist die Berchtesgadener Population die deutlich homogenste.

In der Gesamtbetrachtung aller 234 RAPD-Marker wird dieses Ergebnis hinsichtlich der genetischen Variabilität der untersuchten Populationen bestätigt (vgl. Tab. 34). Aus den Ergebnissen der Berechnung der genetischen Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) zwischen den paarweise verglichenen Beständen wird darüber hinaus deutlich, dass die Variabilität dieser angenommenen Gesamtpopulationen in den meisten Fällen deutlich höher ist als die der Einzelpopulationen.

Tab. 33: Genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) innerhalb der mittels RAPD untersuchten Bestände (aufgegliedert nach RAPD-Primern)

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	MW
A12	0,285	0,293	0,154	0,209	0,260	0,236	0,303	0,249±0,053
B05	0,263	0,245	0,213	0,246	0,225	0,249	0,213	0,236±0,019
B09	0,139	0,269	0,193	0,191	0,200	0,215	0,224	0,204±0,039
B13	0,137	0,180	0,188	0,226	0,059	0,190	0,156	0,162±0,053
B14	0,192	0,244	0,188	0,050	0,194	0,217	0,242	0,190±0,066
B16	0,188	0,146	0,293	0,219	0,227	0,270	0,254	0,228±0,050
D06	0,238	0,279	0,229	0,169	0,233	0,157	0,159	0,209±0,047
D12	0,083	0,366	0,152	0,163	0,167	0,099	0,024	0,151±0,108
D17	0,108	0,224	0,063	0,146	0,288	0,140	0,011	0,140±0,094
D19	0,142	0,360	0,223	0,197	0,313	0,192	0,200	0,232±0,076
C203	0,240	0,285	0,199	0,184	0,196	0,228	0,251	0,226±0,036
C452	0,149	0,219	0,229	0,201	0,188	0,160	0,189	0,191±0,029
C479	0,101	0,192	0,203	0,221	0,271	0,226	0,274	0,213±0,058
C628	0,261	0,253	0,221	0,185	0,234	0,228	0,264	0,235±0,028

Tab. 34: Genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	**0,181**	0,242	0,223	0,216	0,231	0,219	0,217
Bayer. Wald		**0,253**	0,247	0,252	0,259	0,244	0,252
Harz			**0,201**	0,221	0,235	0,216	0,226
Hunsrück				**0,187**	0,231	0,220	0,225
Solling					**0,219**	0,232	0,239
Warndt						**0,203**	0,217
Belau							**0,206**

Dass es sich anhand der verwendeten Marker bei der Population des Bayerischen Waldes um die genetisch diverseste zu handeln scheint, wird auch durch die mittels POPGENE 1.32 durchgeführte Berechnung der genetischen Diversität nach NEI (1987) bzw. des Shannon-Information-Index (nach LEWONTIN 1972) deutlich. Auch nach diesem Verfahren sind die Bestände des Hunsrück und der Berchtesgadener Alpen als die genetisch am wenigsten diverse bzw. als die genetisch homogensten zu charakterisieren.

Tab. 35: ***Single-Population Descriptive Statistics*** **der mittels RAPD untersuchten Bestände (nach NEI 1987)**

	Anzahl polymorpher Marker	%	Genetische Diversität nach NEI (1987)	Shannons Information Index
Berchtesgaden	159	67,95	0,195±0,181	0,302±0,258
Bayerischer Wald	201	85,90	0,260±0,175	0,398±0,237
Harz	158	67,52	0,201±0,184	0,311±0,262
Hunsrück	164	70,09	0,186±0,176	0,292±0,249
Solling	165	70,51	0,223±0,185	0,340±0,262
Warndt	166	70,94	0,207±0,177	0,322±0,253
Belau	160	68,38	0,207±0,184	0,318±0,261

Wie aus den bisherigen Ergebnissen deutlich wurde, sind sowohl die einzelnen Populationen als auch die im paarweisen Vergleich zusammengefassten Populationen durch eine hohe genetische Diversität gekennzeichnet. Mit Hilfe des Programmes ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000) wurde deshalb in einem weiteren Schritt überprüft, auf welchen der beiden Faktoren – Variation innerhalb der Populationen, Variation zwischen Populationen – die ermittelte genetische Variabilität hauptsächlich zurückgeführt werden kann.

Wie aus Tab. 36 hervorgeht ist die genetische Variation der untersuchten Fichten im Wesentlichen (ca. 73%) auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen. Die restliche genetische Variabilität kann durch Unterschiede zwischen den Populationen erklärt werden (ca. 27%). Die zusätzlich errechnete Variation zwischen den angenommenen Gruppen – Individuen bzw. Populationen innerhalb bzw. außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte – ist im Vergleich dazu vernachlässigbar (0,02%).

Tab. 36: **Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels RAPD untersuchten Gruppen**

	FG	SQ	Varianz (SQ/FG)	Varianz (%)	p-Wert	Fixation Index
zwischen Gruppen	1	308,8	0,008 Va	0,02	< 0,001	Φ_{CT} = 0,00024
zw. Pop. innerhalb der Gruppen	5	1539,6	9,412 Vb	26,92	< 0,001	Φ_{SC} = 0,26926
innerhalb der Populationen	203	5185,5	25,544 Vc	73,06	< 0,001	Φ_{ST} = 0,26944
gesamt	209	7033,9	34,964	-	-	-

5.2.1.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der populationsgenetischen Untersuchung der Fichtenbestände mittels RAPD-PCR wurden mit 14 RAPD-Primern insgesamt 234 Marker ermittelt, von denen 225 als polymorph und somit als differenzierend eingestuft wurden. Hinsichtlich der Überprüfung der Homogenität (BSR) der untersuchten Bestände wurde deutlich, dass sich die Indivdiduen der **Populationen von Berchtesgaden und Bayerischer Wald** (BSR = 0,692±0,043 bzw BSR = 0,686±0,040) unähnlicher sind und deswegen die Bestände genetisch vergleichsweise **inhomogener** sind. Dies führt u.a. auch dazu, dass im paarweisen Vergleich der Populationen (BSR, sowie genetische Identität nach NEI 1972, 1978) gerade der **Bestand von Berchtesgaden geringe Übereinstimmungen mit den übrigen Population** aufweist. Während durch die HKA die Individuen von Berchtesgaden, Hunsrück und z.T. auch Solling von den übrigen, zu einer Gruppe zusammengefassten Individuen abgetrennt werden, zeigt die Berechnung der **genetischen Distanz** (nach LYNCH & MILLIGAN 1994, sowie nach NEI 1972, 1978) zwischen den Populationen **nur sehr geringe Differenzierungen** ($D_{Ø}$ = 0,064±0,018). Aber auch hier weisen die **Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück die höchsten Distanzmaße** (D_{Be} = 0,078±0,013 bzw. D_{Hu} = 0,078±0,009) im paarweisen Vergleich der Bestände auf. Für die Warndt-Population (D_{Wa} = 0,049±0,017) wurden die geringsten genetischen Distanzen errechnet. Wenn in der Dendrogramm-Darstellung der Clusteranalyse auch die Populationen von Berchtesgaden und Hunsrück separat gruppiert werden, so muss anhand der sehr niedrigen Distanzmaße geschlossen werden, dass anhand dieser Daten keine wesentliche genetische Distanz zwischen den untersuchten Populationen nachweisbar ist und sich die ermittelten Differenzierungen lediglich auf einem sehr geringen Niveau bewegen. In diesem Zusammenhang konnte auch **kein Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz** (R^2 = 0,0007) nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass sich die Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte (Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz) durch ihre Entwicklungsgeschichte und deswegen durch ihre genetische Zusammensetzung unterscheiden und sich deswegen zu einer Gruppe zusammenfassen lassen, wurde überprüft, ob sich die Genflussrate innerhalb dieser Gruppe und im Vergleich zu der Gruppe der Populationen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes unterscheiden. Es konnte festgestellt werden, dass **innerhalb der „natürlichen" Gruppe höhere Genflussraten** (Nm* = 1,773) auftraten als zwischen den Gruppen (Nm* = 1,619). Als weiteres populationsgenetisches Charakteristikum wurde die genetische Diversität (nach LYNCH & MILLIGAN 1994, nach NEI 1987, nach SHANNON 1949) innerhalb bzw. zwischen Populationen berechnet. Wie bereits anhand der Anzahl polymorpher Marker deutlich wurde, handelt es sich – im Gegensatz zu den Ergebnissen des angelegten Ähnlichkeitsmaßes – bei der **Population des Bayerischen Waldes** um die **genetisch diverseste Population** ($\hat{H}_{BW}$ = 0,253). Während auch noch die Solling-Population als genetisch divers klassifiziert werden kann, sind die Standorte Berchtesgaden ($\hat{H}_{Be}$ = 0,181) und Hunsrück ($\hat{H}_{Hu}$ = 0,187) mit vergleichsweise homogenen Beständen ausgestattet. Die abschließend vorgenommene Untersuchung der Ursache der genetischen Variation zeigte auf, dass die **Variation im Wesentlichen auf die Unterschiede innerhalb der Populationen (ca. 73%) zurückzuführen** sind, während der Rest (ca. 27%) durch die Variation zwischen den

Populationen erklärt werden kann. Die **Variation zwischen den angenommenen Gruppen** ist in diesem Zusammenhang **vernachlässigbar** (0,02%).

5.2.2 ISSR-PCR

Im Rahmen dieser populationsgenetischen Analyse wurden sieben ISSR-Primer auf ihre Eignung zur Differenzierung der untersuchten Individuen getestet. Da bisher keine Untersuchungen zur ISSR-Analyse mit *Picea abies* durchgeführt wurden, wurden die in Kap. 4.2.4 beschriebenen Markersysteme verwendet. Lediglich mit vier der sieben Primer konnten reproduzierbare Amplifkationen erreicht werden. Mit den Primern $(GA)_9T$, $(CA)_6RY$, $(CA)_6RG$ und $(CA)_6(AC)$ wurden insgesamt 36 DNA-Fragmente amplifiziert, von denen 33 als polymorphe ISSR-Marker eingestuft wurden, während drei Marker in allen 210 untersuchten Individuen vorhanden waren (vgl. Tab. 37).

Tab. 37: Markerzahl (n_M) und Anzahl polymorpher Marker (n_p), aufgeschlüsselt nach verwendeten ISSR-Primern

	$(GA)_9T$	**$(CA)_6RY$**	**$(CA)_6RG$**	**$(CA)_6(AC)$**	Summe
n_M	10	8	10	8	36
n_p	10	7	9	7	33

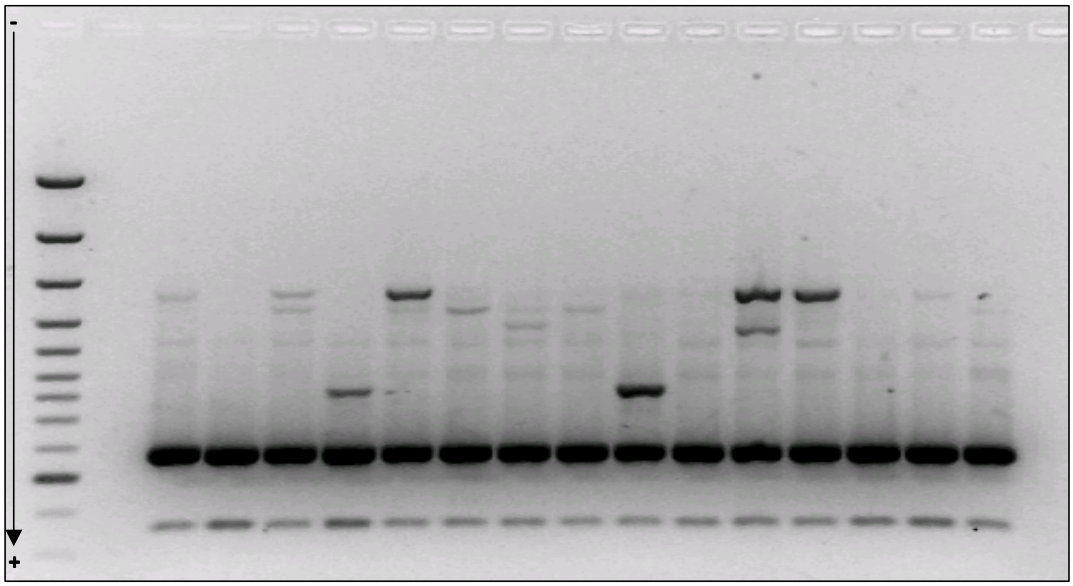


Abb. 41: Beispielhafte Darstellung eines ISSR-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Harz mit Primer $(CA)_6RG$ (links: Fragmentlängenstandard)

Populationsspezifische Marker bzw. **Markerkombinationen**, d.h. DNA-Fragmente, die nur in einem der untersuchten Bestände ermittelt wurden bzw. kombiniert auftraten, konnten auch nach dieser Vorgehensweise nicht nachgewiesen werden. Eine Differenzierung der Bestände anhand eines einzelnen Markers war somit nicht möglich. Deshalb wurden um Ähnlichkeiten bzw. Differenzierungen zwischen den Individuen und Populationen zu ermitteln auch hier die oben bereits beschriebenen deskriptiven und populationsgenetischen Parameter bestimmt.

5.2.2.1 Genetische Ähnlichkeit

Zur Ermittlung der genetischen Ähnlichkeit der Individuen an einem Standort wurde die **BSR innerhalb der Populationen** berechnet. Diese reichen von BSR = 0,688±0,040 (Solling) bis BSR = 0,789±0,055 (Bayerischer Wald), wobei der Wert der Solling-Population als einziger signifikant niedriger ist ($p<0,05$) (vgl. Tab. 38 und Abb. 42). Die übrigen untersuchten Populationen zeichnen sich durch etwas höhere Ähnlichkeitsmaße aus und müssen anhand dieser Daten als genetisch homogener charakterisiert werden.

Die zwischen den Individuen **verschiedener Populationen** errechneten BSR erlauben eine Aussage über die genetische Ähnlichkeit der Populationen (vgl. Tab. 38). Mit Werten von BSR = 0,577±0,082 (Harz/Solling) bis BSR = 0,741±0,069 (Berchtesgaden/Bayerischer Wald) wird deutlich, dass – mit Ausnahme der Gruppe aus Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz – die Ähnlichkeiten zwischen den Individuen verschiedener Bestände signifikant geringer sind als die innerhalb der Bestände ($p<0,05$). Insbesondere die Individuen der Untersuchungsstandorte Harz und Solling weisen etwas geringere Ähnlichkeiten mit den übrigen Fichten auf (vgl. auch Abb. 43).

Tab. 38: Ähnlichkeitsmaße (BSR) innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	**0,768±0,094**	0,741±0,069	0,731±0,070	0,633±0,062	0,590±0,081	0,668±0,070	0,610±0,076
Bayer. Wald		**0,789±0,055**	0,735±0,061	0,678±0,058	0,627±0,076	0,714±0,057	0,662±0,070
Harz			**0,788±0,063**	0,604±0,062	0,577±0,082	0,655±0,068	0,591±0,067
Hunsrück				**0,761±0,059**	0,699±0,074	0,699±0,060	0,684±0,070
Solling					**0,688±0,076**	0,648±0,076	0,691±0,072
Warndt						**0,766±0,061**	0,688±0,063
Belau							**0,757±0,063**

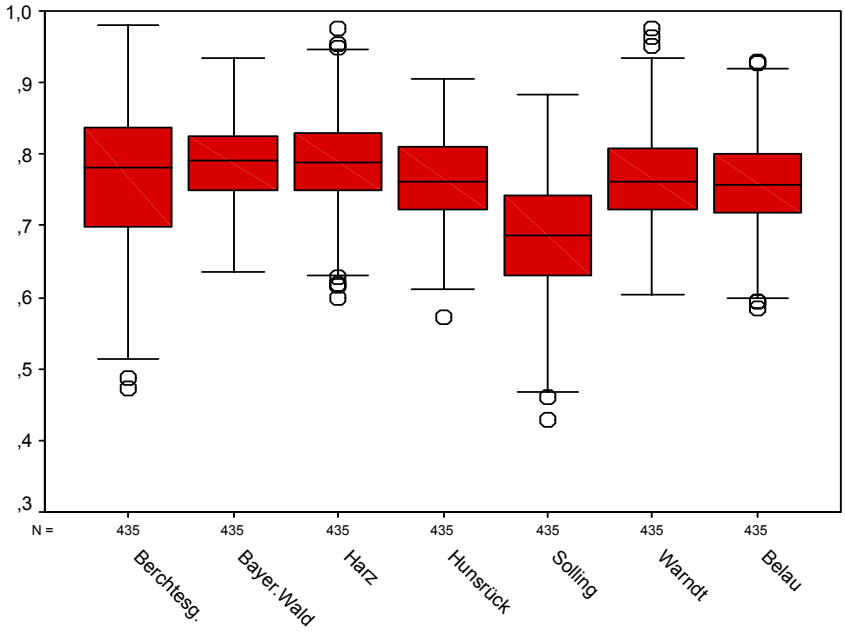


Abb. 42: **Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels ISSR untersuchten Bestände**

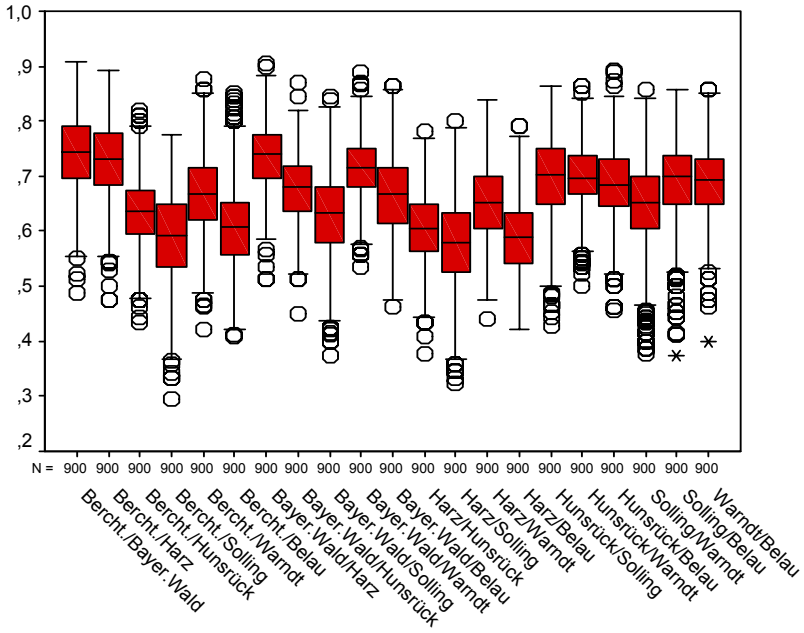


Abb. 43: **Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels ISSR untersuchten Bestände**

Neben der Darstellung der Ähnlichkeitsmaße wurden auch die mittels ISSR ermittelten Rohdaten bzw. die daraus abgeleiteten Allelfrequenzen einer Faktorenanalyse (HKA) unterzogen. Die Vorgehensweise entspricht der bereits in Kap. 5.2.1.1 beschriebenen Methodik (vgl. auch Kap. 4.3.1.3). Im

Komponentendiagramm (vgl. Abb. 44) sowie in der zugehörigen Komponentenmatrix (vgl. Anhang X) wird deutlich, dass nach dieser Methode die Populationen nicht zu differenzieren sind und in einer Gruppe zusammengefasst werden.

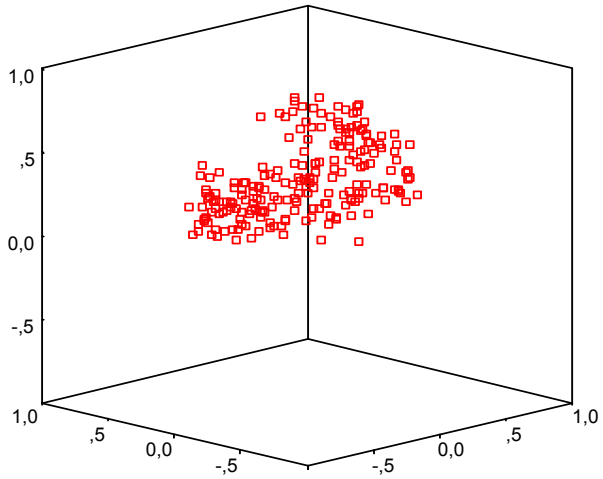


Abb. 44: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der mittels ISSR ermittelten binären Daten (Varimax rotiert) (Komponentenmatrix im Anhang X)

Werden die Allelfrequenzen des Nullallels (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) als Rohdaten verwendet, so zeigt sich, dass auch auf Populationsebene lediglich eine schwache Differenzierung erreicht wird (vgl. Abb. 45). Aus der zugehörigen Komponentenmatrix kann abgelesen werden, dass die Populationen des Bayerischen Wald, des Harzes und aus dem Warndt einer Komponente zugeordnet werden, während die Populationen von Hunsrück und Solling sowie – etwas abgeschwächt – die von Berchtesgaden und Belau in eigene Gruppen eingeordnet werden (vgl. Tab. 39).

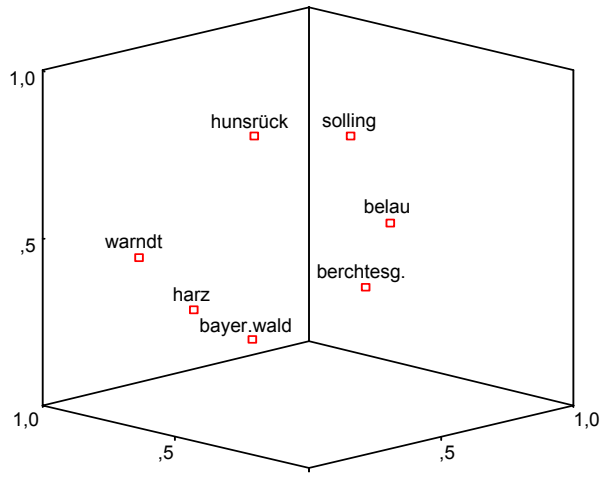


Abb. 45: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) (Varimax rotiert)

Tab. 39: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen (vgl. Abb. 45) (Die Rotation ist in 8 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,526	,303	,746
Bayer. Wald	,759	,136	,550
Harz	,815	,248	,387
Hunsrück	,357	,897	,152
Solling	,157	,905	,319
Warndt	,828	,437	,195
Belau	,367	,538	,675

Neben diesen deskriptiven Verfahren wurde zur Darstellung der genetischen Ähnlichkeit der untersuchten Individuen und Populationen weitere Parameter erhoben. Aus Tab. 40 wird deutlich, dass sich nach diesen Angaben die untersuchten Populationen hinsichtlich ihres Polymorphiegrades nicht wesentlich unterscheiden.

Tab. 40: Anzahl polymorpher Marker sowie beobachtete und effektive Allelzahl in den mittels ISSR untersuchten Beständen (nach NEI 1987)

	Anzahl poly-morpher Marker	%	Anzahl beobachteter Allele (na)	Anzahl effektiver Allele (ne)
Berchtesgaden	29	80,56	1,806±0,401	1,451±0,344
Bayer. Wald	26	72,22	1,722±0,454	1,429±0,358
Harz	26	72,22	1,722±0,454	1,380±0,364
Hunsrück	29	80,56	1,806±0,401	1,421±0,341
Solling	30	83,33	1,833±0,378	1,501±0,338
Warndt	25	69,44	1,694±0,467	1,517±0,411
Belau	30	83,33	1,833±0,378	1,437±0,360

Die mittels POPGENE 1.32 ermittelte **genetische Identität zwischen den Populationen** wurde auch hier nach zwei verschiedenen Verfahren (NEI 1972, 1978) berechnet, wenngleich auch in der Folge lediglich der Wert nach NEI (1972) diskutiert wird (vgl. Kap. 5.2.1.1). Die Ergebnisse beider Verfahren sind in Tab. 41 dargestellt. Aus dieser Tabelle geht hervor, dass die Werte der genetischen Identität über alle Populationen betrachtet vergleichsweise hoch liegen, zum Teil aber deutliche Unterschiede aufweisen. Die mit ID_{Nei} = 0,724 geringste genetische Identität wurde zwischen den Beständen Harz und Belau errechnet, während die höchsten Identitäten mit ID_{Nei} = 0,947 für Hunsrück und Solling ermittelt wurden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass insbesondere die Bestände innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte (Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz) durch hohe genetische Identitäten untereinander charakterisiert sind.

Tab. 41: Genetische Identitäten nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,926	0,918	0,778	0,769	0,819	0,745
Bayer. Wald	0,931	-	0,907	0,833	0,810	0,897	0,812
Harz	0,923	0,912	-	0,740	0,759	0,798	0,724
Hunsrück	0,782	0,838	0,744	-	0,947	0,881	0,874
Solling	0,774	0,815	0,763	0,953	-	0,856	0,940
Warndt	0,825	0,885	0,802	0,887	0,862	-	0,866
Belau	0,750	0,816	0,728	0,879	0,946	0,871	-

5.2.2.2 Genetische Distanz und Genfluss

Die Berechnung der genetischen Distanz erfolgte sowohl durch Schätzungen nach der Vorgehensweise von LYNCH & MILLIGAN (1994) als auch nach der Berechnungsgrundlage von NEI (1972, 1978) mittels POPGENE 1.32.

Die Berechnung der genetischen Distanz nach LYNCH & MILLGAN (1994) weist mit Werten bis $D_{Be/BS}$ = 0,233 im Vergleich zu den Distanzmaßen der RAPD-Analyse sehr hohe Distanzen zwischen den Populationen auf. Auch hier muss darauf hingewiesen werden, dass lediglich zwischen den Beständen von Hunsrück und Solling bzw. zwischen den Populationen des natürlichen Verbreitungsgebietes geringe Distanzen bestehen.

Tab. 42: Genetische Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,126	0,053	0,225	0,183	0,160	0,233
Bayer. Wald		-	0,064	0,158	0,178	0,127	0,166
Harz			-	0,190	0,129	0,145	0,192
Hunsrück				-	0,040	0,165	0,100
Solling					-	0,133	0,066
Warndt						-	0,124
Belau							-

Die Dendrogrammdarstellung der Clusteranalyse visualisiert die Distanzmaße in der Form, dass die Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz zusammengeclustert werden und den

übrigen Beständen gegenübergestellt werden (vgl. Abb. 46). Dies bedeutet, dass die oben als „natürlich“ definierte Populationen, nämlich die Populationen, die innerhalb des Verbreitungsgebietes der Fichte lokalisiert sind, anhand der ISSR-Distanzmaße untereinander deutlich geringere Differenzierungen aufweisen als zu den sog. „künstlichen“ Populationen.

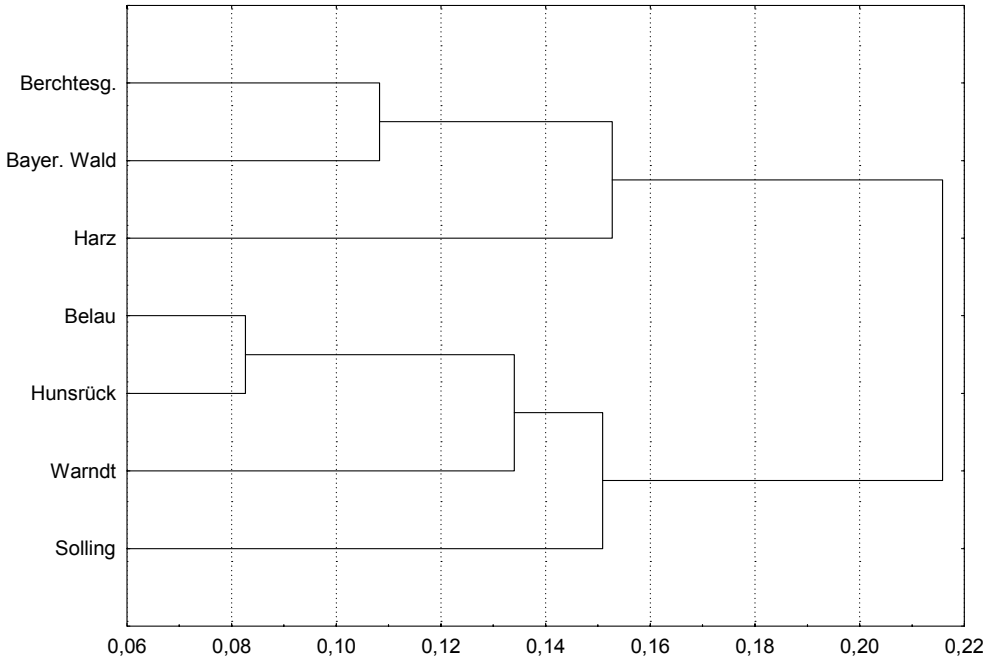


Abb. 46: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

Die mittels POPGENE 1.32 zusätzlich errechneten Maße der genetischen Distanz liegen in vergleichbarer Größenordnung. Auch sie zeigen lediglich geringe genetische Differenzierungen zwischen den bereits genannten Populationen, lassen aber gleichzeitig auch hohe Differenzierungen zwischen den übrigen Populationen vermuten (vgl. Tab. 43). Insbesondere die Population des Harzes ist durch hohe Distanzwerte gegenüber den übrigen Populationen gekennzeichnet.

Die Dendrogrammdarstellung weist hinsichtlich der Gruppierung der untersuchten Populationen ein ähnliches Bild zu den Distanzmaßen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) auf (vgl. Abb. 47). Allerdings führen nach diesem Verfahren die geringen Distanzmaße zwischen Solling und Belau zu einer differenzierteren Aufteilung der Gruppe der Populationen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte.

Tab. 43: Genetische Distanzen nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,077	0,086	0,251	0,263	0,200	0,294
Bayer. Wald	0,071	-	0,098	0,183	0,211	0,129	0,209
Harz	0,080	0,092	-	0,301	0,276	0,227	0,323
Hunsrück	0,245	0,177	0,296	-	0,054	0,127	0,135
Solling	0,256	0,205	0,270	0,048	-	0,156	0,062
Warndt	0,193	0,122	0,221	0,120	0,149	-	0,144
Belau	0,288	0,203	0,318	0,129	0,056	0,138	-

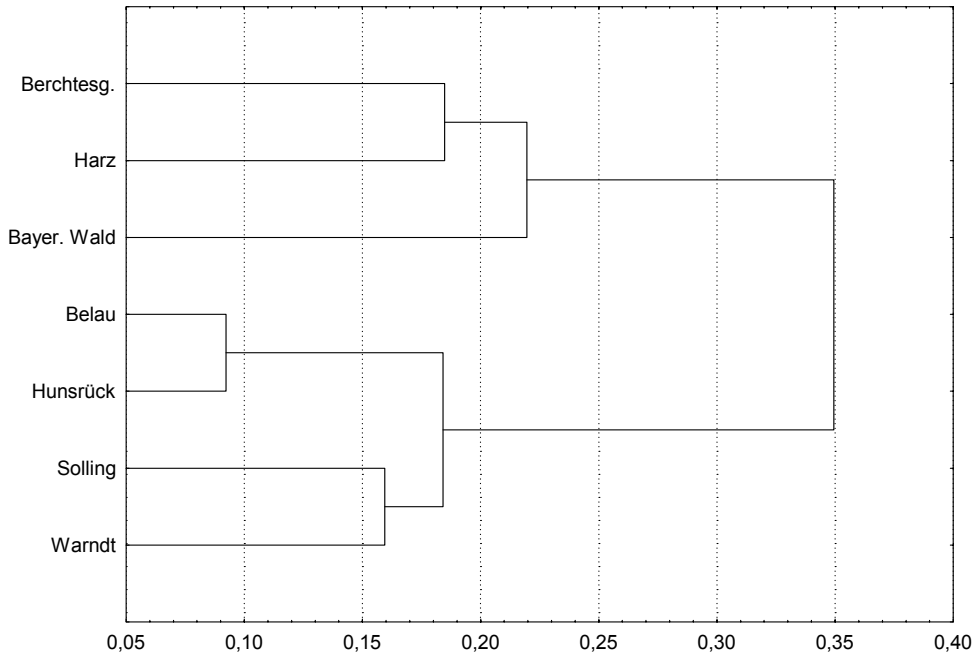


Abb. 47: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

Diese Auftrennung in zwei Gruppen wird durch die mit Hilfe des Programmes TREEVIEW 1.66 (PAGE 2001) gezeichneten *unrooted tree* besonders deutlich (vgl. Abb. 48). Der Schwerpunkt der Differenzierung liegt zwischen den beiden angenommenen Gruppen. Innerhalb der Gruppen sind die Distanzen vergleichsweise gering.

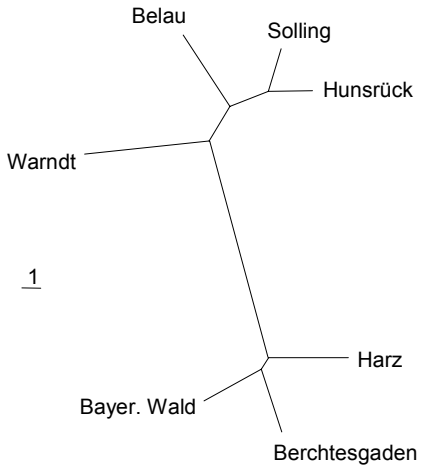


Abb. 48: ***Unrooted tree*** **der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen (UPGMA, modifiziert nach *Neigbor*-Methode mittels PHYLIP 3.5)**

Hinsichtlich der Analyse der genetischen Distanzen der mittels ISSR-PCR gewonnenen Daten kann zusammenfassend festgehalten werden, dass wesentliche Differenzierungen lediglich zwischen den zwei bereits mehrfach erwähnten Hauptgruppen nachgewiesen wurden. Innerhalb dieser beiden Gruppen sind zwischen den Populationen nur geringe genetische Differenzierungen nachzuweisen.

Ähnlich der Vorgehensweise bei der RAPD-Analyse wurde zusätzlich überprüft, ob eine Differenzierung der Populationen über die geographische Entfernung gegeben ist (*isolation by distance*-Modell). Grundlage dieses Modells ist, dass mit zunehmender geographischer Entfernung die Wahrscheinlichkeit des Genaustauschs sinkt und deshalb die Maße der genetischen Distanz ansteigen. Die Überprüfung des Zusammenhangs von genetischer und geographischer Distanz erbrachte mit einem Bestimmtheitsmaß von R^2 = 0,0666 lediglich einen schwachen Zusammenhang (vgl. Abb. 49). Es ist nicht von einem Einfluss der geographische Entfernung auf die genetische Differenzierung auszugehen.

Aufgrund der Tatsache, dass zwischen Berchtesgaden, Bayerischer Wald, Harz auf der einen und Hunsrück, Solling, Warndt und Belau auf der anderen Seite deutliche Differenzierungen nachgewiesen werden konnten, wurde die in Kap. 5.2.1.2 beschriebene Hypothese der Gruppenbildung auch hier überprüft und einer Genflussschätzung unterzogen.

Nach dem Verfahren von LYNCH & MILLIGAN (1994) wurde zwischen den beiden Gruppen ein Distanzmaß von H_{jk} = 0,116 errechnet. Auch anhand der nach NEI (1972 bzw. 1978) ermittelten Werte (Ds = 0,126 bzw. Ds = 0,124) wird deutlich, dass genetische Differenzierungen zwischen den beiden Gruppen bestehen. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wurde mit Hilfe des Verfahrens nach NEI (1987) der Genfluss zwischen den angenommenen Gruppen entsprechend Nm* = 0,5x(1-Gst)/Gst über Gst geschätzt (vgl. MCDERMOTT & MCDONALD 1993). Mit Nm* = 2,377 (außerhalb) und sogar Nm* = 3,005 (innerhalb) wurden sehr hohe Genflussraten ermittelt. Im Vergleich zum errechneten Genfluss zwischen allen untersuchten Individuen (Nm* = 2,597) ist insbesondere die Rate innerhalb der

„natürlichen“ Gruppe deutlich höher. Dies lässt eine hohe Durchmischung evtl. aber auch eine gemeinsame Herkunftslinie zwischen den Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz vermuten.

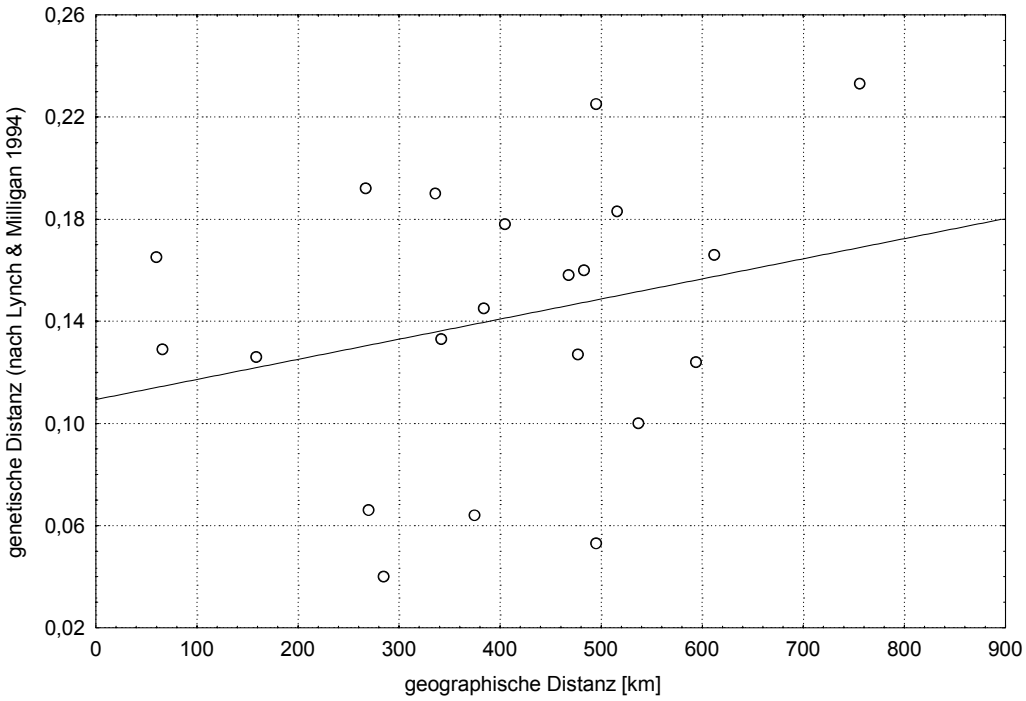


Abb. 49: Regressionsanalyse zur Überprüfung des *isolation by distance*-Modells mit ISSR-Distanz-Daten nach LYNCH & MILLIGAN (1994) (y = 8E-05*x + 0,1094)

Tab. 44: Genfluss (nach NEI 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen (ISSR)

	n	polys	%	Ht	Hs	GST	Nm*
natürliches Verbr.-gebiet	90	31	86,11	0,292 ± 0,035	0,250 ± 0,025	0,143	3,005
außerhalb nat. Verbr.-geb.	120	32	88,89	0,333 ± 0,028	0,275 ± 0,021	0,174	2,377
alle	210	33	91,67	0,367 ± 0,028	0,315 ± 0,023	0,161	2,597

5.2.2.3 Genetische Diversität

Neben der Kenntnis der genetischen Ähnlichkeit und der genetischen Distanz zwischen den untersuchten Populationen ist es zur Erläuterung der gewonnenen Daten wichtig, das Maß der genetischen Variabilität innerhalb einer untersuchten Population zu kennen. Als Maß für die genetische Variabilität einer Population wurde die genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) sowie nach NEI (1987) herangezogen.

Wenn auch in Kap. 5.2.1.3 beschrieben wurde, dass die ermittelten Ergebnisse in hohem Maße primerabhängig sind, wurde wegen der deutlich geringeren Markerzahl (n=36) an dieser Stelle auf die Darstellung der Diversität nach Primern verzichtet. In der Gesamtbetrachtung aller ISSR-Marker stellt die Population von Berchtesgaden mit $\hat{H}_{Be}$ = 0,291 die diverseste Population dar (vgl. Tab. 45). Während sich die übrigen Populatiuonen hinsichtlich ihrer genetischen Diversität nicht unterscheiden lassen, kann die Population des Harzes als etwas homogener charakterisiert werden. Aus den Ergebnissen der Berechnung der **genetischen Diversität zwischen den** paarweise verglichenen **Beständen** wird darüber hinaus deutlich, dass die Variabilität dieser angenommenen Gesamtpopulationen deutlich höher ist, als die der Einzelpopulationen.

Tab. 45: Genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	**0,291**	0,331	0,304	0,358	0,357	0,359	0,364
Bayer. Wald		**0,257**	0,278	0,333	0,330	0,324	0,337
Harz			**0,210**	0,326	0,319	0,316	0,333
Hunsrück				**0,255**	0,288	0,329	0,304
Solling					**0,225**	0,332	0,291
Warndt						**0,252**	0,338
Belau							**0,242**

Dass es sich anhand der verwendeten Marker bei der Population von Berchtesgaden um die genetisch diverseste handelt, kann anhand der mittels POPGENE 1.32 durchgeführten Berechnung der genetischen Diversität nach NEI (1987) bzw. des Shannon-Information-Index (nach LEWONTIN 1972) nicht bestätigt werden. Nach diesem Verfahren werden die Bestände des Solling und des Warndt als genetisch diverser charakterisiert (vgl. Tab. 46). Hinsichtlich der vergleichsweise geringen Diversität der Harz-Population wird allerdings ein identisches Ergebnis erzielt.

Wie aus den bisherigen ISSR-Analyse-Ergebnissen deutlich wurde, sind sowohl die einzelnen Populationen als auch die im paarweisen Vergleich zusammengefassten Populationen durch eine hohe bis sehr hohe genetische Diversität gekennzeichnet. Mit Hilfe des Programmes ARLEQUIN 2.0 wurde deshalb in einem weiteren Schritt überprüft, auf welchen Faktor – Variation innerhalb der Populationen, Variation zwischen Populationen, Variation innerhalb von Gruppen – die ermittelte genetische Variabilität hauptsächlich zurückgeführt werden kann.

Tab. 46: ***Single-Population Descriptive Statistics*** **der mittels ISSR untersuchten Bestände (nach NEI 1987)**

	Anzahl polymorpher Marker	%	Genetische Diversität nach NEI (1987)	Shannons Information Index
Berchtesgaden	29	80,56	0,270±0,181	0,407±0,252
Bayerischer Wald	26	72,22	0,254±0,191	0,381±0,271
Harz	26	72,22	0,228±0,190	0,347±0,267
Hunsrück	29	80,56	0,255±0,180	0,389±0,251
Solling	30	83,33	0,298±0,170	0,447±0,235
Warndt	25	69,44	0,285±0,213	0,413±0,298
Belau	30	83,33	0,262±0,179	0,400±0,243

Wie aus Tab. 47 hervorgeht ist die genetische Variation der untersuchten Fichten – wie auch bei der RAPD-Analyse – zum Großteil (ca. 65%) auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen. Die restliche genetische Variabilität kann sowohl durch Unterschiede zwischen den Populationen (ca. 15%) als auch durch die Variation in den angenommenen Gruppen erklärt werden (ca. 20%). Der vergleichsweise hohe Wert für die Variation zwischen den Gruppen deutet an, dass mit Hilfe der angewandten ISSR-Verfahrens eine deutliche Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb und außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes vollzogen werden konnte.

Tab. 47: **Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels ISSR untersuchten Gruppen**

	FG	SQ	Varianz (SQ/FG)	Varianz (%)	p-Wert	Fixation Index
zwischen Gruppen	1	197,0	1,541 Va	20,32	< 0,001	Φ_{CT} = 0,20325
zw. Pop. innerhalb der Gruppen	5	192,4	1,118 Vb	14,75	< 0,001	Φ_{SC} = 0,18512
innerhalb der Populationen	203	999,3	4,923 Vc	64,93	< 0,001	Φ_{ST} = 0,35075
gesamt	209	1388,7	7,582		-	-

5.2.2.4 Zusammenfassung

Mit den erfolgreich eingesetzten ISSR-Primern $(GA)_9T$, $(CA)_6RY$, $(CA)_6RG$ und $(CA)_6(AC)$ wurden insgesamt 36 DNA-Fragmente amplifiziert, von denen 33 als polymorphe ISSR-Marker eingestuft wurden. Die Berechnung der genetischen Ähnlichkeit innerhalb und zwischen den untersuchten Beständen erbrachte **über alle Bestände vergleichsweise hohe Homogenitäten**. In der Betrachtung der Populationen muss der **Bestand im Solling** allerdings aufgrund signifikant niedrigerer Ähnlichkeit zwischen den Individuen (BSR = 0,688±0,076) als vergleichsweise **inhomogen** charakterisiert werden. Der paarweise Vergleich der Populationen erbrachte hohe Überein-

stimmungen zwischen den Populationen von Berchtesgaden, Bayerischem Wald und Harz. Es ist somit **insbesondere in der angenommenen Gruppe der Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte von hohen Ähnlichkeiten** (BSR = 0,736±0,070) auszugehen. Anhand der HKA der binären Rohdaten konnte keine Differenzierung der Individuen bzw. Populationen erfolgen. Die Komponentenmatrix der Allelfrequenzen zeigte ebenfalls lediglich eine schwache Differenzierung, die nicht überbewertet werden soll. Mit der verwendeten Markerzahl konnte somit keine Differenzierung der binären Rohdaten bzw. der aus ihnen abgeleiteten Allelfrequenzen erreicht werden. Die Berechnung der genetischen Distanzmaße (nach LYNCH & MILLGAN 1994, nach NEI 1971, 1978) zeigt, dass im Vergleich zu den Distanzmaßen der RAPD-Analyse **sehr hohe Distanzen zwischen den Populationen** ($D_{Ø}$ = 0,141±0,054) errechnet wurden. **Geringe Distanzmaße wurden lediglich zwischen den Populationen des natürlichen Verbreitungsgebietes** ($D_{Ø}$ = 0,081±0,039) bzw. im paarweisen Vergleich der Individuen von Hunsrück und Solling ($D_{Hu/So}$ = 0,040) ermittelt. Das höchste Distanzmaß wurde zwischen den Populationen von Berchtesgaden und Belau ($D_{Be/BS}$ = 0,233) errechnet. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der genetischen und der geographischen Distanz besteht (***isolation by distance***). Mit R^2 = 0,0666 ist lediglich von einem **sehr schwachen Zusammenhang** auszugehen. Das Dendrogramm der nachgeschalteten Clusteranalyse bzw. der *unrooted tree* (TREEVIEW, PAGE 2001) zeigen deutlich, dass anhand der ausgewählten Distanzmaße von **zwei Untergruppen**, zum einen **Populationen innerhalb** und zum anderen **Populationen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes**, auszugehen ist. Aus diesem Grund wurde auch hier überprüft, ob sich die Genflussraten innerhalb dieser angenommenen Gruppen von denen zwischen den Gruppen unterscheiden. Im Vergleich zum errechneten **Genfluss** zwischen allen untersuchten Individuen (Nm* = 2,597) ist insbesondere die Rate **innerhalb der „natürlichen" Gruppe deutlich höher** (Nm* = 3,005). Dies lässt eine hohe Durchmischung zwischen den Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz vermuten. Die als Variabilitätsmaß errechnete **genetische Diversität** (nach LYNCH & MILLIGAN 1995, nach NEI 1987, nach SHANNON 1949) ergab **über alle untersuchten Populationen vergleichsweise hohe Diversitäten** ($\hat{H}_{Ø}$ = 0,247±0,026) – insbesondere für die Population von Berchtesgaden, Solling und Warndt –, wenn auch die angewandten Verfahren teilweise gegensätzliche Ergebnisse liefern. Die Population des Harzes kann anhand aller angewandten Parameter als die genetisch am wenigsten diverse charakterisiert werden ($\hat{H}_{Ha}$ = 0,210). Die abschließend vorgenommene Untersuchung der **Ursache der genetischen Variation** zeigte auf, dass die Variation zwar **hauptsächlich auf die Unterschiede innerhalb der Populationen** (ca. 65%) zurückzuführen sind, aber gerade der **Anteil der auf die Gruppenbildung zurückzuführenden Variation** (ca. 20%) **besonders bemerkenswert** ist. Dieser stellte bei der RAPD-Analyse mit 0,02% keinen erwähnenswerten Aspekt dar.

5.2.3 SSR-PCR

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden zusätzlich populationsgenetische Mikrosatelliten-Analysen (SSR) durchgeführt. Die Bedeutung dieses Verfahrens liegt in dem die bisherigen Ergebnisse ergänzenden Informationsgehalt codominanter Marker. Dies beinhaltet insbesondere die Berücksichtigung des Heterozygotiegrades, der einen der wichtigsten populationsgenetischen Parameter darstellt (vgl. Kap. 6.3.2).

Wie bereits in Kap. 4.2.5 beschrieben, wurden für die populationsgenetische Mikrosatelliten-Analyse der Einzelindividuen insgesamt sieben, von PFEIFFER et al. (1997) empfohlene SSR-Primer verwendet. Während sowohl in der Gelelektrophorese als auch kapillarelektrophoretisch mit den Primern SpAG2 und SpAC1F7 lediglich monomorphe DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnten (109 bp bzw. 116 bp), erschwerten bei den Primern SpAGC1 und SpAGC2 sog. „Schattenbanden“ (*stutter bands*), ein bei SSR-Analysen häufig beschriebenes Phänomen (vgl. Kap. 6.1.4), die Auswertung der Ergebnisse. Auch wenn diese durch Replikationsfehler während der PCR entstehenden Fragmente wegen ihrer geringeren Intensität prinzipiell von den Zielfragmenten gut zu unterscheiden sind (vgl. FERNANDO et al. 2001), wurden diese Primer – um Fehler bei der Auswertung zu vermeiden – für die populationsgenetischen Ananlysen nicht weiter berücksichtigt.

Im Rahmen der populationsgenetischen Analyse mittels SSR wurden somit lediglich drei Primer verwendet. Im Gegensatz zu den Angaben von PFEIFFER et al. (1997) konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung mit den erfolgreich verwendeten SSR-Primern SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8 – ähnlich wie bei GEBUREK et al. (1998) – mehr als ein Locus nachgewiesen werden, was den Informationsgehalt der jeweiligen Markersysteme zum Teil wesentlich erhöhte.

Tab. 48: Übersicht über die je nach Primer amplifizierten SSR-Produktgrößen

	SpAGD1	**SpAGG3**	**SpAC1H8**
nach PFEIFFER et al. (1997) zu erwartende Produktgröße	147 bp	136 bp	135 bp
Anzahl Produkte in vorliegender Untersuchung	4	2	6
Anzahl und Größe der Produkte [bp]	(A) 168, (B) 186, (C) 210, (D) 248	(A) 150, (B) 160	(A) 108, (B) 122, (C) 142, (D) 164, (E) 178, (F) 184

Wenngleich auch mit diesen Primern *stutter bands* nachgewiesen wurden, so erlaubte ihr Auftreten dennoch eine sichere Auswertung und eine eindeutige Determinierung homozygoter und heterozygoter Individuen. Ihr Abstand entsprach in allen Fällen dem der SSR-Allele, was bedeutet, dass auch bei heterozygoten Individuen jeweils zwei *stutter bands* auftraten. Zudem ermöglichte ihre vergleichsweise einfache Detektion eine vereinfachte Auswertung der Amplifikationsmuster anhand

der Agarose-Gelelektrophorese. Beispielhaft ist in Abb. 50 ein Agarosegel mit einem SpAGD1-Amplifikationsmuster dargestellt.

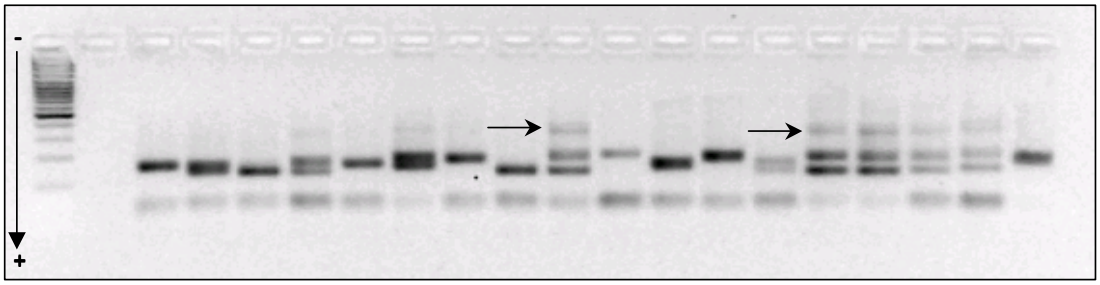


Abb. 50: Beispielhafte Darstellung eines SSR-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Berchtesgaden mit Primer SpAGD1 (Pfeile: *stutter bands*)

In der Folge werden die im Rahmen dieser Untersuchung ermittelten Rohdaten für jeden Primer getrennt aufgeführt, wohingegen in der populationsgenetischen Analyse die Auswertung über die drei ermittelten Markersysteme zusammenfassend erfolgt.

Mit **Primer SpAGD1** wurden vier Allele bzw. zehn Alleltypen nachgewiesen. Bei Betrachtung dieser Alleltypen wird deutlich, dass der Typ BB, also homozygote Individuen, die am Locus SpAGD1 auf beiden homologen Chromosomen das gleiche Allel B aufweisen, mit einer Frequenz von ca. 25% den dominierenden Alleltyp in den untersuchten Populationen darstellt. Ebenfalls hohe Häufigkeiten werden von den homozygoten Alleltypen AA (ca. 20%) und CC (ca. 15%) erreicht. Bei Betrachtung der einzelnen Populationen wird ersichtlich, dass der Alleltyp BB insbesondere in der Population des Bayerischen Waldes, von Hunsrück, Solling und Belau hohe Häufigkeiten erreicht, während die Bestände von Harz und Warndt durch den AA-Typ dominiert sind und in der Population von Berchtesgaden keine dominierenden Alleltypen zu beschreiben sind (vgl. Tab. 49). Die höchsten Anteile heterozygoter Individuen konnten demgemäß in Berchtesgaden nachgewiesen werden (ca. 47%), während sich insbesondere die Bestände von Warndt und Belau durch geringe Anteile an Heterozygoten auszeichnen.

Tab. 49: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit SSR-Primer SpAGD1

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Häufigkeit [%]
AA	4	3	10	0	2	16	6	*19,5*
AB	6	3	8	3	1	5	2	*13,3*
AC	4	5	4	2	3	2	2	*10,5*
AD	2	0	0	0	0	0	0	*1,0*
BB	5	8	2	8	13	6	11	*25,2*
BC	2	3	1	7	7	1	1	*10,5*
BD	0	1	0	0	0	0	1	*1,0*
CC	6	6	5	9	3	0	3	*15,2*
CD	0	0	0	0	0	0	0	*0,0*
DD	1	0	0	0	0	0	1	*1,0*
Heterozyg. [%]	*46,7 (n=30)*	*40,0 (n=29)*	*43,3 (n=30)*	*40,0 (n=29)*	*36,7 (n=29)*	*26,7 (n=30)*	*20,0 (n=27)*	

Im Rahmen der SSR-Analyse mit **Primer SpAGG3** wurden zwei Allele (A, B) bzw. drei Alleltypen (AA, AB, BB) nachgewiesen, von denen die homozygoten – insbesondere Alleltyp BB (ca. 55%) – deutlich dominieren (vgl. Tab. 50). Diese Dominanz ist in den Populationen von Berchtesgaden, Harz und Solling besonders ausgeprägt. Bemerkenswert sind die vergleichsweise hohen Häufigkeiten des Typs AA in der Bayerischen Wald-Population und das völlige Fehlen dieses Locus im Bestand aus Belau. Die höchsten Anteile heterozygoter Individuen finden sich dementsprechend in der Belauer Population (ca. 47%) und in den Beständen von Hunsrück und Warndt (ca. 43%).

Tab. 50: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit SSR-Primer SpAGG3

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Häufigkeit [%]
AA	3	8	1	2	4	1	0	*9,0*
AB	5	10	8	13	8	13	14	*33,8*
BB	21	12	20	15	18	15	14	*54,8*
Heterozyg. [%]	*16,7 (n=29)*	*33,3 (n=30)*	*26,7 (n=29)*	*43,3 (n=30)*	*26,7 (n=30)*	*43,3 (n=29)*	*46,7 (n=28)*	

Mit **Primer SpAC1H8** wurden im Gegensatz zu den Angaben von PFEIFFER et al. (1997) sechs Allele (A-F) bzw. 21 Alleltypen nachgewiesen. Die größten Häufigkeiten werden dabei von den homozygoten Allelypen CC, BB und DD erreicht, während die heterozygoten Alleltypen nur geringe Häufigkeiten erreichen (Maximalwert 5,2% für Alleltyp BD). Bei Betrachtung der untersuchten Populationen wird deutlich, dass mit Ausnahme der Population von Berchtesgaden und der des Solling alle Bestände verhältnismäßig hohe Heterozygotiegrade aufweisen (vgl. Tab. 51). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Häufigkeit des AA-Alleltyps in der Harz-Population sowie des DD-Typs im Warndt. Letzterer zeichnet sich zudem durch einen besonders geringen Anteil des CC-Typs aus.

Tab. 51: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit SSR-Primer SpAC1H8

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Häufigkeit [%]
AA	1	0	8	3	3	1	4	*9,5*
AB	0	0	0	0	2	0	1	*1,4*
AC	0	0	0	0	3	2	1	*2,9*
AD	1	1	2	0	1	0	3	*3,8*
AE	0	0	1	0	0	0	3	*1,9*
AF	0	1	0	0	0	1	0	*1,0*
BB	6	2	3	5	2	4	2	*11,4*
BC	2	0	0	1	0	1	0	*1,9*
BD	2	3	3	1	1	0	1	*5,2*
BE	0	1	1	0	0	2	1	*2,4*
BF	0	2	2	0	0	2	0	*2,9*
CC	6	5	4	5	9	1	4	*16,2*
CD	0	1	1	3	0	0	0	*2,4*
CE	0	0	1	1	0	0	1	*1,4*
CF	1	1	1	1	0	2	1	*3,3*
DD	4	4	0	5	2	7	1	*11,0*
DE	0	0	0	0	0	0	1	*0,5*
DF	1	3	0	0	1	2	0	*3,3*
EE	2	4	1	1	4	4	3	*9,0*
EF	0	0	1	3	1	1	1	*3,3*
FF	3	1	1	1	0	0	1	*3,3*
Heterozyg. [%]	*23,3 (n=29)*	*43,3 (n=29)*	*43,3 (n=30)*	*33,3 (n=30)*	*30,0 (n=29)*	*43,3 (n=30)*	*46,7 (n=29)*	

In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse der drei verwendeten Markersysteme wird deutlich, dass – ähnlich wie bei den bisher dargestellten Verfahren – die Ergebnisse deutlich vom eingesetzten Primer abhängen, dementsprechend unterschiedlich ausfallen und sich teilweise sogar widersprechen.

Unter Berücksichtigung aller Primer weisen die Populationen des Bayerischen Waldes, von Harz, Hunsrück, Warndt und Belau vergleichbar hohe Heterozygotenanteile auf, während die Population von Berchtesgaden und die des Solling durch einen höheren Anteil homozygoter Individuen charakterisiert sind (vgl. Tab. 52). Da der Heterozygotiegrad auch als Maß der Diversität einer Population verstanden wird (vgl. Kap. 6.3.2), müsste es sich nach dieser Betrachtungsweise bei den beiden Letztgenannten um genetisch weniger diverse Bestände handeln.

Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Markersysteme schwierig zu bewerten sind. Aufgrund der geringen Markerzahl kann dem Markersystem SpAGG3 sicherlich nicht vergleichbare Bedeutung wie dem Markersystem SpAC1H8 zugestanden werden. Aus diesem Grund erfolgt in der Folge die Auswertung der populationsgenetischen Analyse über alle verwendeten Primer gemeinsam.

Tab. 52: Heterozygotiegrade [%] der mittels SSR untersuchten Bestände, Gesamtdarstellung über die SSR-Primer SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8

	mit SpAGD1	mit SpAGG31	mit SpAC1H81	gesamt
Berchtesgaden	46,7	16,7	23,3	**28,9**
Bayer. Wald	40,0	33,3	43,3	**38,9**
Harz	43,3	26,7	43,3	**37,8**
Hunsrück	40,0	43,3	33,3	**38,9**
Solling	36,7	26,7	30,0	**31,1**
Warndt	26,7	43,3	43,3	**37,8**
Belau	20,0	46,7	46,7	**37,8**

5.2.3.1 Genetische Ähnlichkeit

Zur Charakterisierung der untersuchten Populationen sollte in einem ersten Schritt die genetische Homogenität einer Population betrachtet werden. Da in vorliegendem Fall aber nur drei Marker eingesetzt werden konnten, ist die Anwendung eines Ähnlichkeitsmaßes für den Vergleich von Individuen innerhalb einer Population statistisch nicht sinnvoll. Aus diesem Grund sei zur Betrachtung der genetischen Ähnlichkeit der untersuchten Indivduen und Populationen nochmals auf die Rohdaten der Allelhäufigkeiten verwiesen (vgl. Tab. 49 bis Tab. 51). Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass in der Gesamtbetrachtung der drei verwendeten Markersystemen 34 Alleltypen detektiert werden konnten. Aus der Übersicht in Tab. 53 geht hervor, dass alle untersuchten Populationen vergleichsweise viele Alleltypen aufweisen und dementsprechend auch alle als genetisch vergleichsweise variabel zu charakterisieren sind. Insbesondere die Population von Belau zeigt mit den Primern SpAGD1 und SpAC1H8 eine hohe Anzahl von Alleltypen, was als Maß für eine hohe Variabilität der Population gewertet werden kann.

Tab. 53: Anzahl nachgewiesener SSR-Alleltypen; aufgeschlüsselt nach Population und Primer

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
SpAGD1 (n=10)	8	7	6	5	6	5	8
SpAGG3 (n=3)	3	3	3	3	3	3	2
SpAC1H8 (n=21)	11	13	14	12	11	13	16
Summe	*22*	*23*	*23*	*20*	*20*	*21*	*26*

In einem zweiten Schritt soll die genetische Ähnlichkeit zwischen den Populationen betrachtet werden. Da nach dem Verfahren des Programmes POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) mit den vorliegenden Daten keine Ähnlichkeitsmaße berechnet werden können, beschränkt sich auch hier die Darstellung

auf die aus den Rohdaten abgeleiteten Allelhäufigkeiten. Diese wurden einer Faktorenanalyse unterzogen, deren Vorgehensweise bereits in Kap. 4.3.1.3 beschrieben wurde. Im Komponentendiagramm (vgl. Abb. 51) sowie in der zugehörigen Komponentenmatrix (vgl. Tab. 54) wird deutlich, dass nach dieser Methode die Mehrheit der Populationen zu zwei Gruppen zusammengefasst werden. Während die Populationen von Bayerischem Wald, Hunsrück und Solling einer Komponente zugeordnet werden, bilden die Populationen von Berchtesgaden und Harz eine zweite Gruppe. Der Bestand von Belau wird intermediär eingeordnet, wohingegen der Warndt separiert dargestellt wird.

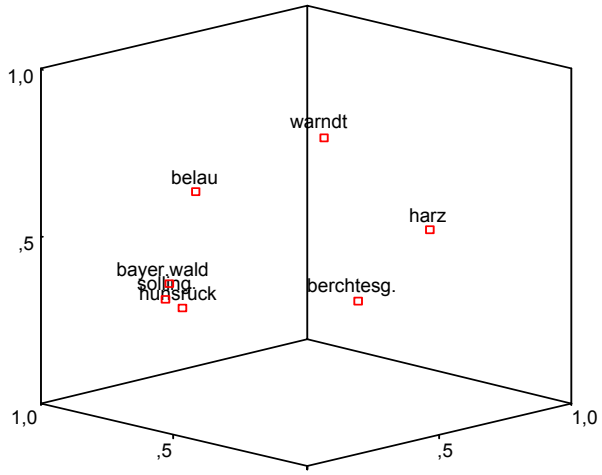


Abb. 51: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der SSR-Alleltypenhäufigkeiten mit den SSR-Primern SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8 (Varimax rotiert)

Tab. 54: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der SSR-Alleltypenhäufigkeiten mit den SSR-Primern SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8 (vgl. Abb. 51) (Die Rotation ist in 9 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,566	,245	,758
Bayer. Wald	,812	,335	,296
Harz	,309	,501	,776
Hunsrück	,828	,248	,364
Solling	,847	,280	,320
Warndt	,284	,864	,350
Belau	,654	,652	,241

Diese Darstellung soll allerdings nicht darüber hinwegtäuschen, dass die ermittelte Unterschiede auf sehr geringem Niveau liegen. Aus diesem Grund wurde als weiteres Ähnlichkeitsmaß für den Vergleich der Populationen die genetische Identität nach NEI (1972, 1978) berechnet. Aus Tab. 55

geht hervor, dass die Werte der genetischen Identität (nach NEI 1972) über alle Populationen betrachtet sehr hoch liegen. Die mit ID_{Nei} = 0,787 geringste genetische Identität wurde zwischen den Beständen Hunsrück und Warndt errechnet, während die höchsten Identitäten mit ID_{Nei} = 0,960 (Bayerischer Wald/Hunsrück) ermittelt wurden. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass insbesondere die Population von Berchtesgaden hohe genetische Ähnlichkeiten mit allen übrigen Populationen aufweist ($ID\varnothing_{Nei}$ = 0,921±0,015), während für den Warndt-Bestand durchschnittlich die geringsten Ähnlichkeitsmaße errechnet wurden ($ID\varnothing_{Nei}$ = 0,865±0,062).

Tab. 55: Genetische Identitäten nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels SSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,922	0,941	0,937	0,902	0,915	0,910
Bayer. Wald	0,935	-	0,838	0,960	0,923	0,857	0,904
Harz	0,952	0,850	-	0,842	0,849	0,936	0,925
Hunsrück	0,949	0,974	0,851	-	0,959	0,787	0,905
Solling	0,913	0,935	0,858	0,970	-	0,797	0,956
Warndt	0,925	0,868	0,946	0,797	0,806	-	0,895
Belau	0,922	0,917	0,936	0,917	0,968	0,906	-

5.2.3.2 Genetische Distanz und Genfluss

Die Berechnung der genetischen Distanz erfolgte nach den beiden bereits mehrfach erwähnten Verfahren von NEI (1972, 1978), von denen lediglich die Ergebnisse nach dem 1972er Verfahren weiter diskutiert werden. Aus Tab. 56 wird deutlich, dass mit Werten von Ds = 0,042 (Hunsrück/Solling) bis Ds = 0,239 (Hunsrück/Warndt) zwar zum Teil sehr geringe Distanzmaße errechnet wurden, zum anderen aber auch deutliche Differenzierungen zwischen einzelnen Populationen vermutet werden können. Insbesondere die Population des Warndt ist durch hohe Distanzwerte gegenüber den übrigen Populationen gekennzeichnet.

Der aus diesen Distanzmaßen errechnete und mit TREEVIEW 1.66 (PAGE 2001) gezeichnete *unrooted tree* zeigt dementsprechend, dass die Populationen von Bayerischem Wald, Hunsrück, Solling und Belau zu einer Gruppe zusammengefasst werden und der Gruppe aus Berchtesgaden, Harz und Warndt gegenübergestellt werden (vgl. Abb. 52). Während die Differenzierungen innerhalb dieser beiden Gruppen nicht besonders ausgeprägt sind, besteht eine wesentlich größere Distanz zwischen den beiden genannten Gruppen.

Tab. 56: Genetische Distanzen nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels SSR untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,081	0,061	0,065	0,103	0,089	0,095
Bayer. Wald	0,067	-	0,176	0,041	0,080	0,155	0,101
Harz	0,050	0,163	-	0,173	0,164	0,066	0,078
Hunsrück	0,053	0,027	0,161	-	0,042	0,239	0,100
Solling	0,091	0,067	0,153	0,031	-	0,227	0,045
Warndt	0,078	0,141	0,055	0,228	0,216	-	0,111
Belau	0,082	0,087	0,066	0,087	0,032	0,099	-

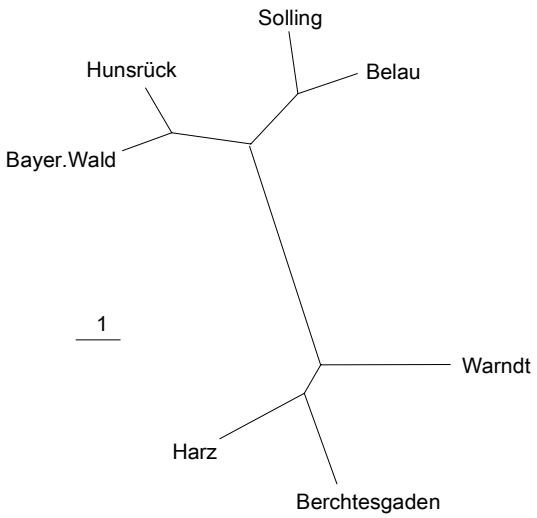


Abb. 52: *Unrooted tree* der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels SSR untersuchten Beständen (UPGMA, modifiziert nach *Neigbor*-Methode mittels PHYLIP 3.5)

Hinsichtlich der Analyse der genetischen Distanzen der mittels SSR gewonnenen Daten kann zusammenfassend festgehalten werden, dass wesentliche Differenzierungen lediglich zwischen den Gruppen von Berchtesgaden, Harz und Warndt sowie Bayerischer Wald, Hunsrück, Solling und Belau nachgewiesen wurden. Innerhalb dieser beiden Gruppen sind zwischen den Populationen nur geringe genetische Differenzierungen nachzuweisen.

Vergleichbar zur Vorgehensweise bei der RAPD- und der ISSR-Analyse wurde deshalb zusätzlich überprüft, ob eine Differenzierung der Populationen über die geographische Entfernung gegeben ist (*isolation by distance*-Modell). Grundlage dieses Modells ist, dass mit zunehmender geographischer Entfernung die Wahrscheinlichkeit des Genaustauschs sinkt und deshalb die Maße der genetischen Distanz ansteigen. Die Überprüfung des Zusammenhangs von genetischer und geographischer

Distanz erbrachte mit R^2 = 0,109 sogar einen schwach negativen Zusammenhang (vgl. Abb. 53). Ein Einfluss der geographische Entfernung auf die genetische Differenzierung ist auszuschließen.

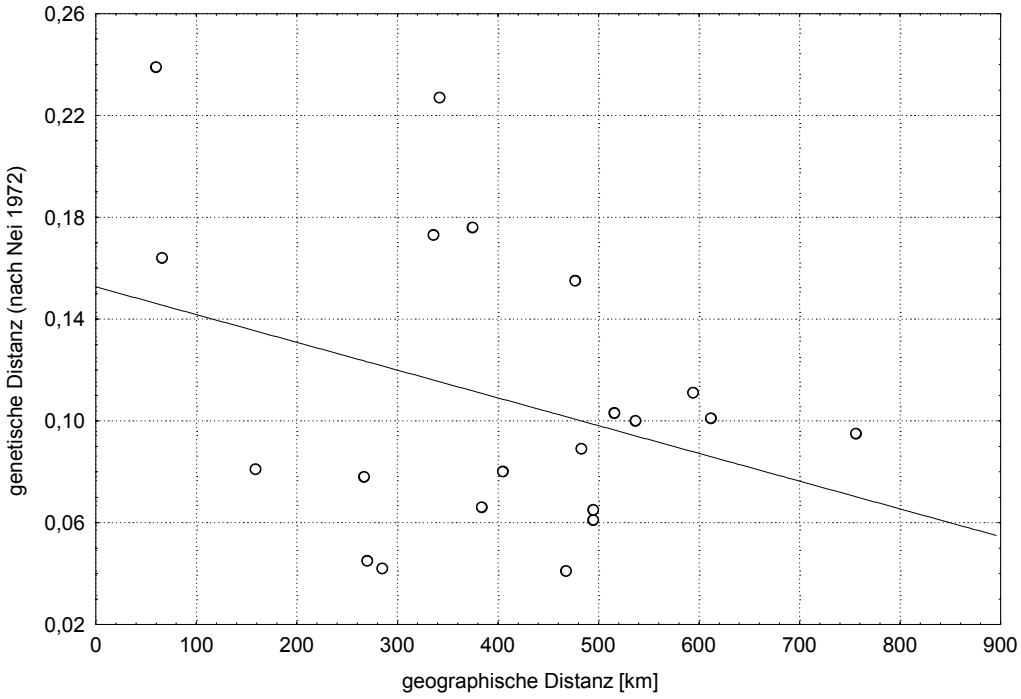


Abb. 53: Regressionsanalyse zur Überprüfung des *isolation by distance*-Modells mit SSR-Distanz-Daten nach NEI (1972) (y = -0,0001*x + 0,1527)

Unter der Annahme die Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz als die Bestände, die im natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte lokalisiert sind, zusammenfassen zu können, wurde zudem die oben bereits beschriebene Hypothese überprüft, ob sich diese Populationen als Gruppe gegenüber der Gruppe der künstlich begründeten Bestände differenzieren lassen. Dazu wurden **Genflussschätzungen** zwischen den Gruppen vorgenommen. Aus Tab. 57 geht hervor, dass mit *Nm** = 5,563 vergleichsweise höhere Genflussraten zwischen den Flächen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte ermittelt wurden als zwischen allen untersuchten Flächen bzw. auch als zwischen den Flächen, die als „künstliche Bestände“ zusammengefasst wurden.

Tab. 57: Genfluss (nach Nei 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen (SSR)

	n	Fis	Fit	Fst	Nm*
natürliches Verbr.-gebiet	90	0,416	0,441	0,043	5,563
außerhalb nat. Verbr.-geb.	120	0,373	0,410	0,060	3,930
alle	210	0,391	0,427	0,058	4,054

5.2.3.3 Genetische Diversität

Zur Berechnung der genetischen Diversität von durch codominante Marker charakterisierte Populationen existieren mehrere Maße. Der auf der Berechnung effektiver Allele (ne) aufbauende **Shannon-Information-Index** (vgl. Tab. 58) macht deutlich, dass sich die Populationen mit Werten von I = 1,02±0,61 (Warndt) bis I = 1,18±0,49 (Belau) hinsichtlich ihrer Diversität nicht voneinander unterscheiden lassen. Trotzdem kann festgehalten werden, dass nach diesem Verfahren die Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Belau als die diversesten charakterisiert werden können.

Tab. 58: ***Single-Population Descriptive Statistics*** **der mittels SSR untersuchten Bestände (nach NEI 1987)**

	Anzahl beobacht. Allele (na)	Anzahl effektiver Allele (ne)	Shannons Information Index
Berchtesgaden	4±2	3,14±1,60	1,12±0,59
Bayer. Wald	4±2	3,31±1,56	1,17±0,50
Harz	3,67±2,08	2,94±1,79	1,05±0,62
Hunsrück	3,67±2,08	3,04±1,82	1,07±0,57
Solling	3,67±2,08	2,69±1,34	1,03±0,51
Warndt	3,67±2,08	2,93±2,02	1,02±0,61
Belau	4,33±1,53	3,14±1,64	1,18±0,49

Für codominante Marker wird in zahlreichen Untersuchungen zusätzlich der **Heterozygotiegrad** als Diversitätsmaß herangezogen (vgl. u.a. BERGMANN & RUETZ 1991, HANSSON & WESTERBERG 2002). Im Rahmen dessen zeigt zwar auch *Nei's expected heterozygosity* (H_{exp}), dass sich die Populationen hinsichtlich ihrer Diversität nicht signifikant unterscheiden lassen, aber hier wird die Population des Bayerischen Waldes eindeutig als die diverseste charakterisiert (vgl. Tab. 59).

Tab. 59: **Heterozygotie-Statistik der mittels SSR untersuchten Bestände**

	Observed Homozyg.	Observed Heterozyg.	Expected Homozyg.	Expected Heterozyg.	Nei's exp. Heterozyg.
Berchtesgaden	0,711±0,158	0,289±0,158	0,394±0,264	0,606±0,264	0,596±0,259
Bayer. Wald	0,611±0,051	0,389±0,051	0,338±0,158	0,662±0,158	0,651±0,155
Harz	0,622±0,096	0,378±0,096	0,431±0,267	0,570±0,267	0,560±0,262
Hunsrück	0,611±0,051	0,389±0,051	0,396±0,203	0,605±0,203	0,594±0,200
Solling	0,689±0,051	0,311±0,051	0,422±0,189	0,578±0,189	0,568±0,186
Warndt	0,622±0,096	0,378±0,096	0,434±0,230	0,566±0,230	0,557±0,226
Belau	0,611±0,164	0,389±0,164	0,371±0,191	0,629±0,192	0,619±0,188

Werden diese beiden Diversitätsmaße für die verwendeten Primer einzeln dargestellt, wird deutlich, dass die Ergebnisse stark von der Anzahl detektierter Alleltypen abhängig sind und deswegen primerspezifisch sind (vgl. Tab. 60). Während mit Primer SpAGG3 nur sehr geringe Diversitätsmaße errechnet werden konnten, wurden mit dem 21 Alleltypen umfassenden SpAC1H8-Markersystem sehr hohe Diversitäten ermittelt. Dementsprechend zeigen die Ergebnisse über die betrachteten Primer auch Unterschiede hinsichtlich der qualitativen Einordnung als genetisch diverse oder homogene Population, wenngleich die beiden Diversitätsmaße in den meisten Fällen vergleichbare Tendenzen aufweisen. Dies berücksichtigend muss festgehalten werden, dass demnach die Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald, Warndt und Belau als vergleichsweise diverser zu charakterisieren sind.

Tab. 60: Diversitätsmaße (nach SHANNON 1949, nach NEI 1987) der mittels SSR untersuchten Bestände; aufgeschlüsselt nach SSR-Primern

	SpAGD1		SpAGG3		SpAC1H8	
	SHANNON	NEI	SHANNON	NEI	SHANNON	NEI
Berchtesgaden	1,27	0,704	0,48	0,299	1,63	0,783
Bayer. Wald	1,14	0,661	0,68	0,491	1,67	0,801
Harz	1,01	0,606	0,45	0,278	1,69	0,796
Hunsrück	0,92	0,573	0,60	0,406	1,70	0,804
Solling	0,93	0,551	0,58	0,391	1,59	0,762
Warndt	0,79	0,485	0,56	0,375	1,72	0,810
Belau	1,14	0,635	0,70	0,635	1,69	0,798

Im Rahmen der Betrachtung der genetischen Diversität wurden die oben beschriebenen Verfahren zur Ermittlung der genetischen Diversität nach SHANNON (1949) und nach NEI (1987) auch auf die Hypothese angewandt, dass sich die Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte von denen außerhalb unterscheiden müssten. Aus Tab. 61 wird deutlich, dass hinsichtlich des SHANNON-Maßes keine Differenzierung zwischen den angenommenen Gruppen nachzuweisen ist. Wenn auch die Bestände außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes einen etwas geringeren Wert für *Nei's expected heterozygosity* aufweisen, so unterscheiden sich die Werte nicht signifikant (vgl. Tab. 62).

Wie aus Tab. 63 hervorgeht ist die genetische Variation der untersuchten Fichten annähernd vollständig (ca. 96%) auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen. Die restliche genetische Variabilität kann durch Unterschiede zwischen den Populationen (ca. 3%) erklärt werden. Die Variation, die auf Unterschiede zwischen den angenommenen Gruppen zurückgeführt werden kann, ist mit weniger als 1% vernachlässigbar.

Tab. 61: ***Single-Population Descriptive Statistics*** **der mittels SSR untersuchten Gruppen (nach NEI 1987)**

	Anzahl beobacht. Allele (na)	Anzahl effektiver Allele (ne)	Shannons Information Index
natürliches Verbr.-gebiet	4,00±2,00	3,44±1,98	1,17±0,59
außerhalb nat. Verbr.-geb.	4,33±1,53	3,35±2,02	1,16±0,57
alle	4,33±1,53	3,44±2,04	1,17±0,58

Tab. 62: **Heterozygotie-Statistik der mittels SSR untersuchten Gruppen**

	Observed Homozyg.	Observed Heterozyg.	Expected Homozyg.	Expected Heterozyg.	Nei's exp. Heterozyg.
natürliches Verbr.-gebiet	0,648±0,090	0,352±0,090	0,367±0,223	0,633±0,223	0,629±0,222
außerhalb nat. Verbr.-geb.	0,633±0,052	0,367±0,052	0,376±0,213	0,624±0,213	0,622±0,212
alle	0,640±0,167	0,360±0,167	0,370±0,218	0,630±0,218	0,629±0,218

Tab. 63: **Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels SSR untersuchten Gruppen**

	FG	SQ	Varianz (SQ/FG)	Varianz (%)	p-Wert	Fixation Index
zwischen Gruppen	1	4,1	0,009 Va	0,93	< 0,001	Φ_{CT} = 0,00927
zw. Pop. innerhalb der Gruppen	4	10,4	0,029 Vb	3,14	< 0,001	Φ_{SC} = 0,03174
innerhalb der Populationen	352	309,6	0,879 Vc	95,93	< 0,001	Φ_{ST} = 0,04072
gesamt	357	324,1	0,917	-	-	-

5.2.3.4 Zusammenfassung

Zur Ergänzung der bisher erhaltenen Ergebnisse wurden im Rahmen der SSR-Analyse codominante Markersysteme in die Untersuchung mit einbezogen. Dabei wurden insgesamt sieben, von PFEIFFER et al. (1997) für *Picea abies* empfohlene SSR-Primer auf ihre Eignung getestet und letztlich drei (SpAGD1, SpAGG3 und SpAC1H8) für die populationsgenetische Analyse als geeignet eingestuft und verwendet. Die primerspezifisch ermittelten **Alleltypenhäufigkeiten** offenbarten **wesentliche Unterschiede im Informationsgehalt der Primer**, so dass die Auswertung der populationsgenetischen Analyse auf die Gesamtbetrachtung aller 34 ermittelten Alleltypen beschränkt wurde. Unter Berücksichtigung aller Primer weisen die Populationen des Bayerischen Waldes, von Harz, Hunsrück, Warndt und Belau vergleichbar hohe Heterozygotenanteile (37,8% bis 38,9%) auf, während die **Population von Berchtesgaden und die des Solling** durch einen **höheren Anteil homozygoter**

Individuen charakterisiert sind (28,9% bzw. 31,1%). Zur Charakterisierung der genetischen Homogenität der Populationen wurde auf die Zahl an Alleltypen zurückgegriffen. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass **alle untersuchten Populationen** vergleichsweise viele Alleltypen aufweisen und dementsprechend als **genetisch vergleichsweise inhomogen** zu charakterisieren sind. Insbesondere die Population von Belau zeigt mit den Primern SpAGD1 und SpAC1H8 eine hohe Anzahl von Alleltypen, was als Maß für eine hohe Variabilität der Population gewertet werden kann. Die HKA erbrachte lediglich eine schwache Differenzierung der Populationen, was durch die Werte der genetischen Identität (nach NEI 1972, 1978) bestätigt wurde. Insbesondere die **Population von Berchtesgaden** weist **im paarweisen Vergleich zu allen übrigen Populationen hohe genetische Ähnlichkeiten** auf ($ID\varnothing_{Nei}$ = 0,921±0,015), während für den Warndt-Bestand durchschnittlich die geringsten Ähnlichkeitsmaße errechnet wurden ($ID\varnothing_{Nei}$ = 0,865±0,062). Die angewandten Distanzmaße (NEI 1972, 1978) zeigen ein etwas differenzierteres Bild. Während z.T. zwar sehr geringe Distanzen berechnet wurden ($Ds_{Hu/So}$ = 0,042), konnten aber auch deutliche Differenzierungen zwischen einzelnen Populationen nachgewiesen werden ($Ds_{Hu/Wa}$ = 0,239). Insbesondere die **Population des Warndt** ist durch **hohe Distanzwerte** gegenüber den übrigen Populationen gekennzeichnet ($Ds_{\varnothing}$ = 0,120±0,057). Der mittels TREEVIEW (PAGE 2001) gezeichnete *unrooted tree* zeigt dementsprechend, dass die Populationen von Bayerischem Wald, Hunsrück, Solling und Belau zu einer Gruppe zusammengefasst werden und der Gruppe aus Berchtesgaden, Harz und Warndt gegenübergestellt werden. Die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen genetischer und geographischer Distanz (***isolation by distance***) erbrachte dementsprechend auch einen **negativen Zusammenhang** (R^2 = 0,109). Hinsichtlich der Überprüfung der oben bereits genannten Hypothese, dass sich die Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte (Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz) durch ihre Entwicklungsgeschichte und deswegen durch ihren Genpool unterscheiden, wurden Genflussschätzungen zwischen diesen Gruppen vorgenommen. Zwischen den Standorten **innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes** der Fichte konnten **höhere Genflussraten** (Nm* = 5,563) ermittelt werden als im Vergleich zwischen allen untersuchten Flächen bzw. auch als im Vergleich zwischen den Flächen, die als „künstliche Bestände“ zusammengefasst wurden (Nm* = 3,930). Aus den zur Charakterisierung der untersuchten Populationen zusätzlich ermittelten Diversitätsmaßen (nach NEI 1987, nach SHANNON 1949) resultierte, dass es sich bei den **Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald, Warndt und Belau** um die **genetisch diversesten** handeln muss. Hinsichtlich der oben getroffenen Gruppenhypothese ergaben sich keine Unterschiede in den für die einzelnen Gruppen errechneten Diversitätsmaßen. Die abschließend vorgenommene Untersuchung der **Ursache der genetischen Variation** legte dar, dass die Variation **annähernd vollständig** (ca. 96%) **auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen** ist. Die restliche genetische Variabilität kann durch Unterschiede zwischen den Populationen (ca. 3%) erklärt werden. Die Variation, die auf Unterschiede zwischen den angenommenen Gruppen zurückgeführt werden kann, ist mit weniger als 1%, ähnlich den Ergebnissen der RAPD-Analyse, vernachlässigbar.

5.2.4 EST-PCR

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden populationsgenetische Mikrosatelliten-Analysen an sog. *expressed sequence tags* (EST) durchgeführt. Dabei handelt es sich um PCR-gestützte, codominante Marker auf der Grundlage exprimierter DNA-Sequenzen. Ihre Bedeutung besteht v.a. darin, dass es sich bei den nachgewiesenen Fragmenten um exprimierte Genorte (mit mehr oder weniger bekannter Funktion) handelt. Die entsprechende Gensequenz kann wesentliche Bedeutung für den Stoffwechsel der Fichten haben und somit hinsichtlich des Vergleichs von Populationen differenzierende Eigenschaften aufweisen. Aus diesen Gründen ist davon auszugehen, dass durch die Anwendung dieses Verfahrens ein zusätzlicher Informationsgewinn zu erzielen ist und die bisherigen Ergebnisse der übrigen molekulargenetischen Methoden wesentlich ergänzt werden können.

Wie bereits in Kap. 4.2.6 beschrieben, wurden von RIEGEL (2001) bzw. SCHUBERT et al. (2001) 15 EST-Markergenorte entwickelt. Von diesen wurde nach dem in Kap. 4.2.6 beschriebenen Verfahren drei Markersysteme ausgewählt und verwendet. In Tab. 64 sind die im Rahmen dieser Untersuchung nachgewiesenen DNA-Fragmente den nach SCHUBERT et al. (2001) zu erwartenden Produktgrößen gegenübergestellt. Die mit Primer PA0066 zusätzlich amplifizierten höhermolekularen Fragmente (300-750 bp) wurden als Produkte zufälliger Bindungsstellen interpretiert und nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Tab. 64: Übersicht über die je nach EST-Primer amplifizierten Produktgrößen (durch cDNA-Sequenz zu erwartende Fragmentgrößen sind unterstrichen)

	PA0034	**PA0043**	**PA0066**
Anzahl Produkte bei SCHUBERT et al. (2001)	5	4	4
Größe der Produkte [bp]	(A) 212, (B) 214, (C) 226, (D) <u>228</u>, (E) 230	(A) 368, (B) <u>372</u>, (C) 389, (D) 420	(A) 154, (B) <u>161</u>, (C) 171, (D) 178
Anzahl Produkte in vorlieg. Untersuchung	2	2	2
Größe der Produkte [bp]	(A) 242, (B) 250	(A) 378, (B) 386	(A) 171, (B) 186

Die Auswertung dieser codominanten Markersysteme erfolgt über die bereits dargestellten populationsgenetischen Routine-Auswertungen. In der Folge werden die im Rahmen dieser Untersuchung ermittelten Rohdaten für jeden Primer getrennt aufgeführt, wohingegen in der populationsgenetischen Analyse die Auswertung über die drei ermittelten Markersysteme zusammenfassend erfolgt.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die kapillarelektrophoretische Analyse mittels ABI Prism in einigen Fällen nicht zielführend war, da das von den fluoreszenzmarkierten dNTPs verursachte „Hintergrundrauschen“ die Signale überlagerte. Die Auftrennung mittels 2,5%iger Agarose-Gelelektrophorese erbrachte aber eine ausreichende Reproduzierbarkeit und Sicherheit der Analysenergebnisse (vgl. Abb. 54).

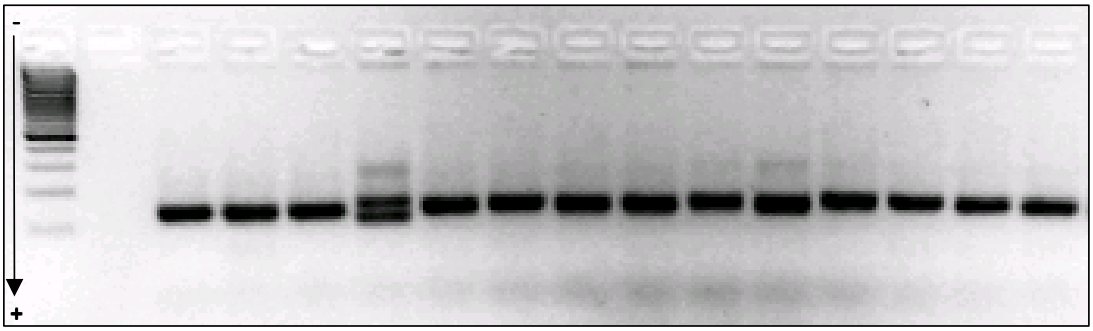


Abb. 54: Beispielhafte Darstellung eines EST-Elektrophoresegels ausgewählter Individuen der Population Berchtesgaden mit Primer PA0066

Im Rahmen der EST-Analyse mit **Primer PA0034** wurden zwei Allele (A, B) bzw. drei Alleltypen (AA, AB, BB) nachgewiesen, von denen die heterozygoten mit 58,1% dominieren (vgl. Tab. 65). Diese Dominanz ist insbesondere in den Populationen von Berchtesgaden, Hunsrück, Solling und Belau ausgeprägt. Bei Betrachtung der Alleltypen wird deutlich, dass der Typ BB, also homozygote Individuen, die an den entsprechenden Loci auf beiden homologen Chromosomen das gleiche Allel B aufweisen, mit Frequenzen von 3,3% bis 16,6% den seltensten Alleltyp in den untersuchten Populationen darstellen. Bemerkenswert sind die vergleichsweise hohen Häufigkeiten des AA-Typs in den Populationen des Bayerischen Waldes und des Harzes. Insbesondere in Kombination mit den geringen Häufigkeiten des Alleltyps BB lassen sich diese beiden Populationen von den übrigen Beständen etwas abgrenzen.

Tab. 65: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit EST-Primer PA0034

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Häufigkeit [%]
AA	8	13	14	8	7	10	9	*32,9*
AB	21	16	15	18	19	15	18	*58,1*
BB	1	1	1	4	4	5	3	*9,0*
Het. [%]	*70,0*	*53,3*	*50,0*	*60,*	*63,3*	*50,0*	*60,0*	

Mit **Primer PA0043** wurden ebenfalls zwei Allele (A, B) bzw. drei Alleltypen (AA, AB, BB) nachgewiesen. Auch hier dominieren die heterozygoten Typen, während der Alleltyp AA mittlere Häufigkeiten erreicht und der Alleltyp BB als selten charakterisiert werden muss (vgl. Tab. 66). Bei Betrachtung der Populationen wird deutlich, dass insbesondere in den Beständen von Berchtesgaden und Bayerischer Wald ein hoher Heterozygotiegrad berechnet werden konnte. Dies ist auf das seltene Vorkommen des AA-Typs zurückzuführen, der in den übrigen Population vergleichsweise hohe Anteile erreicht.

Tab. 66: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit EST-Primer PA0043

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Häufigkeit [%]
AA	3	5	9	9	11	9	12	*27,6*
AB	24	23	19	20	18	19	17	*66,7*
BB	3	2	2	1	1	2	1	*5,7*
Het. [%]	*80,0*	*76,7*	*63,3*	*66,7*	*60,0*	*63,3*	*56,7*	

Auch mit **Primer PA0066** konnten lediglich zwei Allele (A, B) bzw. drei Alleltypen (AA, AB, BB) nachgewiesen werden. Mit durchschnittlich 87,1% ist die Dominanz der Heterozygoten besonders ausgeprägt (vgl. Tab. 67). Der Alleltyp BB konnte in den Populationen von Warndt und Belau nicht nachgewiesen werden, was dazu führt, dass in diesen Population Heterozygotiegrade von ≥90% errechnet wurden. Bemerkenswerte Unterschiede in den Alleltypenhäufigkeiten der untersuchten Populationen sind mit diesem Primer nicht zu verzeichnen.

Tab. 67: Alleltypenhäufigkeiten und Heterozygotenanteil mit EST-Primer PA0066

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Häufigkeit [%]
AA	4	3	4	1	3	3	1	*9,0*
AB	23	25	25	28	26	27	29	*87,1*
BB	3	2	1	1	1	0	0	*3,8*
Het. [%]	*76,7*	*83,3*	*83,3*	*93,3*	*86,7*	*90,0*	*96,7*	

Bei Betrachtung der über alle Primer ermittelten Heterozygotiegrade wird ersichtlich, dass sich die untersuchten Populationen hinsichtlich dieses Maßes nicht wesentlich unterscheiden (65,6% bis 75,6%). Unter der Annahme, dass der Heterozygotiegrad als Maß für die genetische Variabilität einer Population verstanden wird, kann festgehalten werden, dass es sich bei der Population von Berchtes-gaden um die vermutlich diverseste handelt (vgl. Tab. 68). Aufgrund der niedrigen Markerzahl dürfen allerdings die hier vorgestellten Ergebnisse – ähnlich wie die in der Folge präsentierten Ergebnisse der populationsgenetischen Analyse – nicht überinterpretiert werden. Um in diesem Zusammenhang stichprobenbedingte Fehler zu vermeiden erfolgt die Auswertung der populationsgenetischen Analyse über alle verwendeten Primer gemeinsam.

Tab. 68: Heterozygotiegrade [%] der mittels EST untersuchten Bestände, Gesamtdarstellung über die EST-Primer PA0034, PA0043 und PA0066

	mit PA0034	mit PA0043	mit PA0066	gesamt
Berchtesgaden	70,0	80,0	76,7	**75,6**
Bayer. Wald	53,3	76,7	83,3	**71,1**
Harz	50,0	63,3	83,3	**65,6**
Hunsrück	60,0	66,7	93,3	**73,3**
Solling	63,3	60,0	86,7	**70,0**
Warndt	50,0	63,3	90,0	**67,8**
Belau	60,0	56,7	96,7	**71,1**

5.2.4.1 Genetische Ähnlichkeit

Zur Charakterisierung der untersuchten Populationen sollte in einem ersten Schritt die genetische Homogenität einer Population betrachtet werden. Da in vorliegendem Fall – ebenso wie in der SSR-Analyse – nur drei Marker eingesetzt werden konnten, ist die Anwendung eines Ähnlichkeitsmaßes für den Vergleich von Individuen innerhalb einer Population statistisch nicht sinnvoll. Aus diesem Grund sei zur Betrachtung der genetischen Ähnlichkeit der untersuchten Indivduen und Populationen nochmals auf die Rohdaten der Allelhäufigkeiten (vgl. Tab. 65 bis Tab. 67) sowie auf die gemittelten Heterozygotiegrade (vgl. Tab. 68) verwiesen. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die untersuchten Populationen hinsichtlich ihrer Alleltypenhäufigkeiten und hinsichtlich ihrer Heterozygotiegrade nicht zu differenzieren sind. Die weitere Darstellung der genetischen Ähnlichkeit zwischen den Populationen beschränkt sich methodenbedingt auf die einer Faktorenanalyse unterzogenen Allelhäufigkeiten. Im Komponentendiagramm (vgl. Abb. 55) sowie in der zugehörigen Komponentenmatrix (vgl. Tab. 69) wird deutlich, dass nach dieser Methode die Populationen ebenfalls nicht zu differenzieren sind und somit hohe Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Populationen zu bestehen scheinen.

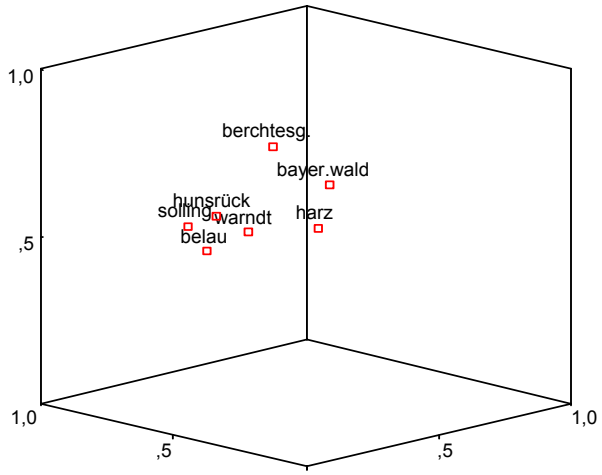


Abb. 55: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der EST-Alleltypenhäufigkeiten mit den EST-Primern PA0034, PA0043 und PA0066 (Varimax rotiert)**

Tab. 69: **Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der EST-Alleltypenhäufigkeiten mit den EST-Primern PA0034, PA0043 und PA0066 (vgl. Abb. 55) (Die Rotation ist in 7 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)**

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,483	,800	,356
Bayer. Wald	,498	,637	,587
Harz	,595	,480	,641
Hunsrück	,740	,533	,406
Solling	,789	,506	,343
Warndt	,719	,468	,504
Belau	,803	,410	,429

Zur Quantifizierung möglicher Unterschiede wurde als weiteres Ähnlichkeitsmaß für den Vergleich der Populationen die genetische Identität nach NEI (1972, 1978) berechnet. Aus Tab. 70 geht hervor, dass die Werte der genetischen Identität (nach NEI 1972) über alle Populationen betrachtet sehr hoch liegen bzw. formelbedingt teilweise sogar den theoretischen Maximalwert überschreiten (nach NEI 1978). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine weitere Differenzierung nicht möglich ist und dass alle mit diesem Verfahren untersuchten Populationen als genetisch annähernd identisch zu charakterisieren sind.

Tab. 70: Genetische Identitäten nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels EST untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,994	0,985	0,987	0,979	0,990	0,978
Bayer. Wald	1,002	-	0,997	0,984	0,977	0,988	0,983
Harz	0,992	1,004	-	0,984	0,981	0,989	0,988
Hunsrück	0,995	0,992	0,992	-	0,998	0,998	0,998
Solling	0,987	0,984	0,988	1,006	-	0,998	0,998
Warndt	0,998	0,996	0,997	1,006	1,005	-	0,997
Belau	0,986	0,990	0,995	1,005	1,006	1,004	-

5.2.4.2 Genetische Distanz und Genfluss

Die Berechnung der genetischen Distanz erfolgte ebenfalls nach den Verfahren von NEI (1972, 1978). Aus Tab. 71 wird deutlich, dass mit einem Maximalwert von Ds = 0,023 (Bayer.Wald/Solling) keine nennenswerten Distanzmaße im paarweisen Vergleich der Populationen errechnet werden konnten. Von einer eingehenderen Analyse der Unterschiede in den ermittelten Werten wird abgesehen.

Tab. 71: Genetische Distanzen nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels EST untersuchten Beständen

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,006	0,015	0,014	0,021	0,010	0,022
Bayer. Wald	-0,002	-	0,004	0,016	0,023	0,012	0,018
Harz	0,008	-0,004	-	0,016	0,019	0,011	0,012
Hunsrück	0,005	0,008	0,008	-	0,002	0,002	0,002
Solling	0,013	0,016	0,012	-0,006	-	0,003	0,002
Warndt	0,002	0,004	0,003	-0,006	-0,005	-	0,004
Belau	0,014	0,010	0,005	-0,005	-0,006	-0,004	-

Um Überinterpretationen zu vermeiden, wurde auf weiterführende bzw. auf den Distanzmaßen aufbauende Berechnungen verzichtet (z.B. *unrooted tree* mittels TREEVIEW 1.66, *isolation by distance*, Genflussschätzungen nach NEI 1987). Beispielhaft sei lediglich das Ergebnis der Clusteranalyse erwähnt, durch die eine Clusterung von zwei Gruppen (Berchtesgaden und Bayerischer Wald sowie Hunsrück, Solling, Warndt und Belau) erreicht wird. Die Bildung dieser Cluster ist durch die niedrigen Distanzmaße sicherlich nicht gerechtfertigt.

5.2.4.3 Genetische Diversität

Zur Berechnung der genetischen Diversität von durch codominante Marker charakterisierte Populationen existieren mehrere Maße. Der auf der Berechnung effektiver Allele (ne) aufbauende **Shannon-Information-Index** (vgl. Tab. 72) macht deutlich, dass sich die Populationen mit Werten von I = 0,650±0,048 (Harz) bis beispielsweise I = 0,684±0,016 (Berchtesgaden) hinsichtlich ihrer Diversität nicht voneinander unterscheiden lassen.

Tab. 72: ***Single-Population Descriptive Statistics*** **der mittels EST untersuchten Bestände (nach NEI 1987)**

	Anzahl beobacht. Allele (na)	Anzahl effektiver Allele (ne)	Shannons Information Index
Berchtesgaden	2 ± 0	1,96 ± 0,06	0,684 ± 0,016
Bayer. Wald	2 ± 0	1,90 ± 0,15	0,664 ± 0,046
Harz	2 ± 0	1,85 ± 0,15	0,650 ± 0,048
Hunsrück	2 ± 0	1,94 ± 0,07	0,678 ± 0,019
Solling	2 ± 0	1,92 ± 0,11	0,672 ± 0,031
Warndt	2 ± 0	1,94 ± 0,04	0,678 ± 0,011
Belau	2 ± 0	1,89 ± 0,12	0,663 ± 0,035

Für codominante Marker wird in zahlreichen Untersuchungen zusätzlich der **Heterozygotiegrad** als Diversitätsmaß herangezogen (vgl. u.a. BERGMANN & RUETZ 1991, HANSSON & WESTERBERG 2002). Im Rahmen dessen zeigt zwar auch *Nei's expected heterozygosity* (H_{exp}), dass sich die Populationen hinsichtlich ihrer Diversität nicht signifikant unterscheiden lassen, aber hier werden die Population von Berchtesgaden, Hunsrück und Warndt als leicht diverser charakterisiert, während die Harz-Population im Vergleich der Bestände etwas homogener zu sein scheint (vgl. Tab. 73).

Tab. 73: **Heterozygotie-Statistik der mittels EST untersuchten Bestände**

	Observed Homozyg.	Observed Heterozyg.	Expected Homozyg.	Expected Heterozyg.	Nei's exp. Heterozyg.
Berchtesgaden	0,244±0,051	0,756±0,051	0,501±0,016	0,499±0,016	0,491±0,016
Bayer. Wald	0,289±0,156	0,711±0,156	0,521±0,045	0,479±0,045	0,472±0,045
Harz	0,344±0,168	0,656±0,168	0,534±0,047	0,466±0,047	0,458±0,046
Hunsrück	0,267±0,176	0,733±0,176	0,507±0,019	0,493±0,019	0,485±0,019
Solling	0,300±0,145	0,700±0,145	0,513±0,031	0,487±0,031	0,479±0,030
Warndt	0,322±0,204	0,678±0,204	0,507±0,011	0,492±0,011	0,484±0,011
Belau	0,289±0,222	0,711±0,222	0,521±0,035	0,479±0,035	0,471±0,034

Da aber auch die hier ermittelten Maße aufgrund ihrer geringen Differenzierungseignung nicht überbewertet werden sollen, wurde auf weiterführende Betrachtungen (z.B. Shannon-Information-Index und *NEI's expected heterozygosity* für angenommene Gruppen) verzichtet.

Wie aus den bisherigen Ergebnissen deutlich wurde, sind die im Rahmen des angewendeten Verfahrens untersuchten Populationen zum einen durch geringe genetische Distanzen und durch vergleichsweise geringe genetische Diversitäten gekennzeichnet. Mit Hilfe des Programmes ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000) wurde deshalb in einem weiteren Schritt überprüft, auf welchen der beiden Faktoren – Variation innerhalb der Populationen, Variation zwischen Populationen – die ermittelte genetische Variabilität hauptsächlich zurückgeführt werden kann. Wie aus Tab. 74 hervorgeht ist die genetische Variation der nach diesem Verfahren untersuchten Fichten annähernd vollständig (> 99%) auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen.

Tab. 74: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels EST untersuchten Gruppen

	FG	SQ	Varianz (SQ/FG)	Varianz (%)	p-Wert	Fixation Index
zwischen Gruppen	1	2,1	0,010 Va	1,35	< 0,001	Φ_{CT} = 0,01351
zw. Pop. innerhalb der Gruppen	4	1,0	-0,008 Vb	-1,10	< 0,001	Φ_{SC} = -0,0111
innerhalb der Populationen	354	257,0	0,726 Vc	99,75	< 0,001	Φ_{ST} = 0,00255
gesamt	359	260,1	0,728	-	-	-

5.2.4.4 Zusammenfassung

Zur Ergänzung der bisher erhaltenen Ergebnisse wurden im Rahmen dieses Verfahrens zusätzlich codominante Markersysteme in Form der ESTs (*expressed sequence tags*) in die Untersuchung mit einbezogen. Diese Markersysteme wurden auf der Grundlage exprimierter DNA-Sequenzen entwickelt und können durch ihre funktionale Bedeutung im Stoffwechsel einen zusätzlichen Informationsgewinn darstellen. Dabei wurden drei der von RIEGEL (2001) und SCHUBERT et al. (2001) für *Picea abies* empfohlenen EST-Primer (PA0034, PA0043 und PA0066) auf ihre Eignung getestet, für die populationsgenetische Analyse als geeignet eingestuft und verwendet. Während die funktionale Bedeutung des PA0034-Locus noch unbekannt ist, weist der PA0043-Locus hohe Identität mit einem glucose-regulierten Protein von *N. tabacum* auf und der PA0066-Locus entspricht zu großen Teilen einem kälteinduzierten Protein von *B. napus*. Mit den drei verwendeten Markersystemen wurden jeweils lediglich zwei Allele (A, B) und somit in der Summe neun Alleltypen nachgewiesen. Die niedrige Markerzahl muss bei der Bewertung der angelegten populationsgenetischen Parameter berücksichtigt werden. Zur Charakterisierung der untersuchten Populationen wurden in einem ersten Schritt die Rohdaten der Allelhäufigkeiten verglichen. Daraus geht hervor, dass über alle drei Markersysteme in allen Populationen eine deutliche **Dominanz der Heterozygoten** (58,1% bis 87,1%) zu verzeichnen

ist, was als ein Hinweis auf diverse Populationen zu werten ist. Unterschiede zwischen den Populationen sind anhand dieses Parameters nicht nachweisbar. Hinsichtlich der genetischen Ähnlichkeit der Populationen konnte deutlich gemacht werden, dass sowohl unter Berechnung der Allelhäufigkeiten als auch mit Hilfe der Faktorenanalyse keine Differenzierung der Populationen möglich ist. Diese Ergebnisse konnten durch die Berechnung der genetischen Identitäten nach NEI (1972) bestätigt werden ($ID\varnothing_{Nei}$ = 0,989±0,007). Dementsprechend ergab die Berechnung der angewendeten Distanzmaße (nach NEI 1972, 1978) sehr niedrige genetische Distanzen ($DS_{\varnothing}$ = 0,011±0,007). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass aufgrund der geringen Markerzahl und der geringen Differenzierung der Alleltypenhäufigkeiten **die untersuchten Populationen mit Hilfe des EST-Verfahrens nicht zu differenzieren** sind. Um Überinterpretationen zu vermeiden, wurde aus diesem Grund auch auf weiterführende Berechnungen, wie dem *unrooted tree* (mittels TREEVIEW 1.66), der Überprüfung der *isolation by distance* sowie mögliche Genflussschätzungen (nach NEI 1987) verzichtet. Hinsichtlich des populationsgenetischen Parameters der genetischen Diversität bleibt festzuhalten, dass mit I = 0,670±0,030 im Vergleich zu anderen Verfahren mittlere Diversitätsmaße errechnet wurden. Allerdings sind in diesem Zusammenhang keine Unterschiede in den Diversitätsmaßen der Populationen nachweisbar, was vermutlich auf die Kombination von geringer Differenzierung und geringer Markerzahl zurückgeführt werden kann. Anhand NEI's erwarteter Heterozygotie (H_{exp}) werden aber die Population von Berchtesgaden, Hunsrück und Warndt als leicht diverser charakterisiert, während die Harz-Population vergleichsweise homogen zu sein scheint. Die abschließend vorgenommene Untersuchung der Unterteilung der Populationsstruktur zeigte auf, dass die **Variation annähernd vollständig durch die Unterschiede innerhalb der Populationen (99,75%) erklärt** werden kann. Die Variation zwischen den Populationen und die Variation zwischen den angenommenen Gruppen ist in diesem Zusammenhang vernachlässigbar.

5.2.5 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aller verwendeten Markersysteme

Im Rahmen der populationsgenetischen Analyse der sieben untersuchten *Picea abies*-Populationen wurden vier PCR-gestützte Markersysteme (RAPDs, ISSRs, SSRs und ESTs) verwendet. Die angewendeten Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich ihres Markertyps (dominant/codominant), ihrer Markerzahl (9-234) und somit auch hinsichtlich ihres Informationsgehaltes. Die je nach Methode ermittelten Ergebnisse weisen bei der isolierten Betrachtung spezifischer Aspekte zum Teil Gegensätzlichkeiten auf, zeigen aber einheitliche Tendenzen und die aus ihnen gewonnenen Informationen ergänzen sich wesentlich.

Die Bestimmung von Ähnlichkeitsmaßen (BSR), als erste Grundlage der genetischen Charakterisierung der Populationen, erbrachte anhand der RAPD- und ISSR-Marker mit minimalen

Werten von BSR_{BW} = 0,686±0,040 bzw. BSR_{So} = 0,688±0,040 **hohe Homogenitäten innerhalb der untersuchten Populationen**. Die mittleren Ähnlichkeiten zwischen den Individuen innerhalb der Populationen wurden mit BSR_{RAPD} = 0,719±0,043 bzw. BSR_{ISSR} = 0,760±0,075 errechnet. Die Überprüfung der Individuenähnlichkeit innerhalb einer Population konnte aufgrund der Codominanz von SSR- und EST-Markern nicht vergleichbar berechnet werden. In diesem Zusammenhang müssen die hohen Alleltypenzahlen (SSR) und die hohen Heterozygotiegrade (EST) als Hinweise für eine eher gering ausgeprägte Homogenität innerhalb der Populationen gewertet werden.

Zur Bestimmung von Ähnlichkeiten zwischen Populationen bzw. der genetischen Differenzierung von Populationen wurden zum einen deskriptive Verfahren wie BSR und Faktorenanalyse (Hauptkomponentenanalysen der Rohdaten sowie der Allelfrequenzen) verwendet. Zum anderen wurden populationsgenetische Parameter wie die genetische Identität (nach NEI 1972, 1978) und die genetische Distanz (nach LYNCH & MILLIGAN 1994 sowie nach NEI 1972, 1978) ermittelt. Anhand der für die RAPD- und ISSR-Daten berechneten BSR zwischen den Populationen wird deutlich, dass die Ähnlichkeiten zwischen den Individuen verschiedener Bestände etwas geringer sind als die innerhalb der Bestände, was als erster Hinweis einer schwachen Differenzierung der Populationen gewertet werden kann. Die Hauptkomponentenanalysen erbrachten dagegen keine wesentlichen Differenzierungen der untersuchten Bestände. Die Werte der angewandten populationsgenetischen Parameter ergaben ebenfalls, dass zwischen den untersuchten Populationen lediglich von geringen genetischen Differenzierungen auszugehen ist (mittlere genetische Distanzen nach NEI 1972: Ds_{RAPD} = 0,083±0,020, Ds_{ISSR} = 0,181±0,083, Ds_{SSR} = 0,109±0,058, Ds_{EST} = 0,011±0,007). Wenn auch nach ISSR- und SSR-Analyse zwischen einigen Populationen vergleichsweise hohe Distanzmaße errechnet wurden, so bleibt in der Gesamtbetrachtung aller Marker festzuhalten, dass nach Anlage aller populationsgenetischen Parameter nur **geringe genetische Differenzierungen zwischen den Populationen** zu bestehen scheinen. Dies kann auch durch die jeweiligen Clusteranalysen bestätigt werden. Die Clusterdiagramme bzw. die *unrooted trees* der Distanzmaße zeigen nur geringe Differenzierungen zwischen den Populationen.

Da eine Differenzierung der Populationen über die Distanzmaße nicht möglich ist, wurde zusätzlich überprüft, ob eine Differenzierung über die geographische Entfernung gegeben ist (***isolation by distance***-Modell). Grundlage dieses Modells ist, dass mit zunehmender geographischer Entfernung die Wahrscheinlichkeit des Genaustauschs sinkt und deshalb die Maße der genetischen Distanz ansteigen. Die Überprüfung der Beziehung von genetischer und geographischer Distanz erbrachte keinen Zusammenhang (R^2_{RAPD} = 0,007, R^2_{ISSR} = 0,066, R^2_{SSR} = 0,109). Aufgrund der niedrigen EST-Distanzmaße wurde hier auf die entsprechende Berechnung verzichtet.

Dass zwischen den untersuchten Populationen nur geringe genetische Distanzen bestehen, wird zudem durch eine zusätzlich durchgeführte Untersuchung an **gepoolten Proben** bekräftigt (vgl. Kap. 5.4). Hierbei wurden die DNA-Stammlösungen der jeweils 30 Indivduen pro Population gepoolt und als Mischprobe mittels RAPD, ISSR, SSR und EST analysiert. Wenn die Ergebnisse auch als

markersystemspezifisch bezeichnet werden müssen, so werden auch zwischen den Poolproben **keine nennenswerten Distanzmaße** berechnet.

Hinsichtlich der Betrachtung der genetischen Distanzen erscheint aber besonders erwähnenswert, dass **anhand der ISSR-Analyse** deutlich **höhere Ähnlichkeiten innerhalb der Gruppe der Populationen, die aus dem natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte stammen** (Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz), zu verzeichnen war als zwischen den übrigen Populationen. Die Hypothese, dass diese drei Populationen vermutlich größtenteils aus ortsangepasster Naturverjüngung aufgebaut bzw. möglicherweise autochthonen Ursprungs sind, und sich deshalb als Gruppe gegenüber den aus forstlichem Saat- bzw. Pflanzgut aufgebauten Beständen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes abgrenzen lassen müssten, konnte aber lediglich mit dem ISSR-Verfahren bestätigt werden.

Allerdings zeigen die mit Hilfe des Programmes POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999) durchgeführten Genflussschätzungen zwischen den angenommenen Gruppen unabhängig von der verwendeten Methode, dass der **Genfluss innerhalb der Gruppe der Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte größer ist, als zwischen den übrigen Populationen**. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass zwischen den „natürlichen" Populationen ein vergleichsweise höherer Genaustausch oder ein entwicklungsgeschichtlicher Zusammenhang zu bestehen scheint.

Hinsichtlich der weiteren Charakterisierung der Populationen wurden Berechnungen der genetischen Diversität nach den Verfahren von LYNCH & MILLIGAN (1994) und SHANNON (1949) sowie Berechnungen von *NEI's expected heterozygosity* vorgenommen. Die errechneten Diversitätsmaße sind stark methodenabhängig und variieren z.T. beträchtlich. Anhand der dominanten Markersysteme konnte gezeigt werden, dass durchschnittlich hohe genetische Diversitäten errechnet wurden, und dass die ISSR-Marker trotz geringerer Markerzahl deutlich diversere Populationen vermuten lassen ($\hat{H}ø_{RAPD}$ = 0,232±0,013, $\hat{H}ø_{ISSR}$ = 0,326±0,024). Während für die codominanten Markersysteme die Berechnung von *NEI's expected heterozygosity* aufzeigt, dass mittels SSR höhere genetische Diversitäten als mittels EST ermittelt werden, können die Diversitätswerte über alle Methoden anhand des Shannon-Information-Index verglichen werden. Die höchsten Diversitätsmaße wurden mit den SSR-Markern ($Iø_{SSR}$ = 1,091) und den EST-Markern ($Iø_{EST}$ = 0,670) berechnet, wohingegen mit den beiden dominanten Markersystemen mit $Iø_{RAPD}$ = 0,326 und $Iø_{ISSR}$ = 0,398 vergleichbar niedrigere Diversitätsmaße ermittelt wurden. Aus der Gesamtbetrachtung aller Markersysteme kann geschlossen werden, dass es sich bei den **Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Warndt** um die **genetisch diverseren** handelt, während der Bestand des **Harzes** als die **homogenste der untersuchten Population** charakterisiert werden muss.

Alle bisherigen Ergebnisse zusammenfassend wurde mit Hilfe des Programmes ARLEQUIN 2.0 (SCHNEIDER et al. 2000) in einem weiteren Schritt überprüft, ob eine genetische Strukturierung der Grundgesamtheit vorliegt. Hierbei wurde überprüft, auf welche Ursache – Differenzierung der

Individuen innerhalb der Populationen, Differenzierung zwischen Populationen, Differenzierung in Gruppen – die ermittelte genetische Variabilität hauptsächlich zurückgeführt werden kann. Mit allen vier verwendeten Methoden konnte deutlich gemacht werden, dass die ermittelte **Variabilität hauptsächlich auf die Variation innerhalb der untersuchten Populationen zurückzuführen** ist (65% bis 99,75%). Während in den meisten Fällen der Rest durch die Variation zwischen den Populationen erklärt werden kann (3% bis 27%), spielt die Variation der Gruppen in den meisten Fällen keine Rolle. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang aber, dass anhand der ISSR-Daten 20% der Variation durch die Variation innerhalb der Gruppen erklärt wird.

Tab. 75: Übersicht über die Ergebnisse der populationsgenetischen Analysen (RAPD, ISSR, SSR und EST)

	RAPD	ISSR	SSR	EST
Markerzahl	234	36	34	9
Homogenität der Populationen	hoch	hoch	n.b.	n.b.
genet. Distanz zwischen Populationen	geringe Distanzen	geringe Distanzen in nat. Gruppe, sonst hohe Distanzen	geringe Distanzen (einige Ausreißer)	geringe Distanzen
isolation by distance	nein	nein	nein	nein
Genfluss zwischen Gruppen	innerhalb Verbr.-gebiet> außerhalb Verbr.-gebiet	innerhalb Verbr.-gebiet> außerhalb Verbr.-gebiet	innerhalb Verbr.-gebiet> außerhalb Verbr.-gebiet	innerhalb Verbr.-gebiet> außerhalb Verbr.-gebiet
genetische Diversität	hoch	hoch	sehr hoch (viele Alleltypen)	hoch (hoher Heterozygotiegrad)
hohe genetische Diversität in Pop.	in Pop. von BW	in Pop. von Be, So und Wa	in Pop. von Be, BW, Wa und BS	in Pop. von Be, Hu und Wa
Ursache der Variation	Variabilität innerhalb Population (ca. 73%)	Variabilität innerhalb Population (ca. 65%)	Variabilität innerhalb Population (ca 96%)	Variabilität innerhalb Population (>99%)
Besonderheiten	-	Gruppenhypothese wird bestätigt	-	-
Fazit	statistisch belast-barste Markerzahl	einziges Marker-system, das die Gruppenhypothese bestätigt	Ergebnisse ähnlich zu RAPD-PCR	geringe Markerzahl, schwierige Inter-pretation

5.3 Exkurs: RAPD- und ISSR-Analyse eines autochthonen Fichtenbestandes

Zusätzlich zu den in Kap. 5.2 dargestellten populationsgenetischen Untersuchungen der beschriebenen Bestände wurde, wie in Kap. 3.1.3 bereits angedeutet, auch Nadelmaterial von zwölf vermutlich autochthonen Fichten (Nationalpark Hochharz) gesammelt und molekulargenetisch analysiert. Aus technischen Gründen wurden die Analysen lediglich mit dem RAPD- und dem ISSR-Verfahren durchgeführt. 130 der für die **RAPD-Analyse** verwendeten 234 RAPD-Marker (vgl. Kap. 5.2.1) konnten in den Harzfichten als polymorph klassifiziert werden. 75 Marker konnten nicht nachgewiesen werden, 29 waren für die zwölf untersuchten Individuen monomorph. 22 der für die **ISSR-Analyse** verwendeten 36 ISSR-Marker (vgl. Kap. 5.2.2) waren als polymorph anzusprechen, während drei Marker nicht nachgewiesen werden konnten und weitere elf Marker als monomorph klassifiziert wurden.

Populationsspezifische Marker, d.h. DNA-Fragmente, die ausnahmslos in den zwölf Individuen nachgewiesen wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Differenzierung des Bestandes von den übrigen anhand eines einzelnen Markers war somit nicht möglich. Deshalb wurden um Ähnlichkeiten bzw. Differenzierungen zwischen den Individuen und Populationen zu ermitteln auch hier die oben bereits beschriebenen deskriptiven und populationsgenetischen Parameter bestimmt.

Die in der Folge dargestellten Ergebnistabellen beinhalten teilweise bereits präsentierte Ergebnisse, sind jedoch unter besonderer Berücksichtigung der hier speziell im Blickpunkt stehenden Harzfichten zu lesen.

5.3.1 Genetische Ähnlichkeit

Hinsichtlich des Ähnlichkeitsmaßes der BSR konnte gezeigt werden, dass die mittels **RAPD** ermittelten Ähnlichkeiten der untersuchten autochthonen Fichten innerhalb des Wertebereichs der übrigen Populationen liegen (vgl. Tab. 76). Anhand dieser Daten ist keine Aussage dazu möglich, ob autochthone Fichten untereinander höhere oder evtl. auch niedrigere Ähnlichkeitsmaße aufweisen als forstlich begründete Bestände (vgl. Abb. 56). Im Vergleich mit den übrigen Populationen zeigt sich, dass die höchsten Ähnlichkeiten zwischen den autochthonen Fichten und dem Warndt bestehen, wenngleich sich die Ähnlichkeitsmaße zwischen den autochthonen Harzfichten und den übrigen Populationen nicht unterscheiden (vgl. Tab. 76 und Abb. 57). Deswegen erscheint in diesem Zusammenhang lediglich erwähnenswert, dass die hier betrachteten Individuen gegenüber dem räumlich ca. 200 m entfernten anderen Harzbestand (Ha) keine höheren Ähnlichkeiten aufweisen, als gegenüber den anderen Populationen.

Tab. 76: BSR innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autocht.)
Be	**0,692±0,043**	0,569±0,033	0,574±0,038	0,573±0,035	0,561±0,035	0,589±0,038	0,592±0,038	0,570±0,037
BW		**0,686±0,040**	0,641±0,032	0,585±0,030	0,639±0,032	0,628±0,033	0,601±0,031	0,579±0,035
Ha			**0,740±0,037**	0,633±0,030	0,645±0,033	0,672±0,034	0,635±0,033	0,607±0,031
Hu				**0,748±0,037**	0,624±0,032	0,632±0,032	0,605±0,033	0,604±0,035
So					**0,728±0,036**	0,643±0,033	0,619±0,032	0,584±0,034
Wa						**0,721±0,033**	0,659±0,033	0,613±0,032
BS							**0,720±0,038**	0,582±0,033
Hx								**0,716±0,037**

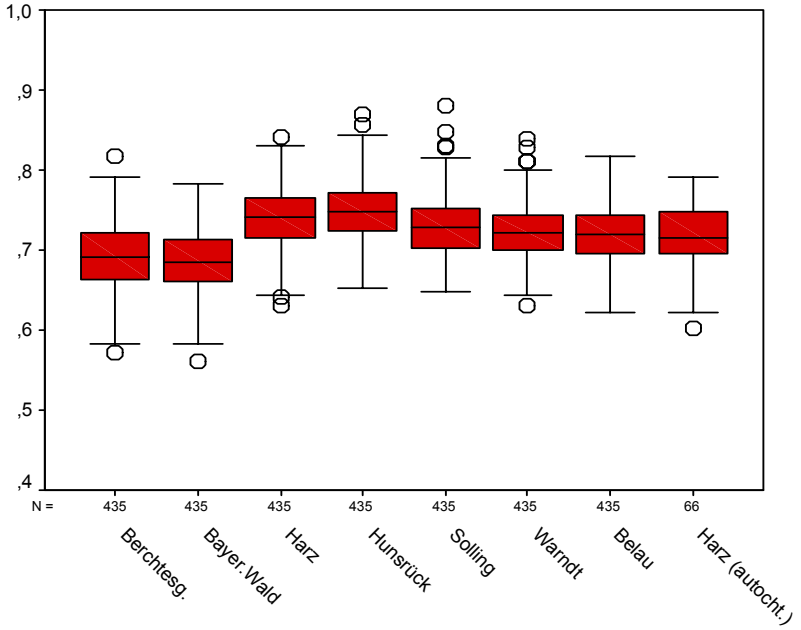


Abb. 56: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels RAPD untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

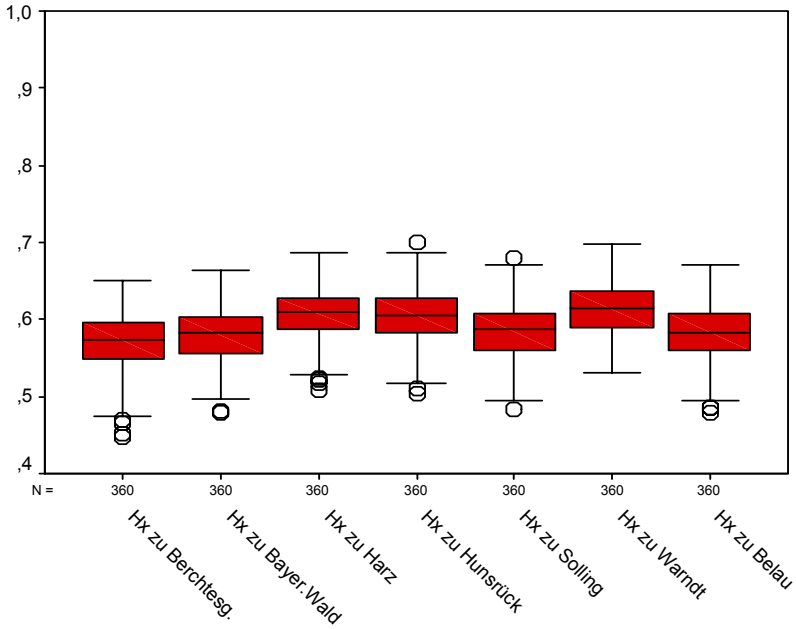


Abb. 57: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels RAPD untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

Auch hinsichtlich der mittels **ISSR** ermittelten BSR liegen die Ähnlichkeitsmaße der autochthonen Fichten innerhalb der Schwankungsbreiten der übrigen Populationen (vgl. Tab. 77 und Abb. 58). Im Vergleich mit den übrigen Populationen zeigt sich, dass die höchsten Ähnlichkeiten zwischen den autochthonen Fichten und dem Harz bestehen (vgl. Tab. 77). Insgesamt werden nach diesem Verfahren größere Unterschiede in den Ähnlichkeitsmaßen deutlich. Am auffälligsten sind die signifikant ($p<0,05$) höheren Ähnlichkeiten der Harzfichten zu den Individuen von Berchtesgaden, dem Bayerischen Wald und dem Harz (vgl. Abb. 59).

Tab. 77: BSR innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autocht.)
Be	**0,768±0,094**	0,741±0,069	0,731±0,070	0,633±0,062	0,590±0,081	0,668±0,070	0,610±0,076	0,724±0,067
BW		**0,789±0,055**	0,735±0,061	0,678±0,058	0,627±0,076	0,714±0,057	0,662±0,070	0,724±0,058
Ha			**0,788±0,063**	0,604±0,062	0,577±0,082	0,655±0,068	0,591±0,067	0,774±0,053
Hu				**0,761±0,059**	0,699±0,074	0,699±0,060	0,684±0,070	0,599±0,063
So					**0,688±0,076**	0,648±0,076	0,691±0,072	0,573±0,081
Wa						**0,766±0,061**	0,688±0,063	0,654±0,069
BS							**0,757±0,063**	0,600±0,075
Hx								**0,767±0,053**

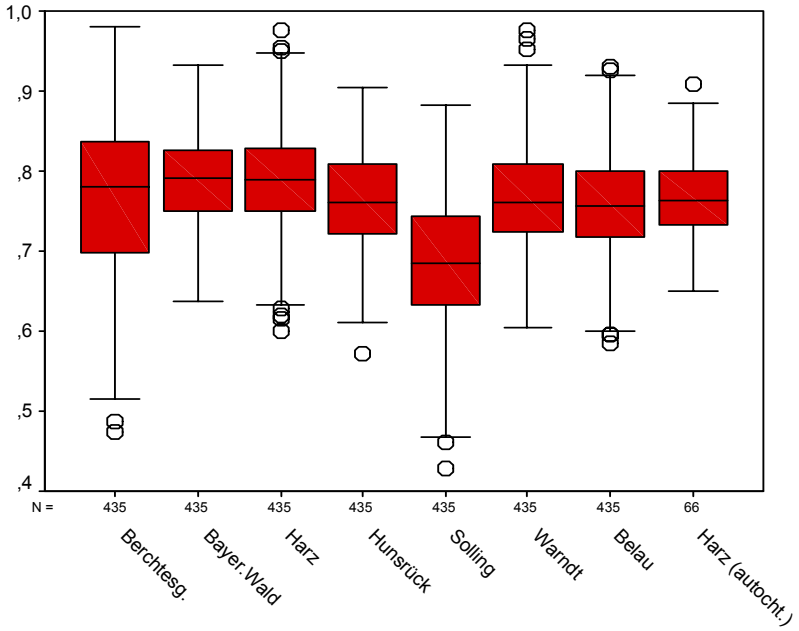


Abb. 58: **Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen innerhalb der mittels ISSR untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harz-fichten**

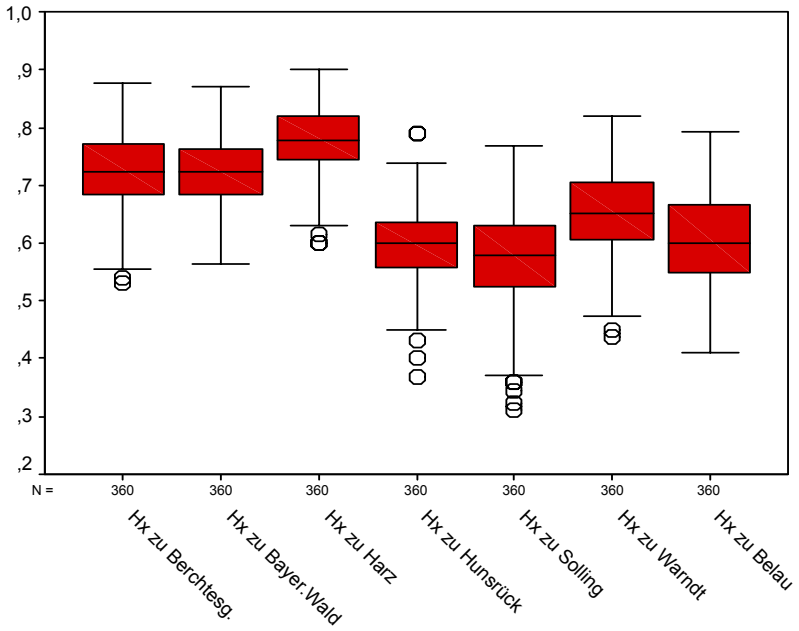


Abb. 59: **Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (BSR) der Individuen verschiedener mittels ISSR untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harz-fichten**

Neben der Darstellung der Ähnlichkeitsmaße wurden die mittels RAPD bzw. ISSR ermittelten binären Rohdaten bzw. die daraus abgeleiteten Allelfrequenzen einer Faktorenanalyse unterzogen. Aufgrund

der schlechten Lesbarkeit der Punktwolke und der mangelnden Differenzierung in der zugehörigen Matrix wurde hier auf die Darstellung der Komponentendiagramme der Einzelindividuen (Rohdaten) verzichtet.

Im Komponentendiagramm der **RAPD-Allelfrequenzen** (vgl. Abb. 60) sowie in der entsprechenden Komponentenmatrix (vgl. Tab. 78) wird deutlich, dass nach dieser Methode die autochthonen Harzfichten in die Nähe der Hunsrück-Population gerückt werden. Prinzipiell handelt es sich hier allerdings um sehr geringe Differenzierungen, die nicht überbewertet werden sollten.

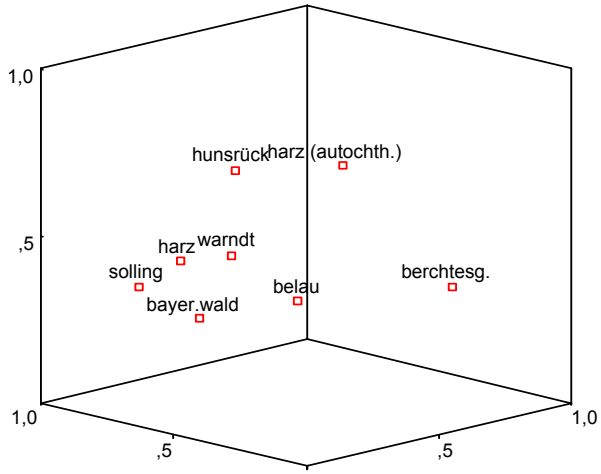


Abb. 60: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (Varimax rotiert)**

Tab. 78: **Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Allelfrequenzen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (vgl. Abb. 60) (Die Rotation ist in 8 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)**

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,301	,320	,848
Bayer. Wald	,780	,221	,377
Harz	,747	,418	,275
Hunsrück	,453	,763	,187
Solling	,812	,348	,181
Warndt	,698	,420	,416
Belau	,610	,268	,580
Harz (autocht.)	,265	,772	,403

Werden die **ISSR-Allelfrequenzen** als Rohdaten verwendet, so zeigt sich, dass hinsichtlich der autochthonen Harzfichten eine deutliche Differenzierung erreicht wird (vgl. Abb. 61). Aus der

zugehörigen Komponentenmatrix kann abgelesen werden, dass diese Individuen in die Nähe der Populationen des Harzes, des Bayerischen Waldes, des Warndts und der Berchtesgadener Alpen eingeordnet werden (vgl. Tab. 79). Aufgrund der geringen Stichprobengröße sollte diese „Randstellung“ allerdings ebenfalls nicht überbewertet werden.

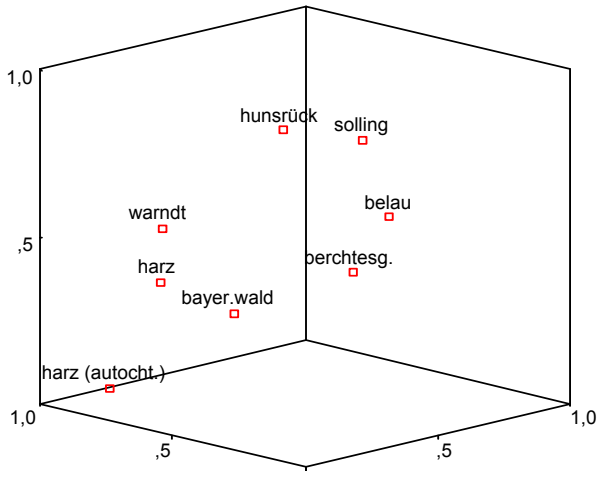


Abb. 61: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen (Prozentuale Anteile) unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (Varimax rotiert)**

Tab. 79: **Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Allelfrequenzen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (vgl. Abb. 61) (Die Rotation ist in 6 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)**

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,538	,343	,721
Bayer. Wald	,764	,219	,500
Harz	,839	,338	,295
Hunsrück	,248	,930	,169
Solling	,102	,900	,320
Warndt	,727	,541	,191
Belau	,354	,554	,672
Harz (autocht.)	,941	,018	,208

Neben diesen deskriptiven Verfahren wurde zur Darstellung der genetischen Ähnlichkeit der autochthonen Harzfichten der Polymorphiegrad mittels RAPD (vgl. Tab. 80) und mittels ISSR (vgl. Tab. 81) bestimmt und den übrigen Populationen gegenüber gestellt. Aus beiden Tabellen wird ersichtlich, dass die untersuchten Harzfichten wesentlich weniger polymorphe Marker aufweisen und deshalb durch geringere Polymorphiegrade charakterisiert sind. Ob es sich bei diesem Phänomen

tatsächlich um höhere Monomorphie innerhalb dieser Population handelt, oder ob dies durch die geringere Stichprobenzahl erklärt werden muss, wird in Kap. 6.1.2 diskutiert.

Tab. 80: *Single-Population Descriptive Statistics* der mittels RAPD untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (nach NEI 1987)

	Anzahl polymorpher Marker	%	Anzahl beobachteter Allele (na)	Anzahl effektiver Allele (ne)
Berchtesgaden	159	67,95	1,680 ± 0,468	1,315 ± 0,332
Bayer. Wald	201	85,90	1,859 ± 0,359	1,431 ± 0,346
Harz	158	67,52	1,675 ± 0,469	1,329 ± 0338
Hunsrück	164	70,09	1,701 ± 0,459	1,297 ± 0,325
Solling	165	70,51	1,705 ± 0,457	1,368 ± 0,350
Warndt	166	70,94	1,709 ± 0,455	1,333 ± 0,329
Belau	160	68,38	1,684 ± 0,467	1,339 ± 0,346
Harz (autocht.)	**130**	**55,56**	**1,556 ± 0,498**	**1,309 ± 0,351**

Tab. 81: *Single-Population Descriptive Statistics* der mittels ISSR untersuchten Bestände unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (nach NEI 1987)

	Anzahl polymorpher Marker	%	Anzahl beobachteter Allele (na)	Anzahl effektiver Allele (ne)
Berchtesgaden	29	80,56	1,806 ± 0,401	1,451 ± 0,344
Bayer. Wald	26	72,22	1,722 ± 0,454	1,429 ± 0,358
Harz	30	72,22	1,722 ± 0,454	1,380 ± 0,364
Hunsrück	29	80,56	1,806 ± 0,401	1,421 ± 0,341
Solling	30	83,33	1,833 ± 0,378	1,501 ± 0,338
Warndt	25	69,44	1,694 ± 0,467	1,517 ± 0,411
Belau	30	83,33	1,833 ± 0,378	1,437 ± 0,360
Harz (autocht.)	**22**	**61,11**	**1,611 ± 0,494**	**1,408 ± 0,381**

Die bisher getroffenen Ergebnisse werden auch hinsichtlich der Ermittlung der genetischen Identität bestätigt. Während mittels **RAPD** keine Auffälligkeiten zu vermerken sind (vgl. Tab. 82), zeigen die genetischen Identitäten nach dem **ISSR-Verfahren** deutlich engere „verwandtschaftliche Beziehungen“ zwischen den autochthonen Harzfichten und den Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte (vgl. Tab. 83).

Tab. 82: Genetische Identitäten nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett)

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	-	0,874	0,860	0,862	0,848	0,886	0,889	**0,872**
Bayer. Wald	0,878	-	0,914	0,856	0,914	0,911	0,884	**0,863**
Harz	0,864	0,918	-	0,884	0,898	0,933	0,897	**0,871**
Hunsrück	0,865	0,856	0,888	-	0,877	0,894	0,869	**0,870**
Solling	0,852	0,919	0,902	0,881	-	0,907	0,883	**0,850**
Warndt	0,889	0,916	0,937	0,898	0,911	-	0,931	**0,888**
Belau	0,893	0,886	0,901	0,873	0,887	0,936	-	**0,860**
Harz (autoch.)	**0,878**	**0,870**	**0,877**	**0,876**	**0,856**	**0,894**	**0,866**	-

Tab. 83: Genetische Identitäten nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett)

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	-	0,926	0,918	0,778	0,769	0,818	0,745	**0,911**
Bayer. Wald	0,931	-	0,907	0,833	0,810	0,879	0,812	**0,893**
Harz	0,923	0,912	-	0,740	0,758	0,797	0,724	**0,976**
Hunsrück	0,783	0,838	0,744	-	0,947	0,881	0,874	**0,736**
Solling	0,774	0,815	0,763	0,953	-	0,856	0,940	**0,758**
Warndt	0,825	0,885	0,802	0,887	0,862	-	0,866	**0,801**
Belau	0,750	0,816	0,728	0,879	0,946	0,871	-	**0,741**
Harz (autoch.)	**0,920**	**0,902**	**0,985**	**0,743**	**0,766**	**0,809**	**0,748**	-

5.3.2 Genetische Distanz und Genfluss

Die Berechnung der genetischen Distanz erfolgte sowohl für die RAPD- als auch für die ISSR-Analyse durch Schätzungen nach der Vorgehensweise von LYNCH & MILLIGAN (1994) sowie nach der Berechnungsgrundlage von NEI (1972, 1978) mittels POPGENE 1.32 (YEH et al. 1999).

Das Verfahren nach LYNCH & MILLGAN (1994) weist für die **RAPD-Daten** mit Werten von $D_{BW/Hx}$ = 0,066 bis $D_{So/Hx}$ = 0,089 im Vergleich zu den Distanzmaßen der übrigen RAPD-Analyse leicht höhere Distanzen zwischen den Populationen auf (vgl. Tab. 84). Es zeigt sich auch hier, dass die genetische Distanz zwischen den beiden räumlich nah zusammenliegenden Harzpopulationen nicht geringer ist als im Vergleich zu den übrigen Populationen.

Tab. 84: Genetische Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	-	0,066	0,088	0,088	0,090	0,071	0,062	**0,072**
Bayer. Wald		-	0,047	0,089	0,053	0,041	0,060	**0,066**
Harz			-	0,071	0,062	0,032	0,057	**0,075**
Hunsrück				-	0,075	0,066	0,080	**0,080**
Solling					-	0,051	0,070	**0,089**
Warndt						-	0,030	**0,062**
Belau							-	**0,079**
Harz (autoch.)								-

Werden die ermittelten Distanzmaße einer Clusteranalyse unterzogen, so führt dies zu einer Eingruppierung der Harzfichten in eine Gruppe mit den Populationen von Berchtesgaden und des Hunsrücks (vgl. Abb. 62). Allerdings befindet sich diese Differenzierung auf einem sehr niedrigen Niveau, so dass die Dendrogrammdarstellung sicherlich kritisch betrachtet werden muss (vgl. Distanzmaß zur Warndt-Population).

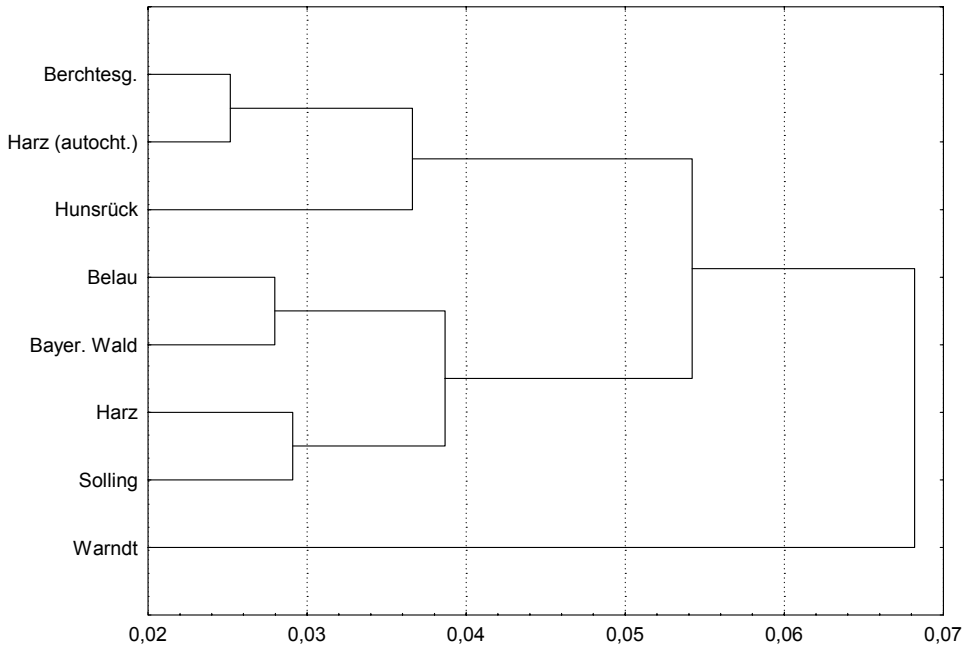


Abb. 62: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, Eukl. Distanzen)

Die mittels **ISSR** ermittelten genetischen Distanzen zwischen den autochthonen Harzfichten und den übrigen Populationen spiegeln die Ergebnisse der mittels ISSR erhaltenen genetischen Ähnlichkeit wieder. Es zeigt sich, dass die höchsten Distanzmaße zwischen den autochthonen Fichten und den Beständen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte bestehen, während lediglich sehr geringe Distanzen zu den Individuen aus Berchtesgaden, dem Bayerischen Wald und dem Harz nachgewiesen werden (vgl. Tab. 85).

Tab. 85: Genetische Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	-	0,126	0,053	0,225	0,183	0,160	0,233	**0,068**
Bayer. Wald		-	0,064	0,158	0,178	0,127	0,166	**0,052**
Harz			-	0,190	0,129	0,145	0,192	**0,066**
Hunsrück				-	0,040	0,165	0,100	**0,226**
Solling					-	0,133	0,066	**0,214**
Warndt						-	0,124	**0,171**
Belau							-	**0,275**
Harz (autoch.)								-

Dementsprechend werden bei der Clusterung der Distanzmaße die autochthonen Harzfichten mit den Populationen von Berchtesgaden, des Bayerischen Waldes und des Harzes zusammengruppiert. Aus dem Dendrogramm kann die starke Trennung dieser Gruppe von den Beständen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes deutlich herausgelesen werden (vgl. Abb. 63).

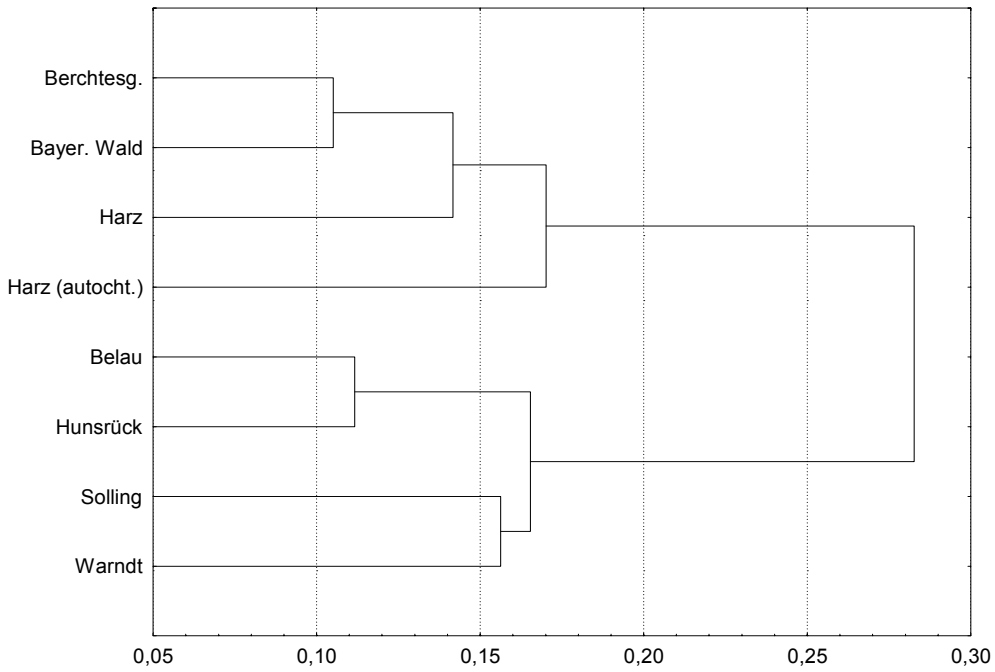


Abb. 63: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, Eukl. Distanzen)

Die weiteren Berechnungen zur genetischen Distanz nach NEI (1972, 1978) bestätigen die jeweiligen Ergebnisse der RAPD- bzw. ISSR-Analyse nach LYNCH & MILLIGAN (1994) und werden deshalb lediglich der Vollständigkeit halber dargestellt (vgl. Tab. 86, Abb. 64+Abb. 65, Tab. 87, Abb. 66+Abb. 67).

Tab. 86: Genetische Distanzen nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett)

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	-	0,135	0,151	0,149	0,165	0,122	0,117	**0,137**
Bayer. Wald	0,130	-	0,090	0,156	0,090	0,093	0,123	**0,147**
Harz	0,146	0,085	-	0,123	0,108	0,070	0,108	**0,139**
Hunsrück	0,145	0,151	0,119	-	0,131	0,112	0,140	**0,140**
Solling	0,160	0,085	0,104	0,127	-	0,098	0,124	**0,163**
Warndt	0,117	0,088	0,065	0,108	0,093	-	0,071	**0,119**
Belau	0,113	0,118	0,104	0,136	0,120	0,067	-	**0,151**
Harz (autoch.)	**0,130**	**0,139**	**0,131**	**0,133**	**0,156**	**0,112**	**0,144**	-

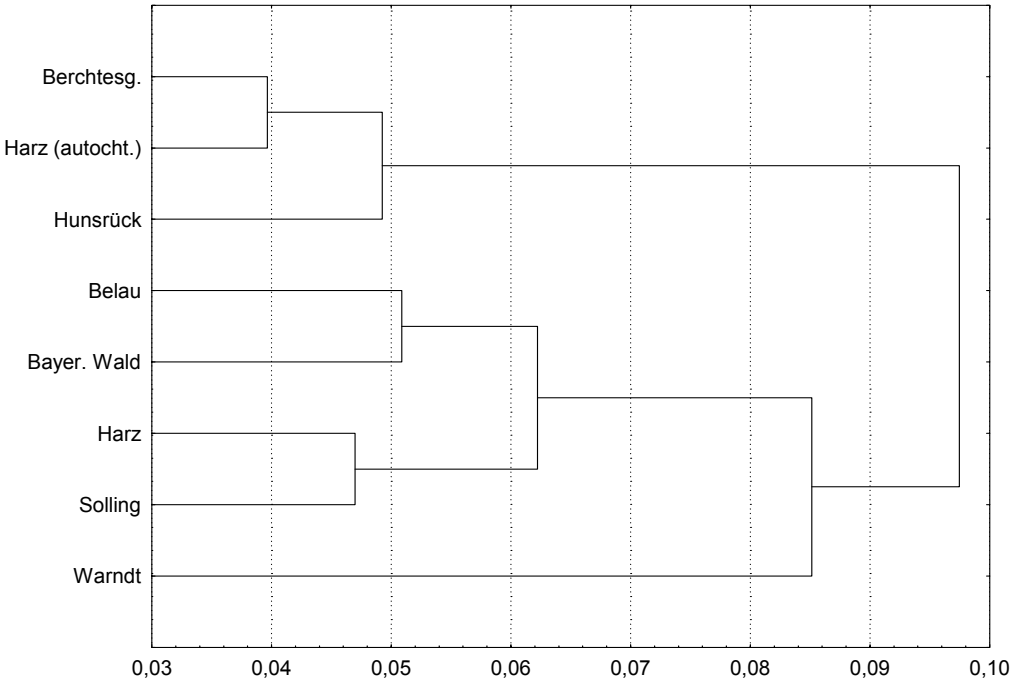


Abb. 64: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, Eukl. Distanzen)

Die in der Dendrogrammdarstellung der Clusteranalyse getroffene Gruppierung wird durch den *unrooted tree* (TREEVIEW 1.66, PAGE 2001) relativiert. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass die wesentlichen Differenzierungen zwischen den Populationen auf die Differenzierungen innerhalb der Populationen zurückzuführen sind (vgl. Abb. 65).

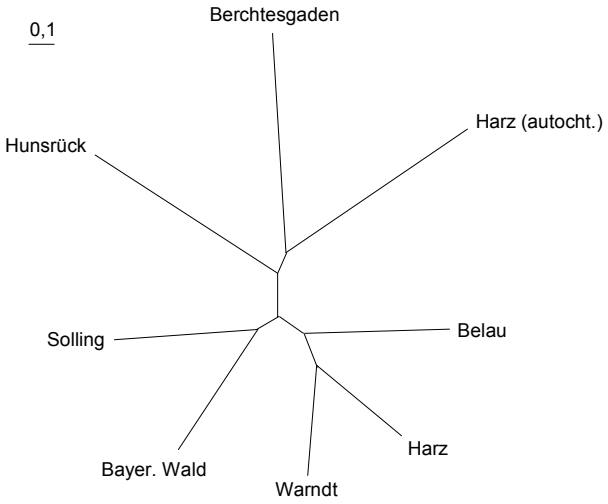


Abb. 65: *Unrooted tree* der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, modifiziert nach *Neigbor*-Methode mittels PHYLIP 3.5)

Tab. 87: Genetische Distanzen nach NEI (1972, oberhalb der Diagonalen) und NEI (1978, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (fett)

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	-	0,077	0,086	0,251	0,263	0,200	0,294	**0,093**
Bayer. Wald	0,071	-	0,098	0,183	0,211	0,129	0,209	**0,113**
Harz	0,080	0,092	-	0,301	0,276	0,227	0,323	**0,025**
Hunsrück	0,245	0,177	0,296	-	0,054	0,127	0,135	**0,306**
Solling	0,256	0,205	0,270	0,048	-	0,156	0,032	**0,278**
Warndt	0,193	0,122	0,221	0,120	0,149	-	0,144	**0,222**
Belau	0,288	0,203	0,318	0,056	0,129	0,138	-	**0,300**
Harz (autoch.)	**0,083**	**0,103**	**0,016**	**0,297**	**0,267**	**0,212**	**0,290**	-

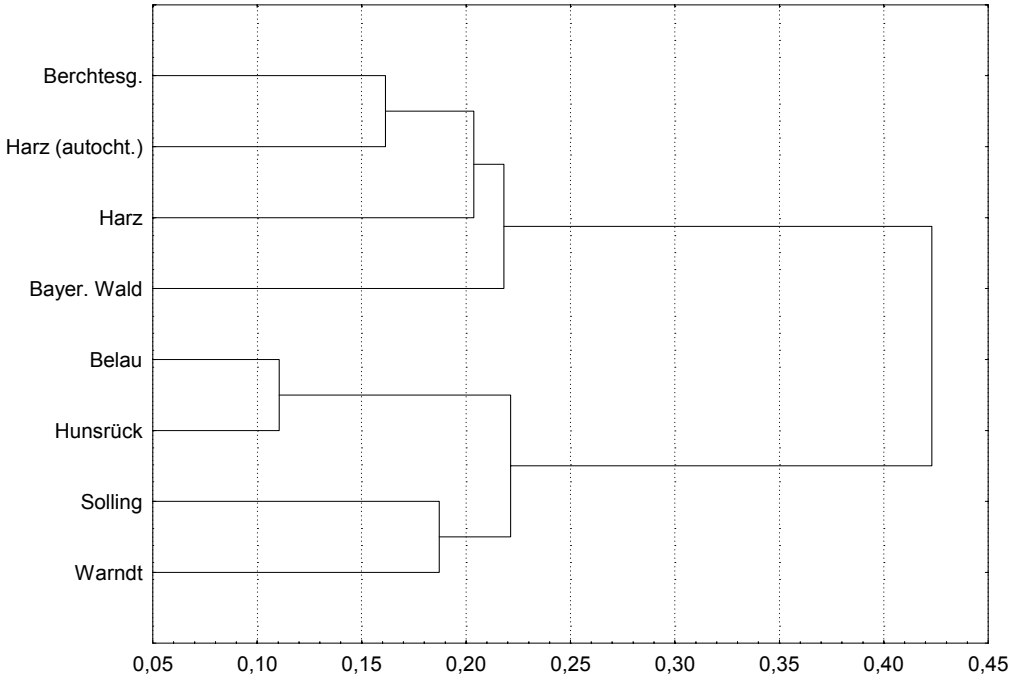


Abb. 66: Dendrogramm der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

Die bereits mehrfach erwähnte Gruppenbildung wird durch die Art der Darstellung des *unrooted tree* (TREEVIEW 1.66; PAGE 2001) ebenfalls deutlich. Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die beiden Harzpopulationen zusammengruppiert werden (vgl. Abb. 67). Die Astlänge deutet an, dass sich die Differenzierung zwischen diesen beiden Harzpopulationen mittels ISSR-Analyse auf einem sehr niedrigen Niveau befindet.

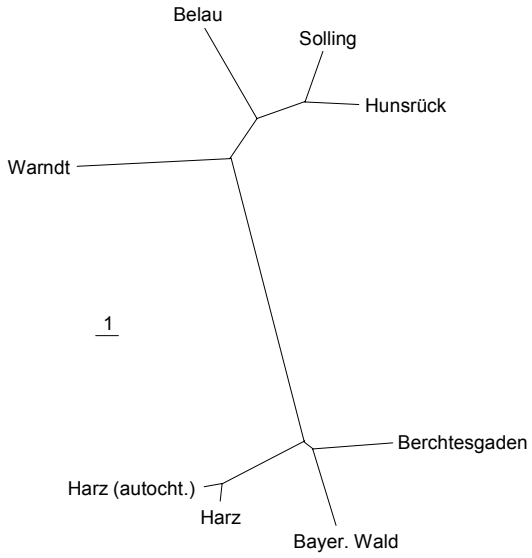


Abb. 67: ***Unrooted tree*** **der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (UPGMA, modifiziert nach *Neigbor*-Methode mittels PHYLIP 3.5)**

Zusätzlich zu den bisherigen Analysen wurden sowohl anhand der RAPD- als auch anhand der ISSR-Daten Genflussschätzungen zwischen den bereits beschriebenen Gruppen unternommen. Das Verfahren unterscheidet sich von den vorhergehenden dadurch, dass die zwölf untersuchten autochthonen Harzfichten zu der Gruppe der Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes zugefügt wurden. Anhand der **RAPD-Daten** wird deutlich, dass der Genfluss zwischen den Individuen des natürlichen Verbreitungsgebietes geringer ist als zwischen denen außerhalb des Gebietes. Da der Wert von Nm* = 1,420 deutlich niedriger ist als die Genflussrate ohne die autochthonen Harzfichten (Nm* = 1,773, vgl. Kap. 5.2.1.2) muss davon ausgegangen werden, dass die hier berücksichtigten Harzfichten die Rate negativ beeinflussen und insbesondere zwischen den Harzfichten und den übrigen Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes ein geringerer Genaustausch besteht. Wenn auch die Genflussraten durch die **ISSR-Daten** deutlich höher geschätzt werden, so hat die Einbeziehung der autochthonen Harzfichten denselben Effekt: Die Genflussrate von Nm* = 3,005 (vgl. Kap. 5.2.2.2) wird auf Nm* = 2,792 gesenkt. In diesem Zusammenhang muss allerdings zusätzlich erwähnt werden, dass die ISSR-Ergebisse stärkeren Genaustausch innerhalb der Gruppe des natürlichen Verbreitungsgebietes vermuten lassen, was den Ergebnissen der RAPD-Analyse widerspricht.

Tab. 88: Genfluss (nach NEI 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (RAPD)

	n	polys	%	Ht	Hs	GST	Nm*
natürliches Verbr.-gebiet	102	226	96,58	0,284 ± 0,027	0,210 ± 0,015	0,260	1,420
außerhalb nat. Verbr.-geb.	120	215	91,88	0,269 ± 0,021	0,205 ± 0,018	0,236	1,619
alle	222	226	96,58	0,289 ± 0,026	0,277 ± 0,023	0,249	1,512

Tab. 89: Genfluss (nach NEI 1987) innerhalb der angenommenen Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten (ISSR)

	n	polys	%	Ht	Hs	GST	Nm*
natürliches Verbr.-gebiet	102	31	86,11	0,291 ± 0,035	0,247 ± 0,026	0,152	2,792
außerhalb nat. Verbr.-geb.	120	32	88,89	0,333 ± 0,028	0,275 ± 0,021	0,174	2,377
alle	222	33	91,67	0,367 ± 0,029	0,312 ± 0,023	0,151	2,808

5.3.3 Genetische Diversität

Im Rahmen der Auswertung zur genetischen Diversität (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) wird deutlich, dass die autochthonen Harzfichten sowohl in der RAPD- als auch in der ISSR-Analyse geringe bis mittlere Diversitäten aufweisen (vgl. Tab. 90 und Tab. 91). Autochthonie scheint dementsprechend keinen Einfluss auf die genetische Diversität zu haben. Die Analyse der genetischen Diversität zwischen den autochthonen Harzfichten und den übrigen Populationen zeigt in beiden Fällen, dass die Variabilität dieser angenommenen Gesamtpopulationen deutlich höher ist, als die der Einzelpopulationen und deswegen von einer schwachen Differenzierung der Bestände auszugehen ist.

Tab. 90: Genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels RAPD untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	**0,181**	0,242	0,223	0,216	0,231	0,219	0,217	0,210
Bayer. Wald		**0,253**	0,247	0,252	0,259	0,244	0,252	0,259
Harz			**0,201**	0,221	0,235	0,216	0,226	0,228
Hunsrück				**0,187**	0,231	0,220	0,225	0,220
Solling					**0,219**	0,232	0,239	0,245
Warndt						**0,203**	0,217	0,225
Belau							**0,206**	0,230
Harz (autoch.)								**0,196**

Mit Hilfe des Programmes ARLEQUIN 2.0 wurde in einem weiteren Schritt überprüft, worauf die ermittelten genetischen Variabilitäten hauptsächlich zurückgeführt werden können bzw. ob sich durch Einbeziehung der autochthonen Fichten in die Gruppe der „natürlichen" Populationen die Verhältnisse der Variation verändern. Hinsichtlich der **RAPD-Analyse** ist kein Einfluss der Harzfichten nachweisbar (vgl. Tab. 92). Die genetische Variation der Fichten ist im Wesentlichen (ca. 73%) auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen. Die restliche genetische Variabilität wird durch Unter-

schiede zwischen den Populationen erklärt (ca. 27%). Unter Betrachtung der **ISSR-Daten** wird deutlich, dass durch die Einbeziehung der autochthonen Fichten der Wert, der die Variation durch Unterschiede zwischen den Gruppen erklärt (ca. 21%), leicht ansteigt (vgl. Tab. 93). Prinzipiell haben die hier besonders berücksichtigten Individuen aber keinen Einfluss auf die bisher ermittelten Verhältnisse.

Tab. 91: Genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) innerhalb (fett) und zwischen den mittels ISSR untersuchten Beständen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Huns-rück	Solling	Warndt	Belau	Harz (autoch.)
Berchtesg.	**0,291**	0,331	0,304	0,358	0,357	0,359	0,364	0,336
Bayer. Wald		**0,257**	0,278	0,333	0,330	0,324	0,337	0,339
Harz			**0,210**	0,326	0,319	0,316	0,333	0,308
Hunsrück				**0,255**	0,288	0,329	0,304	0,320
Solling					**0,225**	0,332	0,291	0,301
Warndt						**0,252**	0,338	0,348
Belau							**0,242**	0,323
Harz (autoch.)								**0,246**

Tab. 92: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels RAPD untersuchten Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	FG	SQ	Varianz (SQ/FG)	Varianz (%)	p-Wert	Fixation Index
zwischen Gruppen	1	307,3	0,051 Va	0,15	< 0,001	Φ_{CT} = 0,00146
zw. Pop. innerhalb der Gruppen	6	1723,4	9,571 Vb	27,29	< 0,001	Φ_{SC} = 0,27329
innerhalb der Populationen	214	5446,2	25,450 Vc	72,56	< 0,001	Φ_{ST} = 0,27435
gesamt	221	7476,9	35,072	-	-	-

Tab. 93: Ergebnisse der mit ARLEQUIN 2.0 durchgeführten Varianzanalyse der mittels ISSR untersuchten Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der autochthonen Harzfichten

	FG	SQ	Varianz (SQ/FG)	Varianz (%)	p-Wert	Fixation Index
zwischen Gruppen	1	214,5	1,620 Va	21,31	< 0,001	Φ_{CT} = 0,21309
zw. Pop. innerhalb der Gruppen	6	205,5	1,073 Vb	14,12	< 0,001	Φ_{SC} = 0,17940
innerhalb der Populationen	214	1050,3	4,908 Vc	64,57	< 0,001	Φ_{ST} = 0,35426
gesamt	221	1470,3	7,6002	-	-	-

5.3.4 Zusammenfassung

Zusätzlich zu den in Kap. 5.2 dargestellten populationsgenetischen Untersuchungen der beschriebenen Bestände wurde Nadelmaterial von zwölf, vermutlich autochthonen Fichten aus dem Harz gesammelt und molekulargenetisch mit Hilfe der RAPD- und ISSR-PCR analysiert. 130 der 234 für die **RAPD-Analyse** verwendeten Marker konnten in den Harzfichten als polymorph klassifiziert werden, während 75 Marker nicht nachgewiesen werden konnten und 29 als monomorph klassifiziert wurden. Von den 36 in der **ISSR-Analyse** verwendeten Marker waren 22 als polymorph anzusprechen, während drei Marker nicht nachgewiesen werden konnten und weitere elf Marker als monomorph beschrieben wurden.

Die zur Charakterisierung der zwölf analysierten Fichten herangezogenen Ähnlichkeitsmaße (BSR) zeigten, dass nach beiden Verfahren die **Ähnlichkeiten der Indivduen innerhalb des Wertebereichs der übrigen Populationen** liegt. Es kann deshalb auch keine Aussage getroffen werden, ob autochthone und deswegen genetisch an einen Standort angepasste Individuen sich durch höhere oder geringere Ähnlichkeiten zueinander von nicht-autochthonen Beständen abgrenzen lassen. Des Weiteren konnte auch lediglich anhand der **mittels ISSR** ermittelten Ähnlichkeitsmaße eine **engere Beziehung** der hier berücksichtigten Fichten **zu dem ca. 200 m entfernten anderen Harz-Standort** (Ha) vermutet werden. Anhand der durchgeführten Faktorenanalysen (Hauptkomponentenanalysen der Rohdaten und der Allelfrequenzen) wird eine Gruppierung mit den Populationen von Hunsrück (RAPD) bzw. Harz (ISSR) erreicht. Diese Ergebnisse sind allerdings aufgrund der kleinen Stichprobe sicherlich als kritisch zu bewerten. Ähnlich verhält es sich mit den Werten der genetischen Identität (nach NEI 1972), die große Gemeinsamkeiten zwischen den autochthonen Fichten und der Warndt-Population (RAPD) bzw. zu den Populationen des natürlichen Verbreitungsgebietes (ISSR) aufzeigen.

Die Berechnung der genetischen Distanzmaße (nach LYNCH & MILLGAN 1994, nach NEI 1971, 1978) zeigt, dass durch die RAPD-Analyse **leicht höhere Distanzen zwischen den autochthonen Fichten und den übrigen Beständen** ermittelt wurden ($D_{Ø}$ = 0,075±0,009) als zwischen den anderen Beständen untereinander ($D_{Ø}$ = 0,064±0,018). Allerdings handelt es sich hier generell um sehr geringe Distanzen, die nicht überbewertet werden dürfen, wie auch anhand des Dendrogramms der Clusteranalyse und des *unrooted tree* der genetischen Distanzen (nach NEI 1972) deutlich wird. Im Gegensatz dazu zeigen die mittels **ISSR** ermittelten Distanzmaße mit $D_{Ø}$ = 0,062±0,009 einen signifikant geringeren genetischen Abstand zwischen der autochthonen Harzpopulation und den übrigen Populationen des natürlichen Verbreitungsgebietes als gegenüber den „künstlichen“ Beständen ($D_{Ø}$ = 0,222±0,043). Die Dendrogramme der Clusteranalysen sowie der *unrooted tree* führen – wie bereits in Kap. 5.2.2 dargestellt – zu einer **deutlichen Definition von zwei Gruppen**, wobei die **Harzfichten der Gruppe der „natürlichen“ Populationen zugeordnet** werden. Die in der Populationsanalyse vorgenommenen Genflussschätzungen wurden hier unter Berücksichtigung der zwölf autochthonen Fichten erneut durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl bei der RAPD- als auch

bei der ISSR- Analyse die **Genflussraten durch Einbeziehung der autochthonen Harzfichten gesenkt** werden, was als Hinweis auf verringerten Genaustausch verstanden werden kann. Allerdings wird der **Genfluss innerhalb der Gruppe der „natürlichen" Populationen erneut höher eingeschätzt** als zwischen den Beständen außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes.

Da anhand der Anzahl der **polymorphen Marker** vermutet werden konnte, dass die **Harzfichten als weniger divers zu charakterisieren** sind, dies aber auch auf die geringe Stichprobe zurückgeführt werden kann, wurde zur weiteren Charakterisierung der Population ihre genetische Diversität (nach LYNCH & MILLIGAN 1995, nach NEI 1987, nach SHANNON 1949) berechnet. Die erhaltenen Diversitätsmaße bestätigen, dass die autochthonen Harzfichten sowohl anhand der RAPD- als auch der ISSR-Marker **geringe bis mittlere Diversitäten** aufweisen. Aus diesen Daten muss geschlossen werden, dass Autochthonie dementsprechend keinen Einfluss auf die genetische Diversität zu haben scheint.

Mit Hilfe des Programmes ARLEQUIN 2.0 wurde in einem weiteren Schritt überprüft, worauf die ermittelten genetischen Variabilitäten hauptsächlich zurückgeführt werden können bzw. ob sich durch Einbeziehung der autochthonen Fichten in die Gruppe der „natürlichen" Populationen die Verhältnisse der Variation verändern. Hinsichtlich der **RAPD-Analyse** ist kein Einfluss der Harzfichten nachweisbar. Die genetische Variation der Fichten ist im Wesentlichen (ca. 73%) auf die Variation innerhalb der Populationen zurückzuführen. Die restliche genetische Variabilität wird durch Unterschiede zwischen den Populationen erklärt (ca. 27%). Unter Betrachtung der **ISSR-Daten** wird deutlich, dass durch die Einbeziehung der autochthonen Fichten der Wert, der die Variation durch Unterschiede zwischen den Gruppen erklärt (ca. 21%), leicht ansteigt. Prinzipiell haben die hier besonders berücksichtigten Individuen aber keinen Einfluss auf die bisher ermittelten Verhältnisse.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die vermutlich autochthonen Harzfichten hinsichtlich zahlreicher angelegter Faktoren **nicht von den übrigen**, im Populationsvergleich bereits untersuchten **Beständen unterscheiden lassen**. Sowohl hinsichtlich der Ähnlichkeits- und Distanzmaße, als auch unter Berücksichtigung der Diversitätswerte konnten im Vergleich zu den übrigen Populationen keine besonderen Auffälligkeiten nachgewiesen werden. Die Annahme, dass autochthone Bestände u.U. durch einen veränderten Genpool charakterisiert sind und deswegen genetisch diverser oder auch angepasster und deswegen genetisch homogener sein könnten, konnte nicht bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der genetischen Distanzen konnte gezeigt werden, dass zwischen den autochthonen Harzfichten und dem ca. 200 m entfernten, des bei der Populationsunterscheidung ebenfalls betrachteten Bestandes des Harzes **keine besonderen „Verwandtschaftsbeziehungen"** nachweisbar sind. Es bleibt festzuhalten, dass die ermittelten Ergebnisse kritisch zu betrachten sind, da mit zwölf untersuchten Individuen eine **sicherlich nicht ausreichende Stichprobengröße** vorliegt. Eine weiterführende Diskussion zur Stichprobengröße findet sich in Kap. 6.1.2.

5.4 Exkurs: Molekulargenetische Untersuchungen von Poolproben

Wie aus den vorhergehenden Analysen ersichtlich wird, ist die Analyse von Einzelindividuen zur Überprüfung der Differenzierung von Populationen nur bedingt hilfreich. Große Variabilitäten innerhalb eines Bestandes führen dazu, dass u.U. vorhandene Differenzierungen zwischen den Populationen überlagert werden und deswegen unentdeckt bleiben. Ein gängiges Verfahren, Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung trotz großer Stichproben durchführen zu können, ist die Poolbildung (vgl. YU & PAULS 1991, YANG & QUIROS 1993, CARLSON et al. 1994, SCHEEPERS et al. 1997b). Dabei wird entweder die gemahlene Probenmatrix zu einer Mischprobe vereinigt oder aber – und dies stellt den häufigeren Fall dar – die DNA-Stammlösungen der einzelnen Proben werden zu gleichen Anteilen zu einer Stammlösung zusammengeführt (YU & PAULS 1991). Mit Hilfe dieses Verfahrens ist durch Reduktion der Marker ein zusätzlicher Informationsgewinn zu erwarten, wenn dadurch Differenzierungen zwischen den Populationen nachweisbar werden (vgl. GEBUREK & VON WUEHLISCH 1989).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die pro Population angefertigten 30 Stammlösungen zu gleichen Anteilen (jeweils 30 µl) zusammengeführt, so dass insgesamt sieben Proben (Be, BW, Ha, Hu, So, Wa, BS) für diese Teilaufgabe zur Verfügung standen. Diese Proben wurden mittels RAPD- und ISSR-Analyse hinsichtlich ihrer genetischen Ähnlichkeiten, genetischen Distanzen und Diversitäten untersucht. Anhand der SSR- und EST-Analysen wurden zusätzlich Untersuchungen hinsichtlich des Heterozygotiegrades angestrebt.

Die Aus- und Bewertung dominanter Marker bei Poolproben ist allerdings wegen einiger Aspekte kurz zu diskutieren: Aufgrund der Dominanz der eingesetzten RAPD- und ISSR-Marker (WILLIAMS et al. 1990) ist davon auszugehen, dass in einer Poolprobe ein DNA-Fragment als anwesend (1) betrachtet werden kann, wenn es zumindest in einem Individuum der Poolprobe ebenfalls anwesend ist. Es kann somit anhand der Poolprobe nicht unterschieden werden, ob ein DNA-Fragment in den Populationen nur ein einziges Mal oder in allen Individuen auftritt. Da dies aber – in Form der Allelfrequenz – ein wichtiges Kriterium in populationsgenetischen Analysen darstellt, geht mit der Poolbildung ein **Informationsverlust** einher, wenn Populationen allein durch die aus ihnen gebildeten Poolproben genetisch charakterisiert werden sollen.

Darüber hinaus bedeutet dies, dass in der Auswertung eines Amplifikationsmusters, das aus einer Poolprobe gewonnen wurde, eine Position nur in dem speziellen – und logischerweise auch seltenen – Fall mit 0 (DNA-Fragment abwesend) bezeichnet wird, wenn es in keinem der in der Poolprobe zusammengefassten Individuen vorhanden war. Die Unterschiede zwischen zwei Poolproben A und B ergeben sich deshalb lediglich dadurch, dass ein DNA-Fragment in der einen Population zumindest ein Mal auftritt, während es in der anderen Population in keinem Individuum vorhanden ist. Das heißt, neben dem oben erwähnten Informationsverlust kommt es durch die Poolbildung zusätzlich zu einer

Unterschätzung der genetischen Differenzierung der Populationen im Vergleich zu den aus Einzelindividuen zusammengesetzten Populationen.

Die statistische Auswertung der genetischen Ähnlichkeit von Individuen erfolgt üblicherweise über die BSR, die die Ähnlichkeit der paarweise verglichenen Individuen durch das Vorhandensein (1) von Merkmalen definiert (vgl. Kap. 4.3.1.1). Die Anwendung der BSR für die Poolproben A und B würde im in Abb. 68 dargestellten Beispiel zu einer deutlichen Überschätzung der tatsächlich vorhanden Ähnlichkeit zwischen den Populationen führen ($BSR_{A/B}$ = 0,769). Dies ist darauf zurückzuführen, dass, wie oben bereits gezeigt wurde, im Fall von Poolproben das Fehlen (0) eines Merkmals von entscheidenderer Bedeutung ist. Aus diesem Grund muss ein Ähnlichkeitsmaß (z.B. SM, *simple matching coefficient*) ausgewählt werden, das das gemeinsame Fehlen einer Bande ebenfalls berücksichtigt. Dieses führt, wie in Abb. 68 dargestellt ist, zwar nach wie vor zu einer **statistischen Überschätzung der Ähnlichkeit** durch die Poolprobe, vermeidet aber den o.g. Fehler der üblichen Ähnlichkeitsmaße (vgl. RITLAND 2002). In diesem Zusammenhang sei zusätzlich erwähnt, dass HEINZE et al. (1996) den Einsatz des ebenfalls einfachen Jaccard-Index bzw. vergleichbarer Ähnlichkeitsindizes für forstgenetische Studien generell empfehlen. Hierbei werden gemeinsam fehlende Größen aus der Betrachtung ausgeschlossen und Übereinstimmungen und Nichtübereinstimmungen gleich gewichtet.

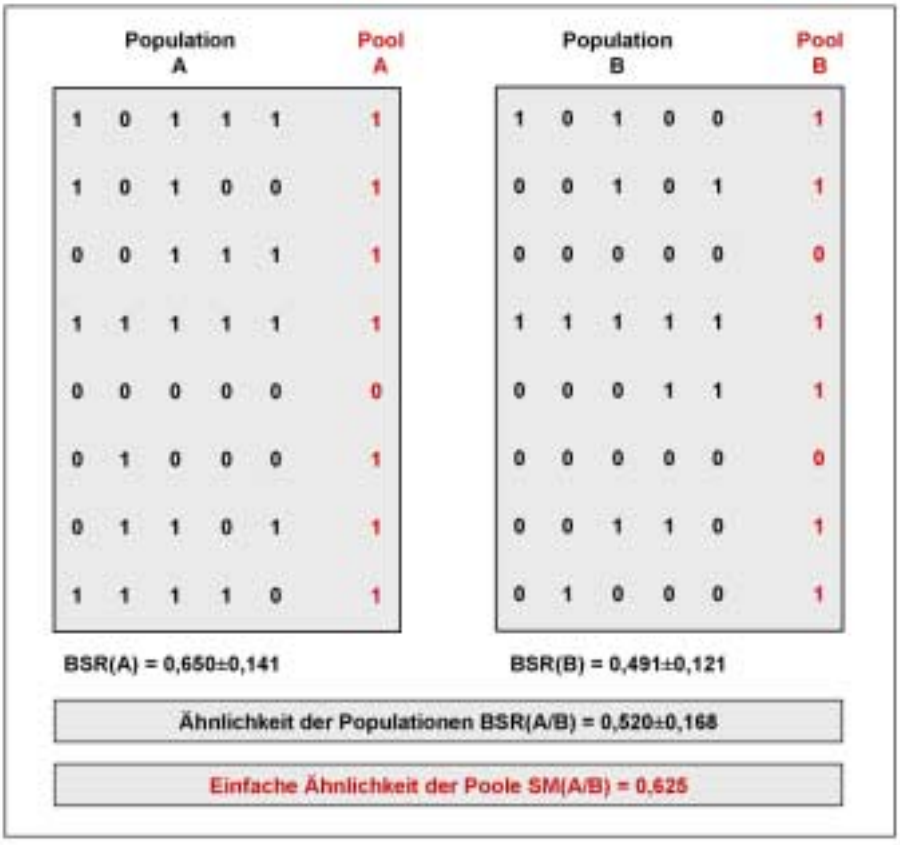


Abb. 68: Schematische Darstellung der Unterschiede in der statistischen Auswertung von Populationen aus Einzelindividuen und Poolproben

Ein weiterer hier zu berücksichtigender Aspekt ist die **Anwendung populationsgenetischer Parameter**, wie genetische Diversität von Populationen, genetische Distanz zwischen Populationen, Populationsunterteilungen und -differenzierungen. Zur Anwendung dieser Parameter sind **statistische Voraussetzungen** zu erfüllen, die von Poolproben **nicht erbracht** werden. Poolproben erfüllen aufgrund ihres Mischprobencharakters weder alle zur Anwendung der genannten Parameter erforderlichen Voraussetzungen der Hardy-Weinberg-Regel, noch kann aufgrund des Dominanzproblems die Frequenz des Nullallels innerhalb einer Population berechnet werden. Die statistische Auswertung der Poolproben muss sich demnach auf die Berechnung der Ähnlichkeitsmaße und deren weitere Verwendung in Cluster- oder Hauptkomponentenalysen beschränken. Eine Charakterisierung einer Poolprobe durch die genetische Diversität ist nicht möglich.

Unter den zuvor genannten Bedingungen wurde der *simple matching coefficient* (SM) als Ähnlichkeitsmaß zur Analyse der mit **RAPD** analysierten Poolproben angelegt. Aus Tab. 94 wird deutlich, dass die höchsten Ähnlichkeiten zwischen den Pools von Hunsrück und Solling (SM = 0,839) bestehen und ansonsten die Ähnlichkeitsmaße zwischen den Populationen in vergleichbarer Größenordnung liegen (SM = 0,759±0,038). In diesem Zusammenhang besonders erwähnenswert sind die durchschnittlich etwas geringeren Ähnlichkeitsmaße zwischen dem Bestand von Belau und den übrigen Populationen (vgl. Abb. 69).

Tab. 94: Ähnlichkeitsindizes (SM, oberhalb der Diagonalen, und BSR, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels RAPD untersuchten Poolproben

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,759	0,787	0,724	0,793	0,741	0,713
Bayer. Wald	0,828	-	0,787	0,747	0,793	0,707	0,736
Harz	0,849	0,846	-	0,776	0,799	0,770	0,741
Hunsrück	0,797	0,810	0,833	-	0,839	0,776	0,690
Solling	0,846	0,843	0,848	0,874	-	0,799	0,747
Warndt	0,802	0,771	0,821	0,819	0,836	-	0,707
Belau	0,800	0,813	0,818	0,773	0,814	0,777	-

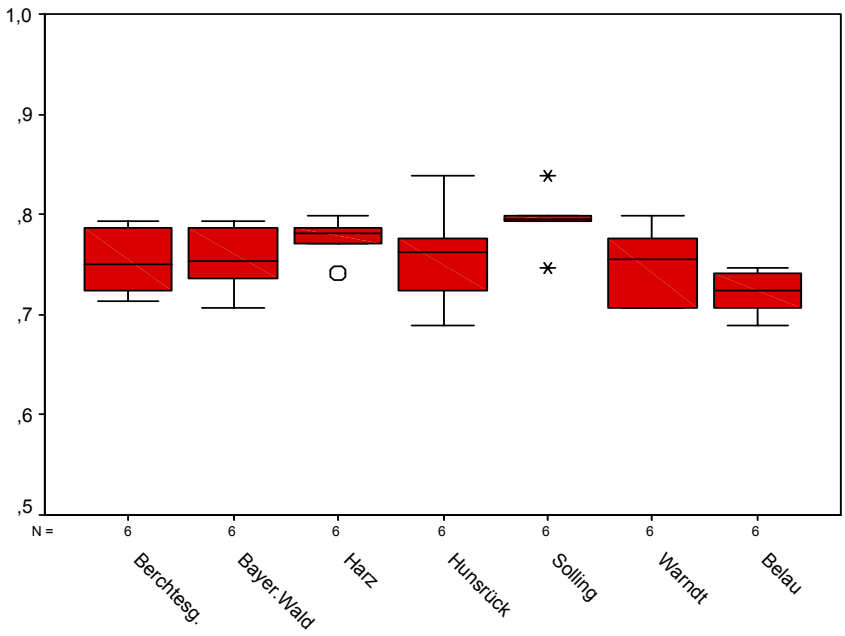


Abb. 69: Box&Whisker-Plots der genetischen Ähnlichkeit (SM) der mittels RAPD untersuchten Poolproben

Neben der Darstellung der Ähnlichkeitsmaße wurden auch die mittels RAPD ermittelten Rohdaten einer Faktorenanalyse unterzogen. Im Komponentendiagramm (vgl. Abb. 70) sowie in der zugehörigen Komponentenmatrix (vgl. Tab. 95) wird deutlich, dass nach dieser Methode die Proben von Berchtesgaden, Bayerischer Wald, Harz, Solling, Warndt und Hunsrück in einer Gruppe zusammengeführt werden, während der Bestand von Belau deutlich separiert dargestellt wird.

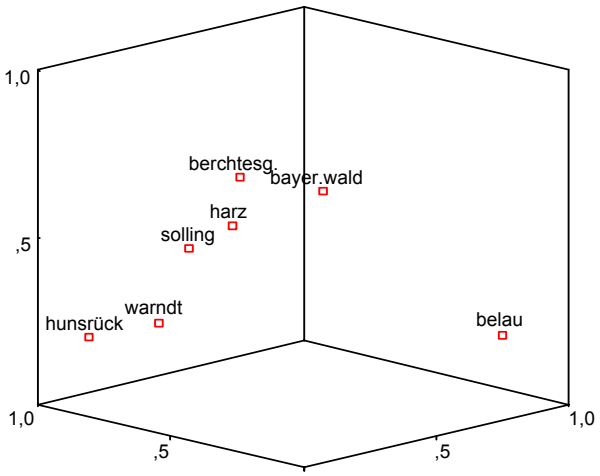


Abb. 70: Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Rohdaten der gepoolten Proben (Varimax rotiert)

Tab. 95: Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der RAPD-Rohdaten der gepoolten Proben (vgl. Abb. 70) (Die Rotation ist in 5 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,249	,818	,011
Bayer. Wald	,209	,733	,280
Harz	,473	,593	,204
Hunsrück	,863	,214	,058
Solling	,672	,482	,243
Warndt	,757	,248	,217
Belau	,198	,181	,946

Die Auswertung der **ISSR-Analyse** erfolgte ebenfalls über das Ähnlichkeitsmaß des *simple matching coefficient* (SM). Aus Tab. 96 geht hervor, dass nach diesem Verfahren die höchsten Ähnlichkeiten zwischen den Pools von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz sowie zwischen Hunsrück, Solling und Warndt (SM = 0,929) bestehen. Insbesondere zwischen den Poolproben von Solling und Warndt besteht keine Differenzierung, d.h. die Amplifikationsmuster der beiden Proben sind identisch.

Tab. 96: Ähnlichkeitsindizes (SM, oberhalb der Diagonalen, und BSR, unterhalb der Diagonalen) zwischen den mittels ISSR untersuchten Poolproben

	Berchtes-gaden	Bayer. Wald	Harz	Hunsrück	Solling	Warndt	Belau
Berchtesgaden	-	0,929	0,929	0,857	0,857	0,857	0,821
Bayer. Wald	0,962	-	0,929	0,929	0,857	0,857	0,893
Harz	0,960	0,960	-	0,857	0,857	0,857	0,821
Hunsrück	0,923	0,962	0,92	-	0,929	0,929	0,893
Solling	0,920	0,920	0,917	0,960	-	1	0,893
Warndt	0,920	0,920	0,917	0,960	1	-	0,893
Belau	0,898	0,939	0,894	0,939	0,936	0,936	-

Die sehr hohe Ähnlichkeit der Pools kann in der Faktorenanalyse der ISSR-Rohdaten nicht nachvollzogen werden (vgl. Abb. 71). Aus dem zugehörigen Komponentendiagramm wird deutlich, dass neben den bereits genannten Populationen von Solling und Warndt, die einer Komponente zugeordnet werden, die von Berchtesgaden und Harz sowie die des Bayerischen Waldes die weiteren Gruppen bilden. Die Bestände von Hunsrück und Belau stehen intermediär dazwischen.

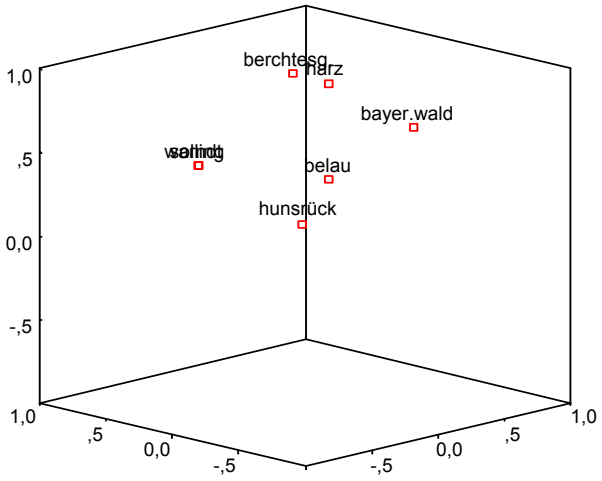


Abb. 71: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Rohdaten der gepoolten Proben (Varimax rotiert)**

Tab. 97: **Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der ISSR-Rohdaten der gepoolten Proben (vgl. Abb. 71) (Die Rotation ist in 9 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung)**

Komponenten	1	2	3
Berchtesgaden	,106	,945	,015
Bayer. Wald	,030	,479	,846
Harz	,202	,805	,373
Hunsrück	,655	-,173	,628
Solling	,961	,204	,163
Warndt	,961	,204	,163
Belau	,505	,112	,686

Für die **SSR-Analyse** wurden alle sieben von PFEIFFER et al. (1997) empfohlene SSR-Primer (SpAG2, SpAGC1, SpAGC2, SpAGD1, SpAGG3, SpAC1F7 und SpAC1H8) auf ihre Eignung zur Differenzierung der gepoolten Proben getestet. Entgegen der Einzelbaumanalyse (vgl. Kap. 5.2.3) konnten mit allen Primern Amplifikationen erzielt werden. Die Amplifikationsmuster waren anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung allerdings gänzlich als comigrierend zu charakterisieren, d.h., mit keinem der verwendeten SSR-Primer konnte anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung eine Differenzierung zwischen den Poolproben erreicht werden (vgl. Abb. 72).

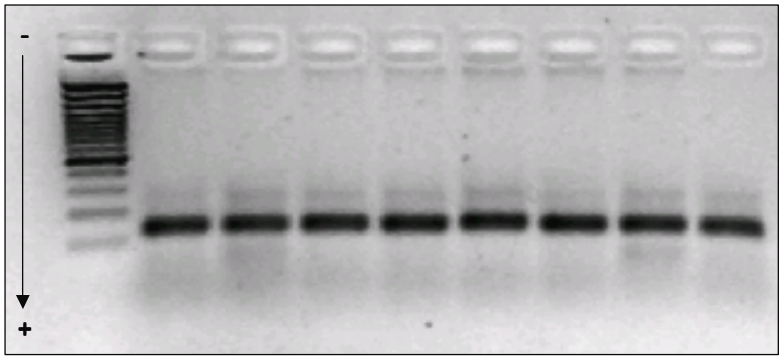


Abb. 72: **Beispielhafte Darstellung eines SSR-Elektrophoresegels der Poolproben mit Primer SpAC1F7 (v.l. Be, BW, Ha, Hu, So, Tr, Wa, BS) (links: Fragmentlängenstandard)**

Mit Hilfe der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Proben konnten mit den sieben verwendeten SSR-Primern in allen Pools bis zu vier Allele nachgewiesen werden (vgl. Tab. 98). Allerdings wurden für alle untersuchten Loci lediglich Heterozyote nachgewiesen. Dadurch dass in allen Analysen identische Alleltypen ermittelt wurden, konnten keine Unterschiede in den Amplifikationsmustern der Poolproben nachgewiesen werden. Beispielhaft ist in Abb. 73 ein Elektropherogramm der Poolproben mit Primer SpAGC2 dargestellt.

Tab. 98: **Übersicht über die Produktgrößen der im Rahmen der Poolprobenanalyse zusätzlich einbezogenen SSR-Primer (vgl. Tab. 48)**

	SpAG2	SpAGC1	SpAGC2	SpAC1F7
nach PFEIFFER et al. (1997) zu erwartende Produktgröße	105 bp	103 bp	126 bp	109 bp
Anzahl Produkte in vorliegender Untersuchung	2	4	2	2
Anzahl und Größe der Produkte [bp]	(A) 134, (B) 148	(A) 166, (B) 192, (C) 210, (D) 252	(A) 190, (B) 200	(A) 120, (B) 144

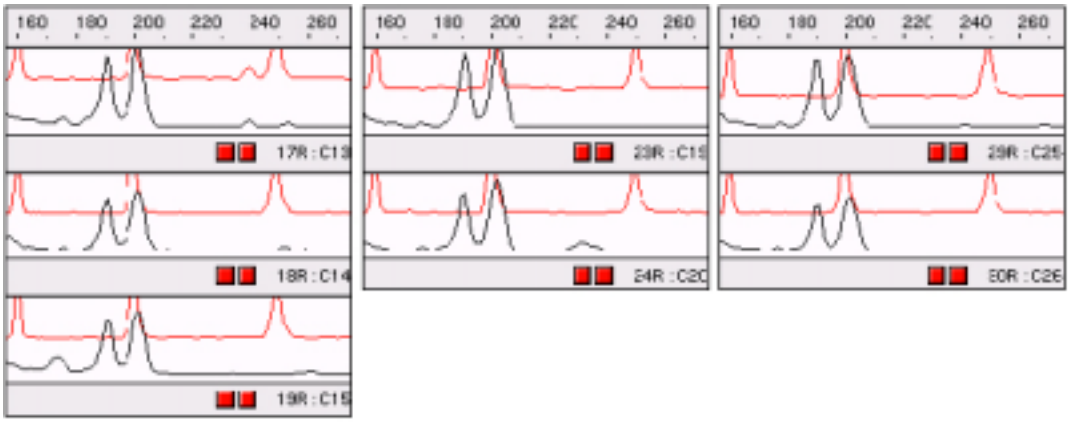


Abb. 73: **Beispielhafte Darstellung eines SSR-Elektropherogramms der Poolproben mit Primer SpAGC2 (v.l.o.n.r.u. Be, BW, Ha, Hu, So, Tr, Wa, BS) (rot = Standard ROX 500)**

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass in allen untersuchten Beständen für die untersuchten Loci heterozygote Individuen enthalten sein müssen. Durch die Poolbildung werden diese Marker als comigrierend erkannt und ergeben identische Muster. Es muss festgehalten werden, dass sich die nach dieser Methode vorgenommene SSR-Analyse nicht zur Differenzierung von Poolproben eignet. Die Höhe der detektierten Peaks kann darüber hinaus aufgrund der Verwendung fluoreszenzmarkierter dNTPs nicht als Marker für eine quantitative Erhebung genutzt werden. Von einer statistischen Auswertung dieser Muster wird abgesehen.

Wie auch bei der SSR-Analyse wurden mit den verwendeten **EST-Primern** PA0034, PA0043 und PA0066 lediglich comigrierende Fragmente nachgewiesen (vgl. Abb. 74). Eine Differenzierung der Poolproben war anhand dieser Daten ebenfalls nicht möglich, weswegen eine weitere Betrachtung des Markersystems unterlassen wurde.

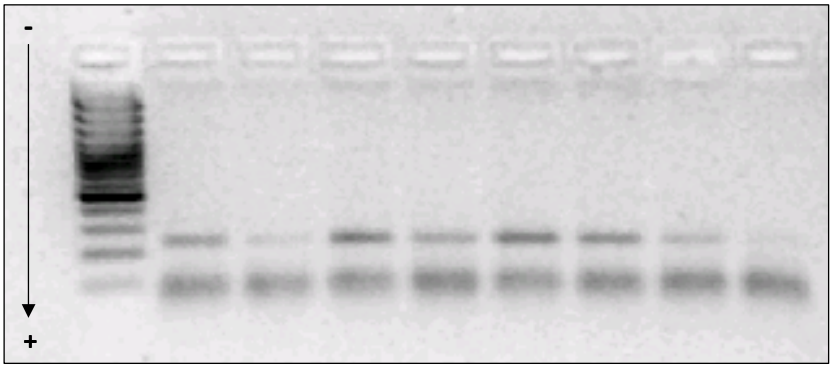


Abb. 74: Beispielhafte Darstellung eines EST-Elektrophoresegels der Poolproben mit Primer PA0034 (v.l. Be, BW, Ha, Hu, So, Tr, Wa, BS)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die **codominanten Marker (SSR, EST) nicht für die populationsgenetische Analyse von Poolproben eignen**. Die Auswertung beschränkt sich dementsprechend auf die Ergebnisse der erfolgreich eingesetzten RAPD- und ISSR-Analysen. Während mit Hilfe der RAPD-PCR die Probe der Fichten von Belau deutlich von den übrigen Populationen unterschieden werden konnte, deuteten die ISSR-Ergebnisse eine deutlich höhere Homogenität der Poolproben an. Insbesondere die Proben von Solling und Warndt waren nicht zu differenzieren. Während die **hohen Ähnlichkeiten zwischen den Pools** durch die SSR- und EST-Analyse zwar prinzipiell bestätigt werden, eignen sich die beiden letztgenannten Verfahren aufgrund der Comigration der DNA-Fragmente nur dann zur Differenzierung von Poolproben, wenn in einem Bestand ausschließlich für den untersuchten Locus homozygote Individuen auftreten. Es bleibt festzuhalten, dass auch durch die Poolbildung eine Differenzierung der Populationen nicht ermöglicht wurde, sondern das Ergebnis, dass hohe Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Populationen bestehen, lediglich bestätigt werden konnte.

6 Diskussion

6.1 Material und Methoden

6.1.1 Probenmaterial

Wie in Kap. 2.4 bereits beschrieben, wurden und werden die meisten Studien zur genetischen Variabilität von Koniferen auf der Basis von Isoenzymanalysen durchgeführt. Grundlage dieser zumeist forstwissenschaftlich ausgerichteten Analysen ist in den meisten Fällen die genetische Charakterisierung von speziell ausgewählten Beständen, wie beispielsweise von Plusbaumsamenplantagen, die Erforschung von Generhaltungsmaßnahmen oder die exakte Definition von Herkünften (vgl. Kap. 2.4.1). Für diese Analysen wird als Probenmaterial meist Samenmaterial verwendet, das vom Forst gesammelt und in forstlichen Samenklengen bereitgehalten wird und deshalb auch in großen Mengen zur Verfügung steht. Die Vorteile der Verwendung von aus Samenklengen stammendem Saatgut bestehen hauptsächlich darin, dass zum einen die Lagerung von Saatgut über mehrere Jahrzehnte problemlos möglich ist, und zum anderen, dass die Klenge eine Möglichkeit darstellt, preisgünstig große Mengen genetischer Information auf kleinem Raum zu erhalten (BONNER 1990, FINKELDEY 1992). Das Saatgut besteht, wenn es befruchtet ist, aus einem haploiden Nähr- und Speichergewebe, dem sogenannten **Megagametophyten** (Embryosack), und dem diploiden Embryo. Der Megagametophyt und die korrespondierende Eizelle – der weibliche Mitbegründer des Embryo – stammen als Produkt der meiotischen Teilung von einer einzelnen Mutterzelle und besitzen deshalb identische Genotypen (CHAMBERLAIN 1935). Bei diesem Megagametophyten handelt es sich somit um **haploides (Endosperm-)Material**, das den Genotyp des Mutterbaumes repräsentiert (BERGMANN 1973). Die Vorteile haploiden Gewebes in der genetischen Analyse bestehen v.a. darin, dass die Allelverteilung heterozygoter Loci in der Art einer einfachen Mendelspaltung nachzuweisen sind und daraus beispielsweise die Kopplung von Loci nachgewiesen werden kann (BERGMANN 1971, LAGERCRANTZ et al. 1988). Durch Einsatz des haploiden Gewebes kann zudem das Dominanzproblem der RAPD- und ISSR-Marker umgangen werden (TULSIERAM et al. 1992, CARLSON et al. 1994, SKOV 1998b). Der Nachteil haploiden Gewebes besteht allerdings in seiner begrenzten Verfügbarkeit, wenn – wie im vorliegenden Fall – bestimmte Bestände und nicht festgelegte forstliche Herkunftsbezeichnungen untersucht werden sollen. Dieses Material steht als Probe nur begrenzt zur Verfügung, weil zum einen nur adulte Bäume Samen produzieren und zudem die Fichte nur in unregelmäßigen Abständen fruktifiziert (ROTHE 1990). Außerdem gilt haploides Gewebe als nicht praktikabel für Analysen mit großer Stichprobe, da nach Angaben von LAGERCRANTZ et al. (1988) – zumindest für Isoenzymanalysen – mindestens sieben Gametophyten pro Baum benötigt werden um solide Aussagen treffen zu können. Diese Erkenntnisse sprechen für den unbedingten Einsatz zum einen großer Stichprobenzahlen und zum anderen diploiden Gewebes, trotz des Nachteils, dass Heterozygote für das Nullallel gewöhnlich nicht detektiert werden können. Diese Limitierung äußert

sich in der Überschätzung der Zahl der Homozygoten und der Allelfrequenzen und in fehlerhaften Schätzungen statistischer Parameter.

Nach Abwägung dieser Gründe wurden und werden in den letzten Jahren vermehrt Analysen an **diploiden Geweben**, wie z.B. **Nadeln**, durchgeführt. Wenn auch in Bezug auf dominante Marker eine Einschränkung hinsichtlich der Auswertbarkeit akzeptiert werden muss, so ist die einfachere Verfügbarkeit bereits ein wesentliches Kriterium für die Auswahl diploiden Gewebes. Während für die Isoenzymanalyse Koniferen-Nadeln als Quelle kritisch betrachtet werden, da phenolische Komponenten und andere sekundäre Inhaltsstoffe die Extraktion der Proteine behindern (CHELIAK & PITEL 1984), stellt Nadelmaterial die häufigste Probenquelle für DNA-Analysen dar (CARLSON et al. 1994, FOURRÉ et al. 1997, SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b). Letztendlich lassen alle neueren Untersuchungen auf eine erfolgreiche Nutzung der Nadeln als Probenmaterial schließen, wenn auch bei besonders jungen Nadeln der hohe Stärkeanteil die DNA-Extraktion behindern kann und SUTTER (1997) in diesem Zusammenhang auf Nadelmaterial wegen des zu hohen Verholzungsgrades und Phenolgehaltes der Nadeln verzichtet. In diesem Zusammenhang sei auf ROTHE (1990) verwiesen, der explizit die Nutzung **einjähriger Nadeln** empfiehlt.

6.1.2 Stichprobengröße

Die Genauigkeit einer populationsgenetischen Analyse hängt letztendlich von der Tatsache ab, ob eine Population durch die ausgewählte Stichprobe korrekt repräsentiert werden kann. Wie aus den in Kap. 5.2 beschriebenen Ergebnissen hervorgeht, wurden innerhalb der untersuchten Populationen hohe Variabilitäten ermittelt. In Kombination mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (vgl. Kap. 6.3) lässt dies vermuten, dass mit den ausgewählten Individuen die Variabilität der Populationen in hohem Umfang beschrieben wurde, obwohl unklar ist, ob auch tatsächlich das Gesamtmaß an Diversität und Variabilität abgebildet werden konnte.

Dies bedeutet vereinfacht, dass mit zunehmender Stichprobengröße die tatsächlichen Verhältnisse in einer Population genauer beschrieben werden können. In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, dass selbstverständlich größere Populationen durch einen größeren Stichprobenumfang repräsentiert sein sollten, während zur repräsentativen Erfassung kleinerer Populationen auch kleinere Stichproben ausreichend sind. Außerdem hängt die notwendige Mindeststichprobengröße auch wesentlich von der Variabilität eines Bestandes ab und wird dementsprechend von Bestand zu Bestand deutlich variieren.

Angemerkt werden muss zudem, dass die Auswahl der Bäume ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse ausüben kann. GÄRTNER et al. (1996) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass „mit der Auswahl der zu beerntenden Bäume eine künstliche Auslese erfolgen kann, die die genetische Struktur in welcher Form auch immer beeinflussen kann“ und fordern somit große Stichproben. Eine sehr große Stichprobenzahl ist allerdings in Abhängigkeit von der Fragestellung und

der verwendeten Methode nicht immer praktikabel. Das heißt, es muss ein Kompromiss zwischen repräsentativer Anzahl und Bearbeitbarkeit gefunden werden. Während CHYLARECKI & GIERTYCH (1969) bei morphologischen Untersuchungen an Zapfen von einer statistisch ausreichenden Stichprobe von 30 Bäumen pro Population ausgingen (vgl. SCHMIDT-VOGT 1972b), schwanken die in der aktuelleren Literatur erwähnten Stichprobengrößen bei Untersuchungen zum Isoenzym- bzw. RAPD-Muster von Fichten zum Teil erheblich (vgl. Tab. Tab. 99). In diesem Zusammenhang sei speziell auf die Arbeiten von GREGORIUS (1974, 1977, 1980, 1987, 1988, 1991) hingewiesen, der die Stichprobengröße für Untersuchungen mit Waldbäumen und insbesondere mit Koniferen intensiv diskutiert (vgl. auch GREGORIUS & ROBERDS 1986, BERGMANN & RUETZ 1990).

Tab. 99: Beispielhaft ausgewählte Stichprobengrößen (n) bei Isoenzym- und RAPD-Analysen mit Populationen von *Picea abies*

Isoenzymanalysen	n
TIGERSTEDT 1973	50
LUNDKVIST & RUDIN 1977	35-80
LUNDKVIST 1979	49-64
BERGMANN & SCHOLZ 1987	25-50
MORGANTE et al. 1989	ca. 25
KONNERT & FRANKE 1990	20-35
STUTZ 1990b	ca. 40
GÖMÖRY 1992	30-60
MÜLLER-STARCK 1995a	100
KRUTOVSKII & BERGMANN 1995	> 100
PRUS-GLOWACKI & GODZIK 1995	33-39

RAPD-PCR	n
BUCCI & MENOZZI 1995	48
VAN DE VEN & MCNICHOL 1995	11
HEINZE et al. 1996	25
SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b	20
LEIBENGUTH & SHOGHI 1998	5-9
COLLIGNON & FAVRE 2000	10-33
TROGGIO et al. 2001	29

Wie aus Tab. 99 ersichtlich wird, wurden – auch aus technischen Gründen – für molekulargenetische Untersuchungen an Fichten meist deutlich geringere Stichproben verwendet als in Isoenzymanalysen. KONNERT & FRANKE (1991) gehen in diesem Zusammenhang anhand ihrer Analysen von 40 Fichtenpopulationen des Schwarzwaldes davon aus, dass es bereits bei der Beerntung von etwa 20 Bäumen pro Bestand durchaus möglich sei, eine größere genetische Variation zu erfassen. Aufgrund der kontrovers diskutierten Frage einer statistisch verlässlichen Stichprobenzahl wurde es als unerlässlich angesehen mit Hilfe geeigneter Verfahren zu testen, ob 20 Individuen pro Bestand ausreichend sind bzw. welche Mindeststichprobengröße eingehalten werden muss um eine Population ausreichend hinsichtlich ihrer Variabilität zu charakterisieren.

Zum einen wurden am Beispiel von 30 Fichten des Nationalparks Berchtesgaden mit allen 14 in der Untersuchung verwendeten RAPD-Primern das Ähnlichkeitsmaß der BSR schrittweise ermittelt (vgl. Abb. 75). Dabei wird deutlich, dass die BSR mit zunehmender Anzahl in die Untersuchung einbezogener Individuen allmählich kleiner wird und selbst mit 30 Individuen noch keine „Sättigung“

eingetreten ist. Aus der differenzierteren Betrachtung von drei zufällig ausgewählten RAPD-Primern wird ersichtlich, dass die Ähnlichkeitsmaße auch in Abhängigkeit des verwendeten Primers unterschiedlich auf die Stichprobenzahl reagieren. Nach diesen Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass 30 Individuen das absolute Minimum als Stichprobe darstellen und zur Verbesserung der Aussagekraft besser noch mehr Individuen in die Untersuchung einzubeziehen sind.

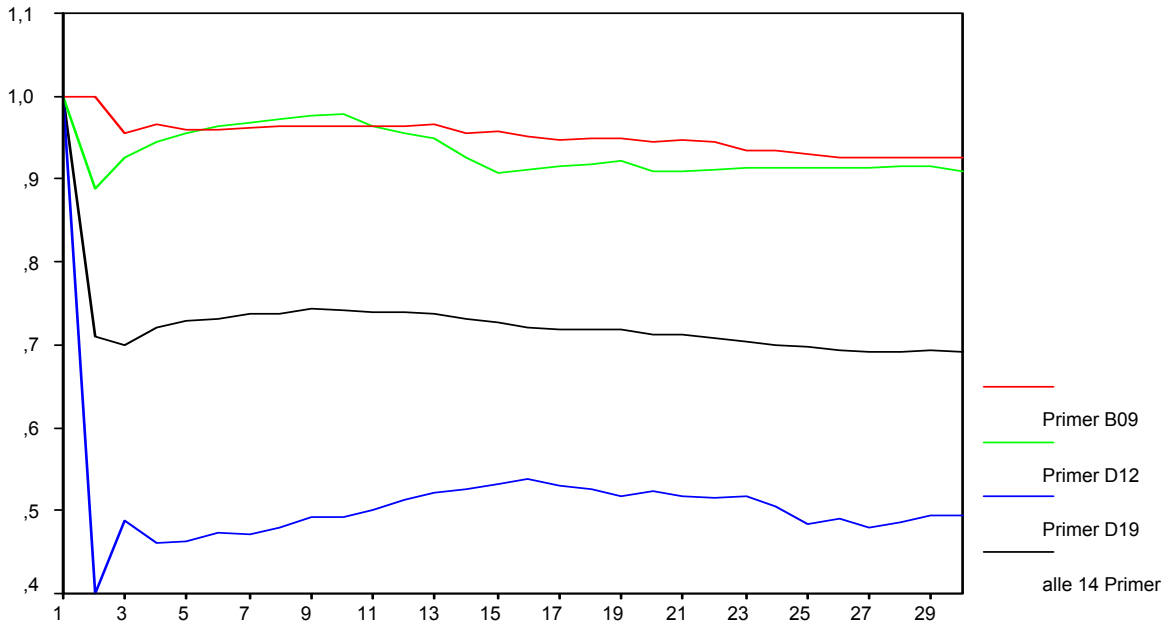


Abb. 75: Abhängigkeit der genetischen Ähnlichkeit (BSR) von der Zahl in die Untersuchung einbezogener Individuen am Beispiel der Population von Berchtesgaden (RAPD-Daten)

Zum anderen wurde anhand aller untersuchten Populationen (inkl. der zwölf autochthonen Harzfichten) die genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) bestimmt. Auch hier wurden die Werte für unterschiedlich große Stichproben schrittweise ermittelt, indem durch einen zufälligen Griff in die Population jeweils ein weiteres Individuum in die Berechnung mit einbezogen wurde.

Abb. 76 zeigt, dass die genetische Diversität nach LYNCH & MILLIGAN (1994) bei einer zufälligen Auswahl von weniger als zehn Individuen starken Schwankungen unterworfen ist, was sich auch mit zunehmender Stichprobengröße nur langsam normalisiert. Es wird deutlich, dass der Stichprobenumfang, der als ausreichend angesehen werden kann um eine Population genetisch zu charakterisieren, in Abhängigkeit von der Variabilität einer Population deutlich schwankt. Während in vorliegendem Beispiel für den Bestand des Solling bereits 20 Individuen als ausreichend erscheinen, bleibt ungeklärt, ob zur Darstellung der genetischen Diversität der Hunsrück-Population eine Zahl von über 30 Individuen erforderlich wäre.

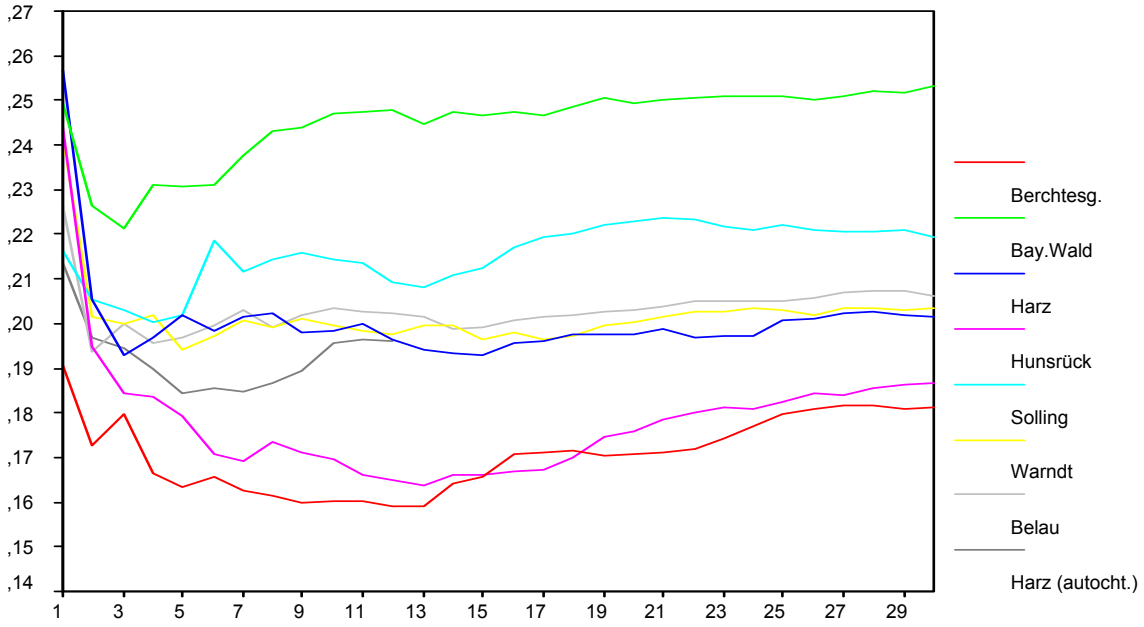


Abb. 76: Abhängigkeit der genetischen Diversität (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) von der Zahl in die Untersuchung einbezogener Individuen (RAPD-Daten)

Auch wenn diese Ergebnisse sicherlich nur bedingt und äußerst schwierig auf andere Populationen übertragbar sind, so muss davon ausgegangen werden, dass – zumindest bezogen auf die dargestellten populationsgenetischen Maße – erst mit einer Mindeststichprobengröße von 30 Individuen die Schwankungen der angelegten populationsgenetischen Größen vernachlässigt werden können. Aus diesem Grund wird für populationsgenetische Analysen mit dominanten Markern eine Mindeststichprobe von 30 Individuen pro Population empfohlen. In einer vergleichbar angelegten Studie wurde für populationsgenetische Untersuchungen mit Buchen des Pfälzerwaldes (*Fagus sylvatica*) ebenfalls 30 Individuen pro Bestand gefordert, während mit Kiefern (Pinus *sylvestris*) sogar eine Stichprobenzahl von 50 Individuen erforderlich schien (QUACK 2001). Diesen Aspekten wurde in der vorliegenden Untersuchung mit der **Beprobung von 30 Individuen pro Bestand** Rechnung getragen.

Diesbezüglich sei nochmals explizit darauf hingewiesen, dass bei der Untersuchung der autochthonen Harzfichten lediglich zwölf Individuen des entsprechenden Bestandes analysiert wurden. Angesichts der Ergebnisse der beispielhaft dargestellten Tests zur Stichprobengröße ist dabei sicherlich von einer Fehleinschätzung hinsichtlich des Grades der populationsgenetischen Parameter auszugehen (vgl. Abb. 76). Insofern können die ermittelten Ergebnisse eher als Tendenzen interpretiert werden. Eine weitergehende Bewertung der ermittelten Daten sollte jedoch aufgrund der Gefahr der Fehlinterpretation unterlassen werden.

6.1.3 DNA-Isolierung

Zur Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe wurden seit den 1980er Jahren zahlreiche Verfahren entwickelt (vgl. ZIEGENHAGEN 1996). Die meisten Vorgehensweisen orientieren sich am Verdau mittels Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und unterscheiden sich lediglich hinsichtlich der Probenvorbehandlung bzw. einiger von den jeweiligen Autoren beschriebenen, methodischen Abweichungen (vgl. DOYLE 1991, STEWART & VIA 1993). Wenn auch GUILLEMAUT & MARÉCHAL-DROUARD (1992) oder HEINZE et al. (1996) Zweifel an der Qualität der nach der CTAB-Methode erhaltenen DNA äußern, so stellt sie doch die am häufigsten verwendete Methode dar (vgl. u.a. SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b, LEIBENGUTH & SHOGHI 1998). Allerdings gilt insbesondere Nadelmaterial von Koniferen hinsichtlich der Zellstruktur und der Pflanzeninhaltsstoffe als vergleichsweise komplizierte Matrix (vgl. ZIEGENHAGEN 1996).

Nach Angaben von MURRAY & THOMPSON (1980) ist bei faserigem Gewebe eine Vermahlung des Probenmaterials unter flüssigem Stickstoff unerlässlich. Dabei stellen allerdings – insbesondere bei **älteren Nadeljahrgängen** – methylierte DNA, Polysaccharide und Tannine ein großes Problem bei der DNA-Isolierung in Pflanzen dar (vgl. BOUSQUET et al. 1990, VORNAM 1993), da sie nur sehr schwer von der DNA zu trennen sind. GUILLEMAUT & MARÉCHAL-DROUARD (1992) diskutieren dieses Problem insbesondere im Hinblick auf den hohen Gehalt (bis zu 3%) an Terpenen und Polyphenolen in den Nadeln der Fichte. Auch SUTTER (1997) geht davon aus, dass der hohe Gehalt an Sekundärinhaltsstoffen (Phenole und Polyphenole) bei der Fichte die Präparation von Proteinen und Nukleinsäuren erschwert. GUILLEMAUT & MARÉCHAL-DROUARD (1992) fordern deshalb ein pH-Wert-erniedrigtes Verfahren zur Vermeidung der Ionisierung und folgender Oxidation phenolischer Bestandteile während des Mörserns (vgl. auch MANIATIS et al. 1982). **Junge Nadeln** und aufbrechende Knospen enthalten im Vergleich dazu sehr viel die DNA-Extraktion behindernde Assimilationsstärke. SUTTER (1997) schlägt in diesem Zusammenhang eine vorgeschaltete Lagerung der Proben im Dunkelraum vor, damit die störende Stärke zuvor abgebaut werden kann.

Diese beiden Problemfelder wurden in vorliegender Untersuchung dadurch umgangen, dass ausschließlich **ein- bis 1½-jährige Nadeln als Probenmatrix** verwendet wurden. Mit diesen Proben konnte nach der Methode von DOYLE (1991) reproduzierbare DNA-Mengen isoliert werden. Damit konnten die Ergebnisse von BOUSQUET et al. (1990), LEHNER et al. (1995), FOURRE et al. (1997), PHILIPPS (1997) und SCHEEPERS et al. (1997b) bestätigt werden. Um zusätzlich quantitativ vergleichare DNA-Stammlösungen zu erhalten wurde das ebenfalls auf dieser Methode basierende Verfahren auf Basis des QIAGEN DNeasy® Plant Mini Kit verwendet. Da nach Angaben von RAFALSKI (1997) aber gerade bei diesen schnellen DNA-Isolationsmethoden sehr große Mengen an RNA gewonnen werden (unter Umständen 10 mal mehr als DNA), so dass auch spektrometrische Messmethoden Fehler anzeigen können, wurde diese Vorgehensweise durch den Zusatz von RNAsen ergänzt. Auf eine zusätzliche Gel-Filtration konnte verzichtet werden. Die Reinheit der DNA-Stammlösungen wurde für

den gesamten Untersuchungszeitraum dadurch erhalten, dass die DNA-Lösungen entsprechend den Empfehlungen von SCHEEPERS et al. (1997b) bei -70°C über flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

6.1.4 Anwendung der molekulargenetischen PCR-Verfahren

Wie bereits in Kap. 2.3 erwähnt, existieren zahlreiche Untersuchungen zur Variabilität und genetischen Konstitution von Fichten und den aus ihnen zusammengesetzten Populationen. Während für die morphologischen und physiologischen Merkmale davon ausgegangen wird, dass diese in 50% der Fälle zu fehlerhaften Zuordnungen führten (KLEINSCHMITT et al. 1981a, 1981b), gewann die Isoenzymanalyse wegen ihrer Genauigkeit und relativ einfachen Interpretierbarkeit immer mehr an Bedeutung. Heute gelten sowohl die Isoenzymvariationen als auch die generellen Differenzierungen zwischen Populationen der Fichte europaweit im Vergleich zu anderen Baumarten als gut dokumentiert (LEWANDOWSKI et al. 1997). Aber die in Kap. 2.4.1 beschriebenen Beschränkungen und Probleme (z.B. Stichprobengröße, beschränkte Markerzahl, Abhängigkeit von Probenmatrix und Jahreszeit etc.) haben in vorliegender Untersuchung die Grundlage für die Verwendung verschiedener molekulargenetische Verfahren auf PCR-Basis gelegt. Wie gezeigt werden konnte, sind die erzielten Ergebnisse aber sehr uneinheitlich und zum Teil gegensätzlich. Um eine allgemeine Diskussion über die genetische Variabilität der Bestände und ihre Differenzierung führen zu können, sollen deshalb in der Folge zunächst einige Problemfelder der angewandten molekulargenetischen Methoden erläutert werden.

PCR

Wie bereits eingangs bei der Auswahl der Methode bemerkt, handelt es sich bei der PCR um ein vergleichsweise einfaches, universelles Verfahren, mit dem Polymorphismen in einer Vielzahl unterschiedlicher Matrizen detektiert werden können. Das Prinzip aller PCR-Verfahren besteht in der Anlagerung (*annealing*) ausgewählter DNA-Sequenzen (Primer) an komplementären Bindungsstellen der *target* DNA und der zyklischen Vervielfältigung von an dieser Bindungsstelle beginnenden synthetisierten DNA-Abschnitten. Durch diese zyklische Vervielfältigung werden DNA-Fragmente von einem einzigen Molekül bis zu einer Größe von 10 kbp in Abhängigkeit von der Zyklenzahl tausend- bis millionenfach vervielfältigt und elektrophoretisch nachweisbar (vgl. WHITE et al. 1989, ARNHEIM et al. 1990, INNIS & GELFAND 1990, ERLICH et al. 1991, ARNHEIM & ERLICH 1992). Dies beinhaltet zum einen die Gefahr der Vervielfältigung und Berücksichtigung von fehlerhaft synthetisierten DNA-Fragmenten (z.B. Strangbrüche, *loops* etc.), zum anderen aber auch die Gefahr der Analyse von *non target*-DNA. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass die Empfindlichkeit von PCR-Verfahren hinsichtlich möglicher Störgrößen umfassend diskutiert ist (vgl. KWOK & HIGUCHI 1989, KWOK et al. 1990, Kwok 1990, ECKERT & KUNKEL 1990 1991, 1993, REISS et al. 1990, RYCHLIK et al. 1990, HEDRICK 1992, ELLSWORTH 1993, GUSTAFSON et al. 1993, MCPHERSON et al. 1993, MEUNIER &

GRIMONT 1993, MURALIDHARAN & WAKELAND 1993, PENNER et al. 1993, HE et al. 1994, LAMBOY 1994a, 1994b, MICHELI et al. 1994, PARK & KOHEL 1994, CHA & THILLY 1995, ROUX 1995, JONES et al. 1997, RAFALSKI 1997). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde dieser Problematik dadurch begegnet, dass jeder Versuchsansatz (PCR und Elektrophorese) mindestens drei Mal wiederholt wurde und für die Auswertung der Amplifikationsmuster ein festes, zuvor definiertes Schema eingehalten wurde (vgl. Kap. 4.3; vgl. auch SKROCH & NIENHUIS 1995). Es bleibt festzuhalten, dass die Amplifikation von *non target*-DNA insbesondere die RAPD- und ISSR-Anwendung betrifft, da die Gefahr der „Fehlamplifikation" wegen der großen Anzahl amplifizierter Fragmente und der anfänglichen Unkenntnis der Zielfragmente größer ist. Dies ist bei der SSR- und der EST-Analyse annähernd vernachlässigbar, da die Größe der Zielsequenz bekannt ist und in den meisten Fällen nur zwei Allele detektiert werden. Die einzige Ausnahme hiervon stellt das EST-Markersystem PA0066 dar, mit dem mehrere DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnten. Diese wurden allerdings für die Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Das in diesem Kontext ebenfalls zu erwähnende Problemfeld der *stutter bands* ist im entsprechenden Unterkapitel (SSR) diskutiert.

RAPD

Wenn auch die Untersuchungen von BUCCI & MENOZZI (1993, 1995), BINELLI & BUCCI (1994), BUCCI et al. (1995, 1997a, 1997b), LEHNER et al. (1995), HEINZE et al. (1996), FOURRE et al. (1997), SKOV (1998a, 1998b, 1998c, 1999), SKOV & WELLENDORF (1998), SCOTTI et al. (1998), COLLIGNON & FAVRE (2000) und TROGGIO et al. (2001) die erfolgreiche Verwendung der RAPD-PCR für Fragen der Differenzierung von Individuen und Beständen belegen, soll an dieser Stelle die Problematik der Bewertung genetischer Variabilität und genetischer Differenzierung durch RAPD-Marker angesprochen werden bzw. soll dargestellt werden, wie diese Problemfelder in vorliegender Untersuchung behandelt wurden.

Wie in Kap. 5.2.1 gezeigt werden konnte, sind die ermittelten Ergebnisse wesentlich von den abgebildeten Genorten und somit von den ausgewählten **Primern bzw. deren Anzahl** abhängig. In Abb. 77 ist am Beispiel der Ergebnisse der Berechnung der genetischen Diversität (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) die Primerabhängigkeit der Ergebnisse dargestellt. Das Komponentendiagramm der Faktorenanalyse dieser Daten zeigt, dass die Mehrheit der verwendeten RAPD-Primer tendenziell ähnliche Ergebnisse produziert, wenngleich die Ergebnisse der Primer B13, B16, C452 und C479 z.T. wesentlich davon abweichen. Dies ist allerdings dadurch begründbar, dass mit RAPD-Primern unbekannte Loci detektiert werden, die sich hinsichtlich ihrer Differenzierungsleistung für Individuen und/oder Populationen wesentlich unterscheiden können (vgl. PEJIC et al. 1998). Die Nicht-Berücksichtigung dieser Primer würde einen Informationsverlust darstellen, da an den mit diesen Primern untersuchten Loci andere Differenzierungsmuster nachgewiesen wurden und diese somit auch vorhanden sind.

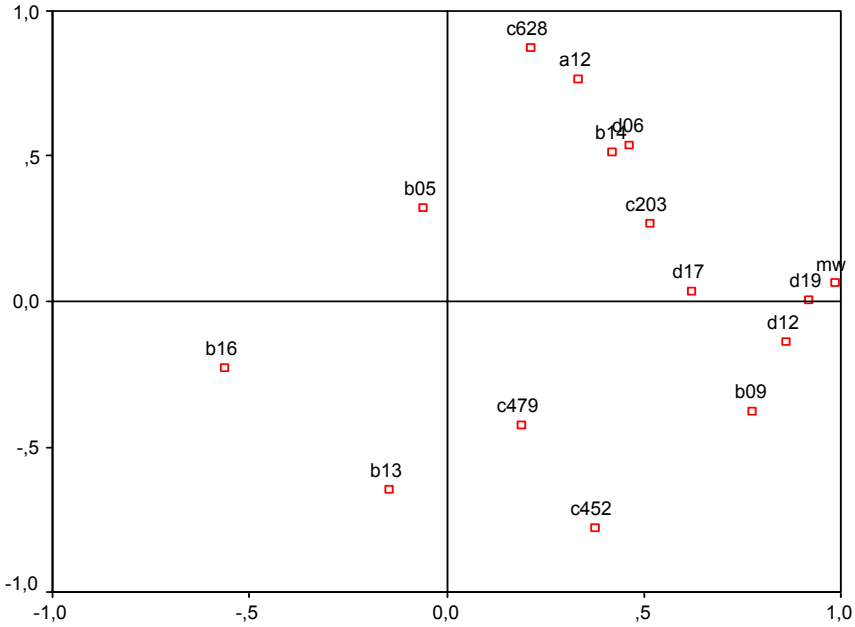


Abb. 77: **Komponentendiagramm der Hauptkomponentenanalyse der je nach RAPD-Primer ermittelten genetischen Diversität (nach LYNCH & MILLIGAN 1994) zur Überprüfung der Abhängigkeit der Ergebnisse vom verwendeten RAPD-Primer (Varimax rotiert)**

Diese Überlegungen wurden durch die Untersuchungen von HEINZE et al. (1996) ebenfalls bereits aufgegriffen. Die Autoren beobachteten, dass die Einzelergebnisse der RAPD-Primer nicht immer zur Unterscheidung der untersuchten Populationen führten, wenngleich die Gesamtbetrachtung aller Primer-Daten eine signifikante Unterscheidung der untersuchten Individuen zuließ. Die Ausführungen von HEINZE et al. (1996) berücksichtigend, wurde auf eine Auswertung der Einzelergebnisse der Primer verzichtet und die Auswertung der RAPD-Profile auf die Gesamtbetrachtung aller Genorte beschränkt. Vor diesem Hintergrund sei nochmals darauf hingewiesen, dass sich durch die Verwendung mehrerer Primer die Zahl polymorpher Marker erhöht und die statistische Sicherheit einer richtigen Aussage gesteigert wird (BURKE et al. 1991, HADRYS et al. 1991, BOWDITCH et al. 1993). In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchung von VAN DE VEN & MCNICHOL (1995) verwiesen, die in Untersuchungen zur Differenzierung von *Picea sitchensis*-Individuen von fünf Klon-Samenplantagen ein Minimum von vier RAPD-Primern fordern, um alle Fichten-Klone sicher voneinander trennen zu können (vgl. auch FOURRÉ et al. 1997). Im Gegensatz dazu verwendeten COLLIGNON & FAVRE (2000) 31 RAPD-Primer für die Differenzierung von insgesamt 90 französischen *Picea abies*-Individuen. Mit diesen wurden aber lediglich 137 polymorphe RAPD-Marker amplifiziert. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass in vorliegender Untersuchung durch die Verwendung von 14 Primern, mit denen 234 Loci detektiert werden konnten, eine statistisch ausreichende Anzahl von Markern in die Untersuchung einbezogen wurde (vgl. LYNCH & MILLIGAN 1994).

Ein weiteres Problem hochinformativer polymorpher Amplifikationsmuster besteht in der **Comigration von DNA-Fragmenten**. Arten mit großem Genom, wie beispielsweise auch Koniferen, enthalten große Anteile repetetiver DNA. Aus diesem Grund können einfach gebaute RAPD-Primer viele komplementäre Annealingstellen finden, von denen zahlreiche Fragmente in der PCR synthetisiert werden und im Elektrophoresegel zahlreiche Banden abbilden. In Abhängigkeit des verwendeten Primers migrieren diese Fragmente sehr nahe beieinander und vergrößern die Gefahr der fehlerhaften Auswertung. Das Comigrieren nichthomologer Banden wird somit mit zunehmender Genomgröße und zunehmendem Anteil nicht-codierender, repetetiver DNA wahrscheinlicher (vgl. HURME & SAVOLAINEN 1999). Entsprechend den Ausführungen zum Genom der Koniferen (vgl. Kap. 2.5; MIKSCHE 1985, ARUMUGANATHAN & EARLE 1991, GOVINDARAJU & CULLIS 1991, PAGLIA et al. 1998) stellt die Comigration eine wesentliche Gefahr bei der RAPD-Analyse von Fichten dar. Dieses Problem wurde in vorliegender Studie dadurch vermieden, dass eine strikte Vorauswahl von Primern erfolgte und dadurch lediglich gut auswertbare Amplifikationsmuster mit distinkten DNA-Fragmenten in die Untersuchung einbezogen wurden (vgl. Kap. 4.2.3). Von den ursprünglich 206 getesteten RAPD-PCR-Primern wurden 28 für geeignet empfunden und letztlich 14 für die populationsgenetische Analyse ausgewählt.

Die **statistische Auswertung** der erhaltenen Amplifikationsmuster stellt einen weiteren Diskussionspunkt dar, da bisher keine einheitliche Vorgehensweise bei der Aus- und Bewertung von Amplifikationsmustern dominanter Marker vorliegt (vgl. QUACK 1998). Prinzipiell besteht die Möglichkeit alle im Gel nachweisbaren DNA-Fragmente als Marker zu berücksichtigen oder aber auch nur Loci mit starken Signalen als Marker zu werten. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise von PÉREZ et al. (1998) der Ausschluss schwacher Signale wegen fehlender bzw. schwächerer Reproduzierbarkeit gefordert und die alleinige Nutzung diskreter bzw. starker Signale empfohlen. Da die Signalstärke aber lediglich von der Anzahl der PCR-Zyklen – in Kombination mit der Anzahl an Zielsequenzen in der *template* DNA – abhängig ist (vgl. RAMECKERS et al. 1997), sollte sie bei der Markerdefinition nicht als Kriterium berücksichtigt werden. Der Ausschluss selten auftretender DNA-Fragmente im niedrigmolekularen Bereich (<300 bp) muss allerdings getrennt davon betrachtet werden. Hierbei handelt es sich um vergleichsweise kleine Moleküle, deren Vorhandensein häufig durch Scherung der *template* DNA oder durch fehlerhaftes Annealing während der PCR begründet sein kann. Zudem weisen die handelsüblichen Agarosen in diesem Größenbereich eine zu geringe Trennschärfe auf um die DNA-Fragmente stets sicher anzusprechen. Es empfiehlt sich daher zum einen eine ausreichende Anzahl von Wiederholungen (PCR und Elektrophorese) festzulegen um hohe Reproduzierbarkeit der Amplifikationsmuster zu gewährleisten und zum anderen einen Auswertebereich (z.B. 350-2100 bp) zu bestimmen, auf den die Markerdefinition beschränkt wird (vgl. SKROCH & NIENHUIS 1995). Die unter Berücksichtigung dieser Aspekte in vorliegender Untersuchung vorgenommene Vorgehensweise zur Aus- und Bewertung der Amplifikationsmuster wurde in Kap. 4.3 detailliert beschrieben.

In Bezug auf die Auswertung und die statistischen Bewertung der RAPD-Marker sei in diesem Zusammenhang nochmals die Problematik der **Dominanz** erwähnt. Da es sich bei RAPD-Markern um dominante Marker handelt, ist es im diploiden Organismus nicht möglich zwischen homozygoten und heterozygoten Individuen zu unterscheiden, was trotz angepasster statistischer Verfahren (vgl. LYNCH & MILLIGAN 1994, ZHIVOTOVSKY 1999) in Fehleinschätzungen der Allelfrequenzen des Nullaleles resultieren kann (vgl. NEALE & HARRY 1994). Um dieses Problem zu umgehen, kann entweder haploides Probenmaterial (z.B. Megagamatophyten) verwendet werden (vgl. Kap. 6.1.1), oder es sind – wie in vorliegender Untersuchung – zur Absicherung der Ergebnisse zusätzlich codominante Markersysteme zu berücksichtigen.

Die vielfach diskutierte Problematik, dass **in vergleichenden Untersuchungen** die **RAPD-Analyse** gegenüber RFLP-, SSR- und AFLP-Analysen **abweichende Muster** aufzeigt, verdient ebenfalls Erwähnung (vgl. u.a. PEJIC et al. 1998). Dieses Phänomen wird auch von POWELL et al. (1996) beschrieben, die die geringsten Korrelationen zwischen RAPD- und anderen Marker-Systemen nachweisen konnten und eine Unterschätzung der genetischen Distanzen durch RAPD-Marker vermuten (vgl. auch FOURRÉ et al. 1997, RAFALSKI 1997). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden zwischen den verwendeten Verfahren nur geringfügige Abweichungen hinsichtlich der angelegten populationsgenetischen Parameter ermittelt. Aus diesem Grund kann auf eine Diskussion der methodenspezifischen Unterschiede in den Ergebnissen verzichtet werden.

Es bleibt festzuhalten, dass anhand der RAPD-Analyse wesentliche Informationen hinsichtlich der genetischen Charakterisierung der untersuchten Populationen gewonnen werden konnten und diese unter Berücksichtigung der genannten Problemfelder auch sinnvoll zu interpretieren sind. Wenngleich eine Vereinheitlichung der methodischen Vorgehensweise dringend geboten ist, besteht die Zukunft der RAPD-Analyse sicherlich in ihrer einfachen Anwendbarkeit sowie in der Etablierung spezifischer Primer bzw. in der Weiterentwicklung von RAPD zu SCAR (*sequence characterized amplified region*), das sowohl gute Eigenschaften der RAPD-Analytik beinhaltet, als auch die problembehafteten Aspekte ausschließt (vgl. SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b, SCOTTI et al. 1998).

ISSR

Das ISSR-Verfahren ist bisher noch nicht für populationsgenetische Analysen von *Picea abies* verwendet worden. Dementsprechend liegen zur Zeit keine Erkenntnisse zur Eignung von Primern bzw. Markern für die genannten Fragestellungen vor, weswegen die Anwendung der Methode kritisch zu prüfen ist. Entsprechend den Angaben von RADDI et al. (1994), dass sich die Möglichkeit Verbindungen der genotypischen Profile der Einzelbäume und ihrer Anpassung an die Umweltbedingungen nachzuweisen sich mit dem Gebrauch weiterer molekulargenetischer Marker erhöht, wurden ISSR-Primer – ungeachtet ihrer Eignung – zusätzlich in die Untersuchung einbezogen. GÄRTNER et al. (1996) fordern in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass es „bei einer geschätzten

Zahl von 2000 polymorphen Genloci bei der Fichte“ notwendig sei, so viele Genloci wie möglich in die Untersuchung einzubeziehen.

Prinzipiell handelt es sich bei der ISSR um ein gegenüber der RAPD-PCR identisches Verfahren, weswegen die oben bereits diskutierten Problemfelder der **dominanten Marker**, der **statistischen Auswertung** und der **Comigration der DNA-Fragmente** auch die Anwendung der ISSR-PCR betreffen. Die beiden letztgenannten Aspekte sollen allerdings nicht überbewertet werden, da aufgrund der Primerlänge (14-19 bp) weniger Annealingstellen im *template* Genom anzutreffen sind und deswegen generell von einer geringeren Markerzahl auszugehen ist.

Im Gegensatz dazu ist die Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der verwendeten **Primeranzahl** sicherlich kritischer zu betrachten. Im Rahmen der ISSR-Untersuchung wurden sieben Primer hinsichtlich ihrer Eignung zur Differenzierung der Fichtenpopulationen getestet und letztlich vier Primer für die populationsgenetische Analyse verwendet. Wie bei der Diskussion der angewendeten RAPD-PCR gezeigt werden konnte, ist fraglich, ob durch die mittels der vier Primer ermittelten 36 Marker tatsächlich repräsentative Aussagen möglich sind. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass durch die Ergebnisse der ISSR-Analyse nicht exakt die Ergebnisse der RAPD-Analyse bestätigt werden können. Es bleibt festzuhalten, dass anhand der ISSR-Analyse die Ergebnistendenzen hinsichtlich geringer genetischer Differenzierung der Populationen, hoher genetischer Variabilität der Populationen und hinsichtlich dessen, dass die Variation innerhalb der Art hauptsächlich auf die Variation innerhalb der Populationen zurückgeführt werden kann, identisch mit den übrigen Verfahren sind. Aufgrund der niedrigen Markerzahl soll deshalb auf eine detaillierte Diskussion der ISSR-Daten verzichtet werden und eine Diskussion der Ergebnisse lediglich auf der Ebene der zusammenfassenden Betrachtung aller Markersysteme erfolgen. Für weitergehende ISSR-Analysen erscheint es aber essenziell, dass ein **umfangreicheres Set an Primern** gescreent wird und dadurch eine **größere Markerzahl** erhalten werden kann (vgl. auch RADDI et al. 1994, GÄRTNER et al. 1996).

SSR

Nach Angaben von RIEGEL (2001) sind dominante Marker im Vergleich zu codominanten zur Quantifizierung der genetischen Variation in Populationen eher weniger geeignet. Aus diesem Grund wurden mit dem SSR-Verfahren – und dem unten diskutierten EST-Verfahren – **codominante Marker** in die Untersuchung ergänzend mit einbezogen.

Im Rahmen der Untersuchung wurden sieben von PFEIFFER et al. (1997) für die Differenzierung italienischer *Picea abies*-Populationen entwickelte SSR-**Primer** auf ihre Eignung hinsichtlich der Differenzierung der untersuchten deutschen Bestände geprüft. Diese Primer entstammen einem Set von 36 von PFEIFFER et al. (1997) empfohlenen SSR-Primern und wurden deshalb ausgewählt, weil sie die Differenzierung italienischer *Picea abies*-Populationen durch einen polymorphen Locus ermöglichten. Während mit vier dieser sieben Primer keine Amplifikationsmuster erzielt werden

konnten, wurden mit den drei geeigneten Primern statt der zu erwartenden drei Marker insgesamt 34 Marker amplifiziert. Wenn dies die Auswertung der Analyse auch etwas komplexer werden lies, so findet sich eine Bestätigung hierzu in der Studie von GEBUREK et al. (1998). Die Autoren verwendeten zur Differenzierung österreichischer *Picea abies*-Populationen ebenfalls drei der von PFEIFFER et al. (1997) empfohlenen Primer, die sich durch einen polymorphen Locus auszeichnen sollten, und konnten 28 bzw. 34 Allele nachweisen. Da in vorliegender Untersuchung kein Nachweis eines populationsspezifischen Markers bzw. einer spezifischen Markerkombination erbracht werden konnte, wurden die ermittelten Daten einer vollständigen populationsgenetischen Analyse unterzogen. Da hierzu aber in der Summe nur 34 Marker zur Verfügung standen, gilt hinsichtlich der **statistischen Sicherheit** der Auswertung das bei der Diskussion der ISSR-Analyse Gesagte auch hier.

Ein wesentlicher Aspekt zur Einbeziehung codominanter Marker in die vorliegende Untersuchung bestand in dem zusätzlichen Informationsgewinn hinsichtlich des populationsgenetisch bedeutenden Parameters der **Heterozygotie**. Der Heterozygotiegrad von Populationen wird als Diversitäts- bzw. Variabilitätsmaß mit der Fähigkeit von Populationen gleichgesetzt, auf Umweltveränderungen flexibel reagieren zu können und wird häufig mit der Fitness von Populationen in Zusammenhang gebracht (vgl. HANSSON & WESTERBERG 2002). Im Rahmen der Analyse wurden aber an allen drei Loci unterdurchschnittliche Heterozygotiegrade ermittelt. Dies ist insofern ungewöhnlich, als dass gerade Koniferenpopulationen durch einen hohen Heterozygotiegrad charakterisiert sein sollen (vgl. Kap. 6.3.2). Darüber hinaus wurde anhand der angelegten Diversitätsparameter sowohl in der SSR-Analyse als auch mit Hilfe der RAPD-, ISSR- und EST-Analyse eine große genetische Variation innerhalb der Populationen nachgewiesen. Dieser Widerspruch kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht umfassend erklärt werden.

Hinsichtlich der oben erwähnten, von der Untersuchung ausgeschlossenen Primer bleibt zu ergänzen, dass mit den Primern SpAGC1, SpAGC2 sog. **Schattenbanden (*stutter bands*)** ermittelt wurden. Hierbei handelt es sich um gel- oder kapillarelektrophoretisch nachweisbare Bandenmuster, die durch Replikationsfehler während der PCR entstehen und ein vergleichsweise häufiges Phänomen darstellen (vgl. u.a. FERNANDO et al. 2001, LI et al. 2002). *Stutter bands* weisen denselben Abstand zueinander auf, wie die eigentlichen SSR-Allele. Das bedeutet, dass bei heterozygoten Individuen auch zwei zusätzliche Banden auftreten und deswegen auch vergleichsweise einfach als Replikationsfehler angesprochen werden können. Wenn auch FERNANDO et al. (2001) und LI et al. (2002) davon ausgehen, dass *stutter bands* ein gewöhnliches Phänomen darstellen und die Auswertbarkeit der Amplifikationsmuster nicht beeinträchtigt wird, wurde zur Vermeidung von Fehlern auf eine Auswertung dieser Daten verzichtet.

EST

Die Berücksichtigung von EST-Markern für die vorliegende Untersuchung stützte sich auf die Tatsache, dass es sich bei *expressed sequence tags* um exprimierte DNA-Abschnitte bekannter

Basensequenz und bekannter Funktionalität handelt. Der funktionale Zusammenhang von elektrophoretisch nachgewiesener Sequenz und der Bedeutung im Stoffwechsel der untersuchten Art macht EST-Marker für den populationsgenetischen Vergleich besonders interessant (CATO et al. 2001). Insbesondere vor dem Hintergrund, dass anhand isoenzymatischer Studien zahlreiche Informationen hinsichtlich der Differenzierung zwischen Populationen und der Variation innerhalb von Populationen vorliegen (vgl. Kap. 2.4.1), erscheint die Verwendung exprimierter Sequenzen vielversprechend. Dies gilt v.a. deshalb, weil DNA-gestützte Verfahren im Vergleich zu Isoenzymanalysen aufgrund der deutlich höheren Markerzahl als wesentlich informativer eingeschätzt werden (vgl. WILDE et al. 1992, KOLLER et al. 1993, CHAN & SUN 1997). In diesem Zusammenhang wurden von RIEGEL (2001) und SCHUBERT et al. (2001) speziell für die Analyse von *Picea abies* EST-Primer entwickelt, die in vorliegender Untersuchung zur Charakterisierung der ausgewählten Populationen verwendet wurden. Dabei handelt es sich allerdings nicht um Sequenzen mit bekannter Funktion im Stoffwechsel der Fichte, sondern lediglich um mehr oder weniger große **Protein-Sequenzhomologien**. Während von SCHUBERT et al. (2001) mit dem cDNA-Klon pPA0034 keine Homologien gefunden wurden, entsprechen pPA0043 zu 86% dem 78 KD glucoseregulierten Protein von *Nicotiana tabacum* und pPA0066 zu 78% dem 60S ribosomalen Protein L13-2 von *Brassica napus*. Die Verwendung der daraus gewonnenen Primer ermöglicht zwar den gezielten Nachweis der Zielsequenzen und ihrer populationsspezifischen Ausprägung, eine exakte **Relevanz für den Stoffwechsel der Fichte** ist daraus aber nicht ableitbar.

Da in vorliegender Untersuchung – ebenso wie bei der SSR-Analyse – kein Nachweis eines populationsspezifischen Markers bzw. einer spezifischen Markerkombination erbracht werden konnte, wurden die ermittelten Daten einer populationsgenetischen Analyse unterzogen. Hierbei ergaben die angelegten Parameter sehr hohe genetische Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Populationen und im Vergleich zu den ebenfalls codominanten SSR-Markern nur mittlere Variabilitätsgrade. Auch wenn anhand der drei Markersysteme hohe bis sehr hohe Heterozygotiegrade nachweisbar waren, und somit die Ergebnisse von RAPD-, ISSR- und SSR-Analyse weitestgehend bestätigt werden konnten, so stellt sich aufgrund der **geringen Markerzahl** die Frage der statistischen Sicherheit der Auswertung. Da zum jetzigen Zeitpunkt aber keine weiteren EST-Primer für *Picea abies* vorliegen, konnte die Auswertung lediglich über die neun nachweisbaren Marker erfolgen. Für zukünftige Analysen erscheint die Entwicklung weiterer EST-Marker für die Fichte unabdingbar, wenngleich auch die vorliegenden Daten eine sinnvolle Interpretation ermöglichten. Nichtsdestotrotz erscheint nach entsprechender Etablierung des EST-Verfahrens die Anwendung dieses Markertyps aufgrund des funktionalen Zusammenhangs von genetischer Struktur und Stoffwechsel als ein sehr **zukunftsfähiges Verfahren**.

6.2 Diskussion der Ergebnisse der morphologisch-biometrischen Charakterisierung

Wie in der Beschreibung der Untersuchungsflächen (vgl. Kap. 3) dargestellt wurde, existieren zwischen den Untersuchungsflächen zum Teil wesentliche Standortsunterschiede, was morphologische Differenzierungen zwischen den Individuen der jeweiligen Populationen erwarten lässt. Die morphologisch-biometrische Charakterisierung der Populationen ergab demgemäß auch große Unterschiede hinsichtlich der ausgewählten Parameter. Es konnte gezeigt werden, dass die sieben Populationen z.T. signifikante Unterschiede hinsichtlich des Stammumfangs, der erreichten Baumhöhe, der Trieblänge einjähriger Triebe und in den Triebgewichten aufweisen. Ebenso konnten anhand der berechneten Relationen von Stammumfang/Baumhöhe und Tausennadelgewicht/ Trieblänge Differenzierungen zwischen den Populationen glaubhaft gemacht werden. Die Ergebnisse resultierten in der Beschreibung von drei Typen:

- dem **Berchtesgaden-Typ**, dessen Bäume sich durch niedrigen aber kräftigen Wuchs auszeichnen und dessen Triebe vergleichsweise kurz und kompakt erscheinen,
- dem **Belau-Typ**, dessen Bäume durch starkes Höhenwachstum bei niedrigem Stammdickenwachstum durch ein schlankes Erscheinungsbild geprägt sind und dessen Triebe bei niedrigen Triebgewichten verhältnismäßig lang sind sowie
- dem **intermediären Typ**, der abhängig von dem betrachteten Parameter der einen oder der anderen Form näher steht und sowohl hinsichtlich der Baumform als auch der Form der Triebe zwischen diesen beiden Extremen anzuordnen ist.

Aufgrund der Vielzahl standortkundlicher Faktoren, die auf die jeweiligen Populationen einwirken, sind die exakten Ursachen der Differenzierungen nicht näher definierbar. Aufgrund der großen ökologischen Valenz der Fichte ist zwar nicht davon auszugehen, dass Bodentypen, Geologie oder Bodenchemismus prägenden Einfluss auf das morphologische Erscheinungsbild der Individuen haben (vgl. SCHMIDT-VOGT 1977), aber gerade klimatische Faktoren werden häufig hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Wachstum der Fichte diskutiert (vgl. HOLZER 1967, KRUTZSCH 1974, SAUER et al. 1973, HOLZER et al. 1991, MÖLLEKEN et al. 1996). Aber auch in diesem Fall können mögliche Differenzierungen sicherlich nicht monokausal erklärt werden, sondern es muss angenommen werden, dass ein Faktorengefüge aus Standortfaktoren und Entwicklungsgeschichte für die strukturelle Ausprägung der Bestände verantwortlich ist.

In diesem Zusammenhang erscheint insbesondere die Betrachtung der **natürlichen Populationen** sinnvoll, da hier **anpassungsbedingte Prozesse** zu vermuten sind, die sich über Physiologie und Stoffwechsel auf die Morphologie der Bäume auswirkt haben könnten. Beispielhaft sei hier genannt, dass aufgrund einer verkürzten Vegetationsperiode Veränderungen im Stoffwechsel eintreten können, die sich in einem geringeren Nadelwachstum und somit in einem geringeren TNG äußern. Wenn anhand des TNG auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Populationen nachweisbar

waren, so ist aber hinsichtlich der Baumform eine strukturelle Anpassung an klimatische Faktoren zu vermuten (vgl. HOLZER 1967). Diesbezüglich ist insbesondere die Sensitivität verschiedener Wuchsformen der Fichte in Bezug auf Schnee- und Eisbruch hinlänglich beschrieben (vgl. u.a PRIEHÄUSSER 1956, SCHMIDT-VOGT 1972d, SCHMIDT-VOGT et al. 1992). Am Beispiel der Population von Berchtesgaden kann angenommen werden, dass die Baumhöhe und -form eine Funktion des Wind- bzw. Schneeeinflusses darstellt. Ein gedrungener Wuchs der Bäume ist mit einem besseren Schutz vor Wind- bzw. Schneebruch gleichzusetzen. Gleichzeitig stellen kurze und vergleichsweise leichte Triebe in Kombination mit mittleren Nadelgewichten, was bei der Beschreibung der Typen als kompaktere Wuchsform der Triebe bezeichnet wurde, einen sehr guten Verdunstungsschutz dar. Diese Kombination morphologischer Parameter konnte in vorliegender Untersuchung nur im strahlungsintensiven und durch eine kurze Vegetationsperiode charakterisierten Wimbachtal nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass auch in zahlreichen anderen Arbeiten die Abhängigkeit des Wachstums der Fichte von der Meereshöhe beschrieben wird (vgl. u.a. HOLZER 1967, BARTEL et al. 2002, 2003a) und davon ausgegangen wird, dass mit steigender Höhenlage einer Population nachweislich deren Wuchskraft sinkt (vgl. SCHMIDT-VOGT 1974b, SKRØPPA & MAGNUSSEN 1993, SKRØPPA 1994). Ebenso werden in der Literatur für alpine Fichtenvorkommen u.a. signifikante Korrelationen ihrer Höhenlagen mit den Parametern Augusttriebbildung, Knospenbildungsindex, Sprosslänge und Sprossgewicht beschrieben (KONNERT & FRANKE 1990). Es bleibt aber festzuhalten, dass dies anhand der ermittelten Daten nicht auf alle drei „natürlichen“ Populationen übertragen werden kann. Bei annähernd allen Parametern werden die in Berchtesgaden ermittelten „Extremwerte“ von den Populationen aus dem Bayerischen Wald und aus dem Harz nicht erreicht.

Anhand der durchgeführten einfaktoriellen Mittelwertsvergleiche (ANOVA) wird zwar deutlich, dass die „natürlichen“ Populationen von Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz häufig zusammengruppiert werden, aber die vermutete, anpassungsbedingte Ähnlichkeit zwischen den Individuen nicht besteht. Aus diesem Grund wurde die **Gruppenhypothese** aufgestellt, mit deren Hilfe eine morphologische Differenzierung der natürlichen und der künstlichen Populationen überprüft werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich bezüglich der Trieblänge, des Triebgewichtes (Nadel- und Sprossachsentrockengewicht) und der TNG-Trieblänge-Relation signifikante Unterschiede zwischen den beiden angenommenen Gruppen nachweisbar sind. Anhand der übrigen angelegten Parameter konnte eine Substrukturierung der Populationen nicht nachvollzogen werden. Das heißt, für die Mehrzahl der angelegten Parameter ist trotz großer morphologischer Unterschiede eine Trennung in natürliche und künstliche Populationen nicht nachweisbar. In diesem Zusammenhang kann vermutet werden, dass die Gruppenbildung zufällig eine Funktion der Meereshöhe darstellt, da es sich bei den drei natürlichen Populationen um die Standorte mit den höchsten Höhen über NN handelt.

Abschließend sei noch kurz auf die morphologische Differenzierung der **künstlichen Bestände** eingegangen. Wie in Kap. 5.1 gezeigt werden konnte, bestehen zwischen allen untersuchten Beständen zwar vereinzelt größere Differenzierungen, aber im Vergleich der Bestände von Hunsrück,

Solling, Warndt und Belau ist – trotz des unterschiedlichen Bestandsalters – hinsichtlich aller morphologisch-biometrischer Parameter von einer vergleichsweise schwachen Differenzierung auszugehen. Die morphologische Einheitlichkeit der künstlichen Bestände ist vermutlich auf ihre Entstehungsgeschichte zurückzuführen. Wenn auch entsprechend der mittlerweile gesetzlich geregelten Vorgehensweise im Saatguthandel die Bestände aus unterschiedlichen Saatgut-Herkünften aufgebaut sind, so ist das Prinzip ihrer Zusammensetzung doch identisch: Es handelt sich in allen Fällen um gemischtes Saat- oder Pflanzgut, dass auf wenige zentrale Stellen (Klengen) zurückgeführt werden kann. Entsprechend den Ausführungen von KRUTZSCH (1974) und LAGERKRANTZ & RYMAN (1990) ist auch aus morphologischer Sicht zwischen Fichtenherkünften des zentraleuropäischen Bereichs nur von einer geringen Differenzierung auszugehen. Wenn deshalb die morphologische Ähnlichkeit der Bestände von Hunsrück, Solling und Warndt auch leicht verständlich wird, so muss für den Belauer Bestand dennoch eine Sonderstellung diagnostiziert werden. Bei Betrachtung der morphologischen Parameter fällt auf, dass der Belauer Bestand durch signifikant geringeren Stammumfang ($p<0,05$), größere Trieblängen ($p<0,05$), geringeres TNG ($p<0,05$) und geringeres Triebgewicht ($p<0,05$) charakterisiert ist. Bezüglich der biometrischen Kenngrößen weicht er hinsichtlich Stammumfang-Baumhöhen-Relation ($p<0,05$), TNG-Trieblänge-Relation ($p<0,05$) und Trieblänge-Triebgewicht-Relation ($p<0,05$) von den übrigen künstlichen Beständen ebenfalls signifikant ab. Da es sich bei diesen Abweichungen überwiegend um aus physiologischer oder wachstumstechnischer Sicht nachteilige Differenzierungen handelt, muss daraus geschlossen werden, dass an diesem Standort keine optimalen Wuchsbedingungen vorliegen. Eine ergänzende Erläuterung dieser Daten kann durch die routinemäßig erhobene biometrische Charakterisierung der im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) beprobten Fichten erfolgen. Auch im Rahmen dieser sehr viel größeren Stichprobe wird deutlich, dass die Wuchsbedingungen für die Fichte in Belau deutlich schlechter sind als in den übrigen Probenahmegebieten (vgl. BARTEL et al. 2003a). Darüber hinaus wurden im Rahmen einer Sonderuntersuchung nach identischen Richtlinien auch im Fläming Fichtentriebe beprobt. Der Fläming gilt mit seiner kontinentaleren Lage und seinen sandigen Böden als ein klassisches Verbreitungsgebiet für Kiefern, und ist im Vergleich zu Belau aufgrund des veränderten Wasserhaushalts als aus forstlicher Sicht noch ungeeigneter einzustufen. Beispielsweise anhand der Trieblänge kann gezeigt werden, dass es sich hier um sehr nachteilige Standort-bedingungen für die Fichte handeln muss (vgl. Abb. 78). Abschließend bleibt deshalb zu bemerken, dass, wenn auch das Wachstum der Bäume primär von Genotyp und Umweltbedingungen (RÖHLE 1995, MÖLLEKEN et al. 1996) sowie von der Herkunft des Saatgutes (SAUER et al. 1973, SKRØPPA & MAGNUSSEN 1993) abhängt, anhand dieser Datenlage vermutet werden kann, dass sich auch die Entfernung eines Standortes vom natürlichen Verbreitungsgebiet der Fichte auf die Wuchs-bedingungen auswirken kann.

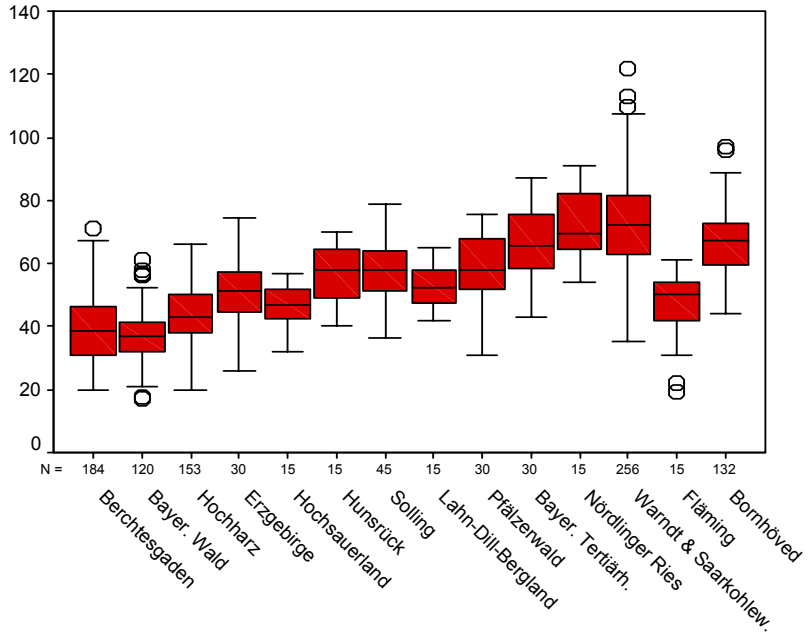


Abb. 78: **Zusammenhang zwischen Trieblänge [mm] einjähriger Fichtentriebe und der Höhenlage über NN (Datenquelle: Umweltprobenbank des Bundes, unveröffentlicht)**

6.3 Diskussion der populationsgenetischen Analysen – Zusammenfassende Betrachtung aller verwendeten molekulargenetischen Markersysteme

Wie in der populationsgenetischen Analyse gezeigt werden konnte (vgl. 5.2) variieren die je nach verwendetem Markersystem bzw. nach verwendeter Methode ermittelten Ergebnisse in der Feinbetrachtung deutlich. Bei Betrachtung der **dominanten Markersysteme** wird deutlich, dass es sich bei der Population des Bayerischen Waldes um die diverseste Population zu handeln scheint, während die ISSR-Analyse die höchsten Diversitätsmaße in Berchtesgaden, Solling und Warndt nachweist. Ebenso geben die ISSR-Marker hohe Ähnlichkeiten insbesondere zwischen den Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte wider, wogegen anhand der RAPD-Marker generell niedrige Distanzen zwischen den Populationen nachgewiesen werden und deswegen eine Substrukturierung der Grundgesamtheit nicht nachvollzogen werden kann. Die **codominanten Markersysteme** unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich der ermittelten Heterozygotiegrade an den betreffenden Loci. Während an den drei SSR-Loci vergleichsweise geringe Heterozygotenanteile berechnet wurden, zeigen die drei untersuchten EST-Loci deutlich höhere Anteile an Heterozygoten. Die hohe Anzahl an SSR-Alleltypen führt aber zu sehr hohen Diversitätsmaßen innerhalb der untersuchten Populationen, wogegen anhand der EST-Marker diese Werte nicht erreicht werden konnten.

Aus diesen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass eine alleinige Betrachtung der je nach Markersystem ermittelten Ergebnisse nicht zielführend ist und die Diskussion der populationsgenetischen Analyse auf mit allen verwendeten Methoden nachgewiesene Tendenzen konzentriert werden sollte. Bei dieser von den Einzelergebnissen abgehobenen Betrachtung wird deutlich, dass zwei wesentliche Schwerpunkte herausgearbeitet werden können: Es besteht zum einen eine **große genetische Variation innerhalb der untersuchten Populationen** und zum anderen ist mit allen verwendeten Markersystemen lediglich eine **geringe genetische Differenzierung zwischen den Populationen** nachzuweisen. Wie an der Hypothese der Substrukturierung der Grundgesamtheit glaubhaft gemacht werden konnte, ist darüber hinaus die **Gruppenbildung** von Populationen innerhalb bzw. außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte nur **schwach ausgeprägt**. Lediglich anhand der ISSR-Daten kann eine Substrukturierung angenommen werden. Wenngleich anhand der Genflussschätzungen aller Verfahren gezeigt werden kann, dass die Genflussraten innerhalb der vermeintlich „natürlichen" Populationen höher sind, so ist dies nicht als ausreichender Hinweis für eine Substrukturierung zu werten. Schließlich konnte anhand aller eingesetzten Markersysteme deutlich gemacht werden, dass die **Variation der untersuchten Fichten auf die Variation innerhalb der Population zurückzuführen** ist.

Aus diesem Grund sollen in der Folge im Wesentlichen drei Aspekte diskutiert werden:

- Zwischen den untersuchten Populationen bestehen lediglich geringe Differenzierungen.
- Die untersuchten Populationen zeichnen sich durch eine hohe Variabilität aus.
- Die Variation der Spezies ist durch die Variation innerhalb ihrer Populationen begründet.

6.3.1 Genetische Differenzierung zwischen Populationen

Theoretisch betrachtet sind genetische Unterschiede zwischen Waldbaum-Populationen die Folge der genetischen Differenzierung einer Art, die ihrerseits auf Mutation, Selektion, Migration (oder Genfluss) und genetische Drift basiert (BERGMANN 1982). Welcher dieser Prozesse von größerer oder geringerer Bedeutung für die heute existierende genetische Differenzierung einer Waldbaumart war, hängt vornehmlich von deren **Verbreitungsgeschichte** ab, wobei in Nord-, Ost- und Mitteleuropa die **nacheiszeitliche Einwanderungsgeschichte** maßgebend war. Besitzt eine Waldbaumart ein sehr großes, heterogenes und durch geographische Barrieren unterteiltes Verbreitungsgebiet, so muss mit großen genetischen Unterschieden zwischen einzelnen Populationen gerechnet werden. Kommt dagegen eine Baumart nur in einem relativ kleinen, homogenen und zusammenhängenden Gebiet vor, so sollte auch das genetische Variationsmuster dieser Art wenig ausgeprägt sein (BERGMANN 1982). *Picea abies* gilt mit ihren drei ökologisch sehr unterschiedlichen Arealen (Skandinavien, Russland und Mitteleuropa) als klassischer Vertreter der ersten Gruppe, weswegen nach BERGMANN (1982) anzunehmen ist, dass große genetische Unterschiede zwischen lokalen Populationen der

Fichte existieren und Differenzierungen zwischen ihnen nachweisbar sind. Dies ist nach KLEINSCHMIT (1995) wesentlich durch die Größe der jeweiligen eiszeitlichen Refugien, die Wiedereinwanderungswege und die unterschiedlichen Größen der Gründerpopulationen begründet. Dementsprechend wurden im internationalen Vergleich anhand isoenzymatischer Untersuchungen von BERGMANN (1975, 1978) bzw. von PAULE et al. (1990) Differenzierungen der Teilareale sowie geographische Muster nachgewiesen, die durch die nacheiszeitliche Wanderung und Verteilung erklärt werden konnten. BERGMANN (1974) konnte in diesem Zusammenhang auch zeigen, dass anhand der untersuchten Genhäufigkeitsverteilungen stärkere Differenzierungen zwischen dem skandinavischen und dem deutschen Verbreitungsgebiet nachzuweisen waren als zwischen den untersuchten Populationen innerhalb der beiden Gebiete (vgl. auch BERGMANN 1975, 1978, TIGERSTEDT 1974, PAULE et al. 1990). Ebenso ergaben Untersuchungen von GONCHARENKO et al. (1995), dass die genetischen Variationen in Beständen der baltischen Staaten, Weißrusslands und Russlands signifikant größer waren als die von zentraleuropäischen Beständen (vgl. auch KRUTOVSKII & BERGMANN 1993). Diese Ergebnisse werden im übrigen auch durch morphologische Studien bestätigt, mit denen, wie die Auswertung des IUFRO-Fichtenprovenienzversuches 1964/68 ergab, die Differenzierung zentraleuropäischer Bestände sowohl anhand morphologischer als auch phänologischer Merkmale als gering zu bezeichnen ist (vgl. LAGERCRANTZ & RYMAN 1990, FINKELDEY 1992). LAGERCRANTZ & RYMAN (1990) nehmen in diesem Zusammenhang an, dass die Fichte in Zentraleuropa ihre Diversität während der letzten Eiszeit eingebüßt hat und deswegen nur vergleichsweise geringe Differenzierungen aufzeigt. Dieser Effekt könnte dann als mögliche Erklärung für die fehlende genetische Differenzierung der Populationen herangezogen werden, wenn die untersuchten Populationen nicht durch eine hohe genetische Variabilität charakterisiert wären (vgl. Kap. 6.3.2).

Dementsprechend sind die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der Ähnlichkeit der Populationen sowie ihrer genetischen Distanzen und Differenzierungen u.a. auch durch die nacheiszeitliche Entwicklungsgeschichte der Fichte erklärbar. Ungeachtet der Tatsache, dass davon auszugehen ist, dass es sich bei der Population des Bayerischen Waldes um eine mit fremdem Saatgut ergänzte Population handelt, können die geringen Distanzmaße zwischen den „natürlichen“ Populationen (Berchtesgaden, Bayerischer Wald und Harz) dadurch begründet sein, dass sie auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind. Dies bedeutet zum einen, dass ihre Vorfahren aus demselben eiszeitlichen Refugium stammen bzw. die jeweiligen eiszeitlichen Refugien wahrscheinlich ebenfalls genetisch nicht stark differenziert waren. Unter Berücksichtigung einer gemeinsamen nacheiszeitlichen Rückwanderungsgeschichte könnte die Zeitspanne für eine stärkere genetische Differenzierung der Populationen nicht ausreichend gewesen sein. Während für die Alpenpopulationen angenommen wird, dass sie die Eiszeit in den Tälern der Ostalpen überdauerten, wird für die Fichten des Bayerischen Waldes und des Harzes vermutet, dass sie – zumindest teilweise – auf das jugoslawische Refugium zurückzuführen sind und auch eine gemeinsame Rückwanderungsgeschichte besitzen (vgl. RUOFF 1932, FIRBAS 1949, SCHMIDT-VOGT 1976, HUNTLEY & BIRKS 1983). Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden populationsgenetischen Analysen mit anderen Arbeiten zu *Picea abies*, so wird deutlich, dass – unabhängig von der eingesetzten Methode – zum

einen allgemein bei Koniferen (BERGMANN 1974, GULLBERG et al. 1985, MERKLE & ADAMS 1987, ROTHE 1988, LI & ADAMS 1989, KONNERT & FRANKE 1991) und zum anderen auch speziell bei der Fichte in Mitteleuropa nur selten Differenzierungen nachzuweisen waren.

Unter alleiniger Berücksichtigung Deutschlands, das einen vergleichsweise kleinen Ausschnitt des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte darstellt, sind die Ergebnisse hinsichtlich der geringen Differenzierung der Populationen insofern nicht überraschend. Andererseits wäre aufgrund der **klimatischen und standortkundlichen Unterschiede zwischen den Untersuchungsgebieten** von lokal verschiedenartig wirkendem Selektionsdruck auszugehen (vgl. LUNDKVIST & RUDIN 1977, BERGMANN 1978, HAMRICK 1979, ROTHE 1988). Dieser führt zwangsläufig zu Anpassungsprozessen an lokale Standortverhältnisse und somit zu einer genetischen Differenzierung gegenüber anderen Populationen (vgl. BERGMANN 1978, MITTON et al. 1989, KONNERT & FRANKE 1991), was von SCHMIDT-VOGT (1976) auch als mögliche Ursache für die heutige Vielfalt an Fichten-Ökotypen angeführt wird. Hinsichtlich der aus Saat- und Pflanzgut entstandenen „künstlichen“ Bestände ist nach SCHMIDT-VOGT (1976) zwar davon auszugehen, dass wegen der kurzen Anbauperiode eine Anpassung an die natürliche Selektion bisher unwahrscheinlich ist, aber MITTON et al. (1989) konnten nachweisen, dass sich – bedingt durch kleinräumige Unterschiede in den Standortverhältnissen – im Laufe der Entwicklung einer einzigen Bestandesgeneration bereits Standortrassen herausbilden können (vgl. KONNERT & FRANKE 1991).

Bezogen auf die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung analysierten Populationen, deren Standorte innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte liegen, vermutlich teilweise autochthonen Ursprungs sind und deshalb als „natürliche“ Populationen bezeichnet wurden, bedeutet dies, dass aufgrund der standörtlichen Gegebenheiten gerade hier eine Differenzierung angenommen werden müsste. Insbesondere für die autochthonen Harzfichten sowie die vergleichsweise isolierte Population von Berchtesgaden ist von einem wesentlichen Einfluss der natürlichen Selektion auszugehen. Gerade die Kombination von Isolation und natürlicher Selektion durch Standortbedingungen wird häufig als Ursache von genetischer Drift genannt (vgl. BERGMANN 1974, STUTZ 1990b). Insbesondere bei der Population von Berchtesgaden handelt es sich um eine an der Verbreitungsgrenze der Art befindliche Population mit vergleichsweise isolierter Lage im Talschluss des Wimbachtales. Aufgrund der umgebenden Gebirgszüge ist ein Genaustausch mit Fichtenbeständen der Nachbartäler vermutlich ausgeschlossen bzw. nur sehr eingeschränkt – eventuell durch Samenverbreitung durch Vögel – möglich. Nach Angaben von TIGERSTEDT (1973) ist unter solchen Bedingungen die Gefahr der Selbstbefruchtung erhöht und eine geringere Fitness der Population anzunehmen (vgl. MÜLLER-STARCK 1994). Geringere Fitness äußert sich in diesem Zusammenhang durch einen eingeschränkten Genpool bzw. kann durch den Zwang zur Selbstbefruchtung in Inzuchtdepression gipfeln (vgl. LEIBENGUTH & SHOGHI 1998). Unter diesen Umständen wäre in der Berchtesgadener Population eine geringere genetische Diversität bzw. eine geringere Heterozygotie zu erwarten. Wenn auch das Problem der verringerten genetischen Diversität infolge von Inzucht erst in Kap. 6.3.2 diskutiert werden soll, bleibt festzuhalten, dass die

Standortbedingungen der Berchtesgadener Population ausreichend sein müssten um diese Individuen von den übrigen genetisch zu differenzieren. Dies betrifft insbesondere den Vergleich mit der autochthonen Population des Harzes, der eine dem natürlichen Verbreitungsgebiet nördlich vorgelagerte Exklave darstellt. Die Rückwanderung der Fichte nach der letzten Eiszeit in das Harzmassiv erfolgte vermutlich über den Bayerischen Wald und das Fichtelgebirge (FIRBAS 1949, SCHMIDT-VOGT 1977, HUNTLEY & BIRKS 1983). Da es sich hierbei zumindest bis zu den ersten großflächigen Fichten-Aufforstungen Mitte des 19. Jahrhunderts um eine extreme Randlage gehandelt hat, wäre davon auszugehen, dass sich die Harzpopulation von den übrigen Populationen – insbesondere von der Population von Berchtesgaden – differenzieren lässt. In beiden Fällen wäre aufgrund der vergleichsweise isolierten Lage der Populationen über mehrere Generationen eine standortangepasste Selektion zu vermuten, die sich nach ROTHE (1988) im Vorkommen unterschiedlicher und deswegen differenzierender Genhäufigkeiten äußern kann. Anhand der in den Kap. 5.2 bzw. 5.3 präsentierten Ergebnissen ist aber weder von einer eindeutigen Differenzierung der Berchtesgadener Population noch von den autochthonen Harzfichten auszugehen. Wenn auch anhand der RAPD-Analyse für die Berchtesgadener Population geringere BSR und leicht erhöhte genetische Distanzen gegenüber den übrigen Populationen errechnet wurden und die HKA-Komponentenmatrix der Rohdaten diese Population separiert, so kann der Verdacht auf Differenzierung durch die anderen Markersysteme nicht belegt werden. Hier werden die Berchtesgadener Individuen entweder der Gruppe der „natürlichen“ Populationen zugeordnet (ISSR), oder es sind überhaupt keine Substrukturierungen nachweisbar (SSR, EST). Eine mögliche Differenzierung der autochthonen Harzfichten ist aufgrund der geringen Stichprobengröße sowieso kritisch zu betrachten. Allerdings lassen die auch unter Berücksichtigung dieser Harzfichten geringen Distanzmaße zwischen allen untersuchten Populationen (RAPD) sowie zwischen den „natürlichen“ Populationen (ISSR) keine Differenzierungen erkennen. Wie bereits erwähnt, wäre aufgrund der geographischen Randlage des Bestandes von Belau ebenfalls eine genetische Differenzierung zu erwarten gewesen. Auch wenn es sich hier um einen noch vergleichsweise jungen Bestand künstlichen Ursprungs handelt, der aufgrund fehlender Geschichte keine Anpassungsprozesse durchlaufen haben kann, so handelt es sich vermutlich doch um Saat- oder Pflanzgut der norddeutschen Tiefebene (Herkunftsgebiet Nordwestdeutsches Tiefland 840 01, BML 1994). Die auf die Mutterbäume einwirkenden andersartigen Standortfaktoren scheinen noch keinen für die Differenzierung der betrachteten Populationen ausreichenden Einfluss ausgeübt zu haben (vgl. MITTON et al. 1989). Deutlich wird dies insbesondere bei der Betrachtung des *isolation-by-distance*-Modells. Grundlage dieses Modells ist, dass mit zunehmender geographischer Entfernung die Wahrscheinlichkeit des Genaustauschs sinkt und deshalb die Maße der genetischen Distanz ansteigen. Aber auch hier sind – insbesondere wegen der generell sehr niedrigen Distanzmaße – keine signifikanten Korrelationen nachweisbar.

Da im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht nur natürliche sondern auch forstlich begründete Bestände analysiert wurden, soll in einem zusätzlichen Schritt der **Einfluss des Forstes auf die genetische Struktur und Differenzierung der Bestände** kurz diskutiert werden. Bei den im Rahmen

dieser Untersuchung analysierten Beständen von Hunsrück, Solling, Warndt und Belau handelt es sich um durch Ausbringung forstlichen Saatgutes begründete „künstliche“ Bestände außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes. Diese bestehen aus Material von z.T. unbekannter Herkunft, sind vermutlich aber auf forstliche Samenklengen zurückführbar (vgl. BONNER 1990). Die Klengung der Samen führt – wie dargestellt – zu einer Vermischung von aus mehreren Beständen stammendem Material, weswegen hinsichtlich der genetischen Zusammensetzung der Bestände von einer Mischprobe aus Ansaaten einer Region bzw. eines Herkunftsgebietes auszugehen ist. Die Vermischung von Saatgut bewirkt in diesem Zusammenhang eine „Vereinheitlichung“ des ausgebrachten Materials und äußert sich im paarweisen Vergleich von Individuen und/oder Populationen in einer Nivellierung von differenzierenden Eigenschaften (vgl. auch SCHMIDT-VOGT 1976, ROTHE 1990, STUTZ 1990b). Diese Annahme wird durch die in vorliegender Untersuchung ermittelten Daten zur genetischen Ähnlichkeit der Populationen von Hunsrück, Solling, Warndt und Belau belegt. Unabhängig von der verwendeten molekulargenetischen Methode wurden zwischen den genannten Beständen hohe genetische Ähnlichkeiten und vergleichsweise geringe genetische Distanzen nachgewiesen (Maximalwerte der genetischen Distanzen (nach NEI 1972): Ds_{RAPD} = 0,101, Ds_{ISSR} = 0,156, Ds_{SSR} = 0,239 bzw. Ds_{EST} = 0,004). Wenn auch der Einfluss forstwirtschaftlicher Maßnahmen auf den Genpool von Beständen in der Theorie hinreichend diskutiert ist (vgl. MUONA 1989, ZIEHE & MÜLLER-STARCK 1991, RUETZ 1992, GEBUREK & THURNER 1993, ROZENBERG & CAHALAN 1997), so existieren doch nur wenige Untersuchungen zur genetischen Differenzierung künstlich begründeter Bestände. In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchungen von PAULE et al. (1990) in der Slowakei sowie von LEIBENGUTH & SHOGHI (1998) in Südwestdeutschland verwiesen, die ebenfalls nur sehr geringe Differenzierungen zwischen künstlich angelegten Beständen aus nicht-indigenem Samenmaterial ermitteln konnten. In der ähnlich gelagerten Studie von FINKELDEY (1992) werden auf Basis von Isoenzymmustern ebenfalls trotz großer morphologischer, physiologischer und phänologischer Variabilität von Fichtenpopulationen aus dem Sauerland hohe genetischen Ähnlichkeiten zwischen den Beständen nachgewiesen. Das Phänomen fehlender genetischer Differenzierung wird letztlich auf den gemeinsamen, forstlichen Ursprung der Bestände zum Zeitpunkt ihrer Begründung zurückgeführt (vgl. FINKELDEY 1992). Lediglich in der Isoenzym-Studie von KONNERT & FRANKE (1991) konnten an Fichtenforsten des Schwarzwaldes größere Differenzierungen nachgewiesen werden (vgl. auch FRANKE & KONNERT 1990).

In diesem Zusammenhang erscheint folgender Aspekt erwähnenswert: Während in natürlichen Populationen standortabhängig angepasste Genotypen über den Jungwuchs bei der Selektion bevorteilt und weitervererbt werden, geschieht in forstlich ausgebrachten Beständen keine selektive Anpassung. Aus diesem Grund wurde die **(„Gruppen“-)Hypothese** aufgestellt, dass sich die Bestände innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution von den Beständen außerhalb des Verbreitungsgebietes unterscheiden müssten und deswegen von diesen differenziert werden können. Allerdings konnten mit den Markersystemen von RAPDs, SSRs und ESTs keine nennenswerten Differenzierungen nachgewiesen werden. Lediglich anhand der ISSR-Analyse erscheint eine Differenzierung der beiden angenommenen Gruppen

glaubhaft. In der Summe aller Ergebnisse muss aber davon ausgegangen werden, dass durch die ausgewählten Primer eher zufällig Loci abgebildet wurden, die Differenzierungen vermuten lassen. Da dieses Ergebnis nicht durch die anderen Markersysteme glaubhaft belegt werden kann, sollte es auch nicht überbewertet werden. Es bleibt vielmehr zu prüfen, ob durch Berücksichtigung zusätzlicher künstlicher Bestände sowie natürlicher Populationen anhand der ISSR-Marker diese Hypothese aufrecht erhalten werden kann. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass GÖMÖRY (1992) anhand isoenzymatischer Analysen mit slowakischen Fichtenpopulationen forstliche und natürliche Beständen nicht unterscheiden konnte, wenngleich dies BORGHETTI et al. (1988) anhand des morphologischen Merkmals der Zapfenschuppenform an italienischen Herkünften gelang.

Wie anhand der bisherigen Ausführungen gezeigt werden konnte, haben die häufig diskutierten Ursachen für genetische Differenzierungen von Populationen – die Verbreitungsgeschichte und die lokalen Standortfaktoren – keinen wesentlichen Einfluss auf die untersuchten Populationen. Im Umkehrschluss ist davon auszugehen, dass es **Faktoren** gibt, **die einer weitergehenden genetischen Differenzierung der untersuchten Populationen entgegenwirken bzw. die die Ursache für die hohe genetische Ähnlichkeit der Populationen** darstellen.

Unter Berücksichtigung der großen ökologischen Valenz der Art muss davon ausgegangen werden, dass in diesem Zusammenhang gerade die **ökologischen Eigenschaften der Fichte** maßgeblich für die geringe genetische Differenzierung der untersuchten Populationen verantwortlich gemacht werden können. GIANNINI et al. (1991a, 1991b) bezeichnen die geringen genetischen Unterschiede zwischen Populationen als generell für Koniferen typisch und führen als mögliche Ursachen die Bestandesdichte, die Größe der Bestände, die weiträumige Pollen- und Samen-Verteilung, die Auskreuzungsrate und die hohe Fekundität an. Die Fichte ist heute sowohl innerhalb als auch außerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebietes annähernd flächendeckend vorhanden, was den Genaustausch einzelner Populationen, unabhängig von ihrem Natürlichkeitsgrad bzw. ihrer Autochthonie, ermöglicht. Neben möglicher zoochorer Samenverbreitung (z.B. *Nucifraga caryocatatctes*, *Loxia curvirostra*) spielt die Windverbreitung der Pollen und der Bestäubungstyp eine entscheidende Rolle: Es werden sehr viele Pollen und Samen produziert und die mit einem durchschnittlichen Pollenkorngewicht von 72,8 x 10^{-3} g (nach ROHMEDER 1972) sehr leichten Pollen werden nach Angaben von MÜLLER (1976) mit durchschnittlich ca. 261 m Reichweite sehr weit transportiert. Die Kombination dieser Faktoren führt zu einer hohen Auskreuzungsrate und macht einen hohen Genaustausch zwischen Populationen wahrscheinlich. Wie darüber hinaus anhand der in Kap. 6.3.2 diskutierten Diversitätswerte gezeigt werden konnte, spielt Inzucht, die eine Differenzierung von Populationen nach sich zieht, keine nennenswerte Rolle. Dies kann insbesondere anhand der für die Berchtesgadener Population ermittelten Ähnlichkeitsmaße glaubhaft gemacht werden. Diese Faktoren berücksichtigend, muss davon ausgegangen werden, dass in zentraler Lage des sowohl natürlichen, als auch künstlichen Verbreitungsgebietes der Fichte nicht von einer genetischen Differenzierung ausgegangen werden kann. Bisher nachgewiesene genetische Differenzierungen beziehen sich zum einen nur auf natürliche Populationen und zum anderen beschränken sie sich auf

internationale, großräumige Vergleiche von Fichtenpopulationen und beinhalten meist die Betrachtung marginaler Populationen. Im Verhältnis zu dem großen Verbreitungsgebiet der Fichte stellen die vergleichsweise zentral gelegenen Untersuchungsgebiete der vorliegenden Arbeit keine „marginalen" Standorte dar, an denen genetische Drift wesentlich zur Differenzierung der Populationen beigetragen haben könnte.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Hypothese überprüft, ob die geographische Distanz von Populationen einen Einfluss auf die paarweise ermittelte genetische Distanz hat (***isolation by distance*-Modell**). Mit keinem der vier verwendeten Markersysteme konnte ein Einfluss nachgewiesen werden. Auch bei dieser Fragestellung wird das Ergebnis durch vergleichbare Untersuchungen an deutschen und osteuropäischen Fichtenpopulationen bestätigt. Sowohl BERGMANN (1974, 1990) als auch KONNERT & FRANKE (1991) geben für ihre Untersuchungen an, dass innerhalb der deutschen Gebiete die räumliche Entfernung keinen Einfluss auf den genetischen Abstand von Populationen hat. Ebenso konnten PAULE et al. (1990) keine signifikante Beziehung zwischen geographischer Lage der slowakischen Populationen und der genetischen Distanz zwischen ihnen ermitteln. Eine Ausnahme zum *isolation by distance*-Modell mit Fichten bildet die Untersuchung von GIANNINI et al. (1991a), denen es bei vergleichsweise kleinen und lange isolierten Populationen gelang signifikante Korrelationen von genetischer Distanz und räumlicher Distanz nachzuweisen. Letzten Endes ist die Korrelation aber auf die relative Isolierung der mittelitalienischen Campolino-Population gegenüber den Alpenbeständen zurückzuführen. LUNDKVIST (1979) geht in diesem Zusammenhang darüber hinaus davon aus, dass vermutlich erst in großräumlicher Betrachtung ein Einfluss nachzuweisen sei. Er gibt an, dass die klinale Variation bei Isoenzymen für sich genommen kein Beweis für *isolation by distance* darstellt. Dies erfordere zwingend den Nachweis von Subpopulationen, was aber anhand der in vorliegender Untersuchung ermittelten Daten nicht gegeben ist. Gleichzeitig weist er aber auch darauf hin, dass je nach verwendeter Loci-Kombination der Nachweis eines klinalen Charakters unter Einbezug der Meereshöhe möglich sei. STUTZ (1990b) spricht in diesem Zusammenhang bei der Analyse alpiner Fichtenvorkommen ebenfalls von einer **Höhenabhängigkeit der genetischen Variation** (vgl. auch BERGMANN 1978). Insbesondere die Isoenzym-Loci 6-PGDH-B und -C, SKDH-A und G-6-PDH-A zeigten in den bereits erwähnten Schwarzwald-Populationen in Bezug zur geographischen Entfernung eine weitaus höhere genetische Divergenz, was als Höhenabhängigkeit der genetischen Variation interpretiert wurde (KONNERT & FRANKE 1991).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass anhand der ermittelten Ähnlichkeits- und Distanzmaße und den Ergebnissen anderer bisher vorliegender Studien zur genetischen Differenzierung der Fichte von einer lediglich geringen genetischen Differenzierung von Fichtenpopulationen in Mitteleuropa bzw. in Deutschland auszugehen ist. Es muss angenommen werden, dass die Unterschiede in den Standortfaktoren – in Kombination mit der Entwicklungsgeschichte der Bestände – nicht ausreichend sind, um genetische Differenzierungen zwischen den Populationen hervorzurufen. Sowohl aus Isoenzym-Analysen

aus Deutschland (BERGMANN 1974, KONNERT & FRANKE 1991) als auch aus Studien aus Italien (GIANNINI et al. 1991a), Litauen (GONCHARENKO et al. 1995), Polen (LEWANDOWSKI et al. 1997) sowie der Slowakei (GÖMÖRY 1992) wird deutlich, dass die genetischen Differenzierungen zwischen mitteleuropäischen Fichtenpopulationen gering sind und damit im Kontrast zu skandinavischen bzw. großflächiger organisierten internationalen Studien stehen (LUNDKVIST & RUDIN 1977). Unter Berücksichtigung fehlender Differenzierung in mitteleuropäischen Populationen erscheint die Annahme von GIANNINI et al. (1991a), dass seit der letzten Eiszeit nicht genügend Zeit für eine signifikante Selektion und/oder genetische Drift zwischen den Populationen vergangen ist, glaubhaft (vgl. auch GULBERG et al. 1985). Ebenso geht auch STUTZ (1990b) davon aus, dass seit einer möglichen Trennung der jeweiligen Genpools die Zeit zu kurz war um Anpassungseffekte nachweisen zu können, die eine genetische Differenzierung von Populationen nach sich ziehen würden. In Kombination mit den ökologischen Eigenschaften der Fichte sind in solchen räumlichen und zeitlichen Maßstäben genetische Differenzierungen nicht anzunehmen.

Diese Aspekte zusammenfassend, bleibt abschließend zu bemerken, dass hinsichtlich der nicht nachweisbaren genetischen Differenzierung der untersuchten Bestände davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei den untersuchten Populationen um einen Genpool handelt. Das im Rahmen der Umweltbeobachtung geforderte und eingangs definierte **Kriterium der genetischen Einheitlichkeit bzw. Vergleichbarkeit von Umweltproben wird somit von diesen Populationen erfüllt**. Eine Vergleichbarkeit der Proben und der aus ihnen gewonnenen stoffanalytischen Daten erscheint aus genetischer Sicht statthaft.

6.3.2 Genetische Variabilität innerhalb der Population

Genetische Variation zwischen Individuen bzw. genetische Variabilität von Populationen kann viele Ursachen haben. **Variation auslösende Faktoren** sind neben der gewöhnlichen **Rekombination** der Allele, **genetische Drift**, **Genfluss** sowie **Selektion** aufgrund lokal unterschiedlicher Standortfaktoren, aber auch **Mutationen**. Als Mutation wird das Auftreten von vererbbaren Veränderungen der Basensequenz eines bestimmten Genabschnitts bezeichnet (HATTEMER et al. 1993). Wirkt sich diese Basensequenzveränderung phänotypisch aus, wird diese neue Eigenschaft durch Selektion auf ihre Eignung getestet. Mutation und Selektion sind die wesentlichen Faktoren der Evolution. Die genetische Variabilität von Populationen stellt in diesem Zusammenhang das Ergebnis der Selektion dar und ist eine wesentliche Voraussetzung des Anpassungspotenzials und der Überlebensfähigkeit von Baumpopulationen an einem Standort (GREGORIUS & ROBERDS 1986). Aus diesen Gründen gilt die genetische Variabilität hinsichtlich der genetischen Charakterisierung von Waldbaumpopulationen als das bedeutendste populationsgenetische Maß (vgl. BERGMANN 1971, STARKE 1993).

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass **mit allen verwendeten Markersystemen hohe genetische Variabilitäten in den Populationen nachgewiesen** werden.

Mittels RAPD- und ISSR-Analyse wurden hohe bis sehr hohe Variationen in den untersuchten Populationen ermittelt. Während die Anzahl polymorpher Marker (96% bzw. 92%) lediglich andeuteten, dass von hohen Variationen innerhalb der Bestände auszugehen ist, konnte anhand der Messungen der genetischen Diversität gezeigt werden, dass es sich insbesondere bei den Populationen von Berchtesgaden, Bayerischem Wald, Solling und Warndt um hoch diverse Populationen handelt. Diese Ergebnisse wurden durch die codominanten Markersysteme (SSR und EST) bestätigt, wobei mit diesen Verfahren darüber hinaus zusätzliche Informationen gewonnen werden konnten: Mittels SSR-Analyse wurden an drei Genorten 34 Alleltypen differenziert, was als weiterer sicherer Hinweis für eine extrem hohe Variation gewertet werden kann. Im Gegensatz dazu wurden anhand der EST-Marker zwar nur neun Alleltypen nachgewiesen, diese zeichnen sich aber mit 58,1% bis 87,1% durch einen sehr hohen Heterozygotiegrad aus. Heterozygotie wird in diesem Zusammenhang häufig als Variabilitätsmaß diskutiert, da heterozygote Individuen als besser an unterschiedliche Umweltbedingungen angepasst gelten und eine Beziehung zwischen Heterozygotie und Fitness bzw. der Überlebenswahrscheinlichkeit von Populationen hergestellt wird (vgl. GREGORIUS & ROBERDS 1986, BERGMANN & SCHOLZ 1987, BERGMANN 1991, HANHART-ROSCH & KLEINSCHMIT 1991, GÖMÖRY 1992, MÜLLER-STARCK 1994, PRUS-GLOWACKI & GODZIK 1995, IPSEN et al. 1998, HANSSON & WESTERBERG 2002). Abweichungen vom erwarteten Heterozygotiegrad können verschiedene Ursachen haben. Ein Heterozygoten-Überschuss kann ein Hinweis auf überdominante Selektion oder Auskreuzen sein (vgl. MITTON 1993). Besonders in ökologisch wenig stabilen Lebensräumen bedeutet eine hohe Heterozygotie eine bessere Anpassungsfähigkeit von Populationen an sich ändernde Selektionsbedingungen (FRANKEL et al. 1995). In diesem Zusammenhang erscheint es bedeutsam hinsichtlich der Probenbaumauswahl noch einen weiteren Aspekt anzusprechen: Um die Beprobung von Familienverbänden ausschließen zu können, wurden ausnahmslos Bäume der sozialen Stellung vorherrschend, mitherrschend oder herrschend (Kraft'sche Klassen 0-2, KRAFT 1884) ausgewählt. Aus den Ausführungen zur Bedeutung der Heterozygotie leitet sich die Theorie ab, dass heterozygotere Individuen im Allgemeinen konkurrenzkräftiger, vitaler und leistungsfähiger sind als homozygotere (vgl. STUTZ 1990b, HANSSON & WESTERBERG 2002). Nach Ergebnissen von STUTZ (1990b) beprobt man bei einer Probenahme gemäß der Richtlinie nach WAGNER et al. (1993), die sich auf die Beprobung mitherrschender Bäumen beschränkt, vornehmlich heterozygotere Bäume, wodurch unter Umständen überhöhte Variabilitäten ermittelt werden könnten (vgl. auch HUI LIU et al. 1997). Aber auch unter Berücksichtigung der Annahme der überdurchschnittlichen Berücksichtigung heterozygoter Bäume kann – entgegen der Erwartung aus den Ergebnissen zur genetischen Differenzierung – abschließend festgehalten werden, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei **allen untersuchten Beständen** um **genetisch sehr variable Populationen** handelt.

Mit dieser Feststellung werden theoretische Überlegungen sowie praktische Ergebnisse anderer Studien an Waldbaumpopulationen bestätigt. Nach HAMRICK (1979), HAMRICK et al. (1981, 1992), CLEGG (1989) und EL-KASSABY (1991) weisen **Koniferen besonders hohe genetische Variation** auf und sind durch **hohe Diversitätswerte** gekennzeichnet (vgl. auch STUTZ 1990b, SCHEEPERS et al. 1997a, 1997b). SCHMIDT-VOGT (1977) vermutet in diesem Zusammenhang, dass aufgrund der Vielzahl

an anerkannten geographischen Rassen oder systematischen Varietäten innerhalb der Gattung *Picea* auch von einer hohen Variation innerhalb von *Picea abies* auszugehen sei. Belegt werden diese Äußerungen insbesondere durch isoenzymatische Analysen der 1990er Jahre. In den bereits erwähnten Studien von FRANKE & KONNERT (1990) bzw. KONNERT & FRANKE (1991) mit Fichten des Schwarzwaldes wurde mittels Isoenzymanalyse an allen untersuchten Beständen eine hohe genetische Vielfalt auf Populationsebene diagnostiziert. Die höchsten Diversitätswerte wurden hierbei für die Populationen errechnet, die als an den Standort sehr gut angepasst eingeschätzt wurden (vgl. KONNERT & FRANKE 1990). ROTHE (1988) weist in diesem Zusammenhang darauf hin, dass deutsche Fichtenpopulationen sogar durch höhere Variationen gekennzeichnet sind, als beispielsweise die von LUNDKVIST & RUDIN (1977) untersuchten schwedischen Bestände. Er führt dies darauf zurück, dass die deutschen Bestände aus verschiedenen forstlichen Herkünften ausgekreuzt seien und deshalb variableren Ursprungs sind. Bei dem Phänomen hoher genetischer Variabilität von Fichtenpopulationen handelt es sich aber nicht um ein rein mitteleuropäisches Phänomen (vgl. TULSIERAM et al. 1992). Wenn PAULE et al. (1990) und GÖMÖRY (1992) auch nur geringe genetische Differenzierungen zwischen slowakischen Fichtenpopulationen nachweisen konnten, so waren doch alle untersuchten Populationen sowohl durch eine hohe genetische Diversität als auch durch hohe Heterozygotiegrade gekennzeichnet. Von GÖMÖRY (1992) wird zudem darauf hingewiesen, dass die gemessene genetische Variation in künstlichen Fichtenforsten generell etwas geringer ist als in natürlichen Beständen. Ähnliches berichten GONCHARENKO et al. (1995) aus Litauen, geben aber zusätzlich an, dass sich die ermittelten Variabilitätsmaße zwischen den Populationen nicht signifikant unterscheiden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach den **Ursachen dieser großen genetischen Variation in den untersuchten Fichtenpopulationen**. Es ist davon auszugehen, dass die **Entwicklungsgeschichte** der Fichte sowie ihre **ökologischen Eigenschaften**, die bei den Ausführungen in Kap. 6.3.1 bereits für die fehlende genetische Differenzierung verantwortlich gemacht wurden, auch in diesem Zusammenhang wesentliche Aspekte hinsichtlich der hohen Variabilitätsgrade von Populationen darstellen.

Gymnospermen entwickelten sich vor 350 Mio. Jahren aus farnartigen Pflanzen und die ersten mit den heutigen vergleichbaren Arten entstanden vor etwa 50 Mio. Jahren (BECK 1970). Dieser lange Entwicklungszeitraum hat im Fall der Koniferen zu einem vergleichsweise großen Genom und zu großen Chromosomen geführt. Letztere sind aufgrund der auskreuzenden Eigenschaft der Koniferen nach Angaben von TIGERSTEDT (1973) durch häufige Chiasmen gekennzeichnet und vergleichsweise divers. Aufgrund des **großen Genoms** existieren darüber hinaus zahlreiche VNTR-Regionen in nicht codierenden DNA-Bereichen, die als nicht-exprimierter Abschnitt auch nicht der Selektion unterliegen. Dadurch konnten in diesen DNA-Abschnitten zahlreiche Mutationen stattfinden, was anhand moderner molekulargenetischer Analysen als eine Vielzahl von Polymorphismen nachgewiesen werden kann und einen wesentlichen Beitrag zur Variation von Populationen darstellt. MÜLLER-STARCK (1994) diskutiert in diesem Zusammenhang die auffallend hohe genetische Variation von Baumpopulationen

im Vergleich zu anderen Pflanzen. Aus dem Vergleich in Tab. 100 ergibt sich eine klare Überlegenheit der Waldbaumarten hinsichtlich der in Individuen und Populationen repräsentierten genetischen Variation. Monokotyledonen weisen nur einen Bruchteil dieses Potenzials zur Erzeugung genotypischer Vielfalt auf. Die Relation beträgt nach Angaben von MÜLLER-STARCK (1994) 162000:1 zugunsten der Waldbäume. NEALE & WILLIAMS (1991) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass sog. *single copy*-Gene von Angiospermen gerade in Koniferen häufig in zahlreichen Kopien vorliegen und deuten dies als Nachweis der Duplizierung ganzer Genomabschnitte (vgl. auch PFEIFFER et al. 1997).

Tab. 100: Variabilitätsmaße europäischer Nadel- und Laubwaldarten bzw. von Mono- und Dikotyledonen im Vergleich (nach MITTON 1983 und MÜLLER-STARCK 1994)

	Anzahl Arten	Mittl. Hetero-zygotiegrad	Allelzahl pro Genlocus
Europäische Nadelbaumarten	10	25,1%	2,2
Europäische Laubbaumarten	6	23,0%	2,7
Monokotyledonen	28	16,5%	1,7
Dikotyledonen	741	11,3%	1,4

Neben der Genomgröße werden aber auch die **Lebensdauer** und die **Generationszeit** der Bäume als Ursache für genetische Variation diskutiert (vgl. MITTON 1983). Aufgrund der Tatsache, dass die Erst-Fruktifikation der Fichte erst mit einem Alter von ca. 25-30 Jahren eintritt und sie einen vergleichsweise langen und unregelmäßigen Fruktifikationsrhythmus aufweist, ist ihr keine Gelegenheit zur schnellen Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen gegeben. Das bedeutet, ein Bestand muss, um überlebensfähig zu bleiben und um auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren zu können, notwendigerweise einen gewissen Grad an Variation aufweisen – er muss aus sich genetisch unterscheidenden Individuen aufgebaut sein. Darüber hinaus werden **Bestäubungstyp** und **Fekundität** ebenfalls als wichtige Komponenten für die Ausbildung großer Variation diskutiert. Die Kombination von einer großen Pollen- bzw. Samenzahl mit der einfachen und weitreichenden Samenverbreitung über Wind führt zu einer großen Streuung des Erbgutes und stellt eine wesentliche Grundlage für die genetische Variabilität einer Population dar (vgl. ROHMEDER 1972, MÜLLER 1976). Als weiterer Faktor ist in diesem Zusammenhang sicherlich die **weite Verbreitung** zu nennen. Ein großes Artareal ist zwangsläufig durch zahlreiche unterschiedliche Standortfaktoren gekennzeichnet, die über die Selektion Einfluss auf einen Bestand ausüben. Insbesondere in Randlagen (horizontal und vertikal) des Verbreitungsgebietes wirkt genetische Drift, evtl. auch Inzucht, auf die Populationen ein, was sich in der Gesamtbetrachtung des Genpools der Fichte in einer großen Diversität bzw. Variabilität äußert.

Nachdem die möglichen Ursachen genetischer Diversität diskutiert wurden, soll am Rande noch auf einige **Faktoren** eingegangen werden, **die der Ausbildung genetischer Vielfalt entgegenwirken**. Unter Betrachtung von Teilpopulationen wird insbesondere die räumliche und zeitliche **Isolation** oder auch lediglich eine marginale Lage einer Population als Ursache für fehlende Variabilität angeführt, da in solchen Fällen ein Genaustausch vermindert ist (vgl. BOSCHERINI et al. 1993). Insbesondere in kleinen, ausgedünnten Populationen führt der unter diesen Umständen wirkende Zwang zur Selbstbefruchtung zu **Inzuchtverhältnissen**. Inzucht bedeutet, dass zwei Individuen sich kreuzen, die näher miteinander verwandt sind als zwei zufällig ausgewählte Individuen der Population (HEDRICK 1999, vgl. auch CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1987). Dies führt im Vergleich zur Zufallspaarung zu einem erhöhten Anteil Homozygoter, was mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von Allelverlust gleichgesetzt wird und zu einer Verringerung der Diversität und der Fitness der Population (Inzuchtdepression) führt (vgl. ZIEHE & HATTEMER 1987). ANDERSSON et al. (1974) konnten in diesem Zusammenhang bei *Picea abies* nachweisen, dass die Volumenleistung der Nachkommen mit zunehmendem mittleren Inzuchtkoeffizienten kontinuierlich abnimmt, so dass unter Nachkommen aus Selbstbefruchtung sehr nachteilige Wirkungen zu erwarten sind. Abschließend bleibt zu bemerken, dass die Fichte mit geschätzten Selbstbefruchtungsraten von durchschnittlich 11,9% (MÜLLER 1977) der Gefahr der Inzuchtdepression als nicht stark ausgesetzt gilt, auch wenn sie nach den Laborexperimenten von SKOV (1999) als sensibel eingeschätzt wird. Anhand der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Daten zur Diversität und zur Heterozygotie der Bestände ist allerdings nicht von Inzuchtverhältnissen auszugehen. Dies betrifft insbesondere auch die räumlich isolierte Berchtesgadener Population sowie die autochthonen Harzfichten, wobei bei Letzteren wegen der geringeren Stichprobengröße vorsichtig diskutiert werden sollten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die ermittelten Ergebnisse deutlich zeigen, dass alle natürlichen und künstlichen Fichtenpopulationen eine große genetische Variation enthalten und dass die Einzelindividuen über sehr unterschiedliche Merkmalskombinationen verfügen. Aus Sicht der Populationsgenetik muss dies derart gedeutet werden, dass jede Population durch ihre Individuen ein sehr breites Merkmalsspektrum abdeckt und damit einen Anpassungsvorrat für sehr unterschiedliche Umweltkonstellationen bereithält (vgl. KLEINSCHMIT et al. 1981a). Aus diesem Grund sei abschließend auf die **Bedeutung genetischer Variation für die Überlebens-wahrscheinlichkeit von Populationen** hingewiesen. Die Fähigkeit von Populationen, genetische Variationen präsent zu haben und in den nachfolgenden Generationen erzeugen zu können (genetische Variabilität i.e.S.) wird in diesem Zusammenhang als Voraussetzung für genetische Reaktionen auf Umweltveränderungen angesehen (vgl. MÜLLER-STARCK 1994). Diese „Reaktion“ geschieht im Wesentlichen auf der Ebene der Population. Durch das Absterben unangepasster Individuen ändern sich die Häufigkeiten der in einer Population vertretenen genetischen Typen und somit der genetischen Struktur. Dieser Prozess ermöglicht es den Populationen, flexibel auf Umweltveränderungen zu reagieren. Dies funktioniert allerdings nur, solange die genetische Variation in einer Population so groß ist, dass immer wieder eine ausreichend große Zahl von Individuen überlebt. Insofern kann die genetische Variation als eine wesentliche Determinante der Fähigkeit von

Populationen zur **Anpassung** betrachtet werden (z.B. HATTEMER & ZIEHE 1987, GREGORIUS 1988, 1991, HAMRICK & GODT 1989, SCHOLZ et al. 1989, MÜLLER-STARCK 1995a). Gerade aus forstlicher Sicht sind auf fehlender Anpassung basierende Folgeschäden in Waldökosystemen wegen ihrer möglichen Irreversibilität von besonderer Bedeutung. Veränderungen des genetischen Pools, insbesondere durch den Verlust von Genen, können die Anpassungsfähigkeit von Waldbaumpopulationen an sich ändernde Umweltbedingungen erheblich mindern und die Widerstandsfähigkeit gegen pflanzliche und tierische Schädlinge reduzieren (vgl. SCHOLZ 1984). Die Bedeutung genetischer Variation berücksichtigend wurde in den letzten Jahren verstärkt am Erhalt der genetischen Variabilität von Forstarten gearbeitet und Konzepte zur Konservierung genetischer Ressourcen im deutschen Forst entwickelt (KLEINSCHMIT 1995, WOLF 1995, 1997, BEHM et al. 1997). Dies wird insbesondere vor dem Hintergrund bedeutsamer, dass die Toleranz und Anpassungsfähigkeit von Waldbaumpopulationen in Folge von zunehmend an Bedeutung gewinnenden anthropogenen Einflüssen gewahrt sein sollte (vgl. BERGMANN & SCHOLZ 1987, RADDI et al. 1994, PRUS-GLOWACKI & GODZIK 1995, BERGMANN & HOSIUS 1996a, IPSEN et al. 1998).

6.3.3 Genetische Variation der Art *Picea abies*

Eines der wesentlichen Merkmale von Arten und ihrer Populationen ist der Grad der Verschiedenheit einzelner Genotypen. Wie im vorhergehenden Kapitel deutlich gemacht werden konnte, ist sie von entscheidender Bedeutung für die Fähigkeit einer Waldbaumpopulation – und auch der Art – in heterogener Umwelt zu überleben und stets Individuen verschiedener Genotypen in einer solchen Häufigkeit bereitzuhalten, dass genügend viele, und vor allem angepasste Individuen zur Verfügung stehen (SVOLBA 1990). Insbesondere durch einen im Mittel sehr viel höheren Heterozygotiegrad als bei anderen Pflanzenarten (z.B. BERGMANN et al. 1990, MÜLLER-STARCK 1994) halten Waldbäume ein größeres Reaktionspotenzial bereit und reagieren in ihrer Gesamtheit auf langfristige Klimaänderungen nicht sehr sensibel, weil die Art in ihrer Gesamtheit über eine hohe Flexibilität verfügt (HANHART-ROSCH & KLEINSCHMIT 1991).

Wie im Rahmen der vorliegenden populationsgenetischen Analyse belegt werden konnte, zeichnen sich die untersuchten Populationen durch ein hohes Maß an genetischer Vielfalt aus. Durch beispielsweise genetische Drift oder mangelhaften Genaustausch bedingte genetische Differenzierungen zwischen den Populationen konnten mit den verwendeten Markersystemen nicht nachgewiesen werden. Die Kombination beider Teilergebnisse führt zur Beantwortung der Frage, welcher Parameter für die Variation der Fichte entscheidend ist. So konnte mit allen vier verwendeten Methoden (RAPD, ISSR, SSR, EST) deutlich gemacht werden, dass die genetische Variation der untersuchten Fichten auf die Variation innerhalb der untersuchten Populationen zurückgeführt werden kann (65% bis 99,75%). Während der Rest der Variation durch die Variation zwischen den Populationen erklärt werden kann (3% bis 27%), hat die Variation zwischen den angenommenen Gruppen – mit Ausnahme in den Ergebnissen der ISSR-Analyse – keine Relevanz.

Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, dass auch von zahlreichen anderen Autoren mit Hilfe isoenzymatischer Untersuchungen bereits ähnlich beschrieben wurde. So konnten BERGMANN et al. (1990) beispielsweise darlegen, dass in ihrer Studie zu zehn Beständen aus allen forstlich bedeutsamen Fichten-Herkunftsgebieten Deutschlands die Intrapopulationsdifferenzierung deutlich größer als die genetische Differenzierung zwischen den untersuchten Populationen war (vgl. auch KONNERT & FRANKE 1991). STUTZ (1990b) wies in diesem Zusammenhang auch für die von ihm als kleinräumig stark angepasst bezeichneten Fichtenbestände im Wallis (Schweiz) nach, dass die genetische Variation innerhalb der Bestände größer war als zwischen ihnen. Dieses Phänomen betrifft im übrigen auch künstliche Bestände: So gibt SCHMIDT-VOGT (1974b) für Untersuchungen zu forstlichen Herkünften an, dass die Variation innerhalb der Herkunft weit größer als die zwischen den untersuchten Herkünften sei. Einen Sonderfall stellt in diesem Zusammenhang die Untersuchung von LEIBENGUTH & SHOGHI (1998) dar, die die Ursache der Gesamtvariation südwestdeutscher Fichtenpopulationen zwar auch in der großen Vielfalt innerhalb der Population sahen, aber aufgrund der großen Variation sogar höhere Ähnlichkeitsmaße zwischen den Populationen als innerhalb der Populationen errechneten. Diesen Ergebnissen entsprechend gehen auch GIANNINI et al. (1991a) von einer sehr großen genetischen Variation innerhalb der von ihnen untersuchten Fichtenpopulationen aus und weisen darauf hin, dass sich dieses Schema der Verteilung der Variation in den meisten Koniferen findet. HAMRICK & GODT (1989) sehen diese Verteilung genetischer Diversität sogar für alle langlebige und auskreuzende Pflanzenarten bestätigt (vgl. CARLSON et al. 1994). Gemäß den Ausführungen zur Sensitivität einzelner Markersysteme variieren die zur exakten Darstellung des Anteils der populationsinternen Variation angegebenen Prozentwerte aber sehr stark. PAULE et al. (1990, 1993) geben in diesem Zusammenhang an, dass die genetische Diversität zu „weit über 80%“ von der Diversität innerhalb der Population geprägt wird. Dabei handele es sich um einen Anteil, der auch bei zahlreichen anderen Koniferen (z.B. *Pinus longaeva*, *Pinus monticola*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*) bekannt und nachgewiesen sei. Umgekehrt wird berichtet, dass bei Waldbaumpopulationen durchschnittlich nur ca. 5% der gesamten genetischen Variation auf die Variation zwischen Populationen entfallen (vgl. HAMRICK & GODT 1989, BUCCI et al. 1997a). Bei Untersuchungen zur Fichte in Polen waren sogar nur 1,8% der genetischen Variation auf die Variation zwischen den Populationen zurückzuführen (GONCHARENKO et al. 1993, 1995).

Die Tatsache, dass die genetische Variation der Fichte offenbar unabhängig von der angewandten Methode und der betrachteten Populationen hauptsächlich auf die Variation innerhalb der jeweiligen Populationen zurückgeführt werden kann, erklärt die beiden zuvor diskutierten Aspekte zur genetischen Differenzierung und der genetischen Variabilität der Bestände. **Die genetische Variation ist innerhalb einer Population so hoch, dass anhand eines zufälligen Griffes in eine einzige Population bereits ein Großteil des Genpools der Fichte beinhaltet ist**. Die Variabilität einer Population führt somit dazu, dass Unterschiede zwischen den Populationen durch Unterschiede zwischen den Individuen einer Population überlagert werden. Im paarweisen Vergleich zweier Populationen werden somit keine Differenzierungen nachweisbar. Dies betrifft nach den vorliegenden Erkenntnissen sowohl natürliche Populationen, die über Selektion Anpassungsprozesse an ihren

Standort durchlaufen haben können, als auch künstlich angelegte Bestände, deren Ursprung auf in Samenklengen durchgeführte Durchmischungen zurückführbar ist.

6.4 Zusammenhang zwischen Morphologie/Biometrie und Genetik

Im Rahmen der morphologisch-biometrischen Charakterisierung der untersuchten Individuen konnte deutlich gemacht werden, dass bezüglich einiger morphologischer Parameter bzw. der ausgewählten biometrischen Parameter z.T. große Unterschiede zwischen den Populationen bestehen. Da es sich im Rahmen dieser Untersuchung nur um ein Set von Parametern handelt, das im forstlichen Umweltmonitoring, den Waldschadenserhebungen der Länder oder in Untersuchungen zur Umweltbeobachtung (vgl. u.a. SCHMIDT-VOGT 1972a, FAENSEN-THIEBES et al. 1999, BARTEL et al. 2002, 2003a; Ministerium für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg 2002, DIETRICH & HEITZ 2003) erfasst wird, ist davon auszugehen, dass durch weitere Parameter ein noch höheres Maß an Variation nachweisbar wird. SAUER et al. (1973) beschreibt in diesem Zusammenhang, dass die Fichte zum Beispiel im Austriebsverhalten, den Holzeigenschaften, der Frostresistenz und in verschiedenen Samenmerkmalen signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Beständen aufweist. Außerdem wären hinsichtlich der durch die Standortfaktoren geprägten phänologischen Aspekte noch weitere Differenzierungen zwischen den untersuchten Populationen zu erwarten (vgl. KRUTZSCH 1974, SCHMIDT-VOGT 1977). Die standortkundlichen Unterschiede wurden in diesem Zusammenhang bereits häufig als Ursache für eine Differenzierung diskutiert, die auch genetisch manifestiert sein kann (vgl. LUNDKVIST & RUDIN 1977, BERGMANN 1978, HAMRICK 1979, ROTHE 1988).

Entgegen diesem Ansatz konnten im Rahmen der populationsgenetischen Charakterisierung keine wesentlichen Differenzierungen zwischen den untersuchten Populationen nachgewiesen werden. Unter Kenntnis der Bindung einiger Enzymsysteme an klimatische Faktoren sind direkte Beziehungen zwischen phänotypischer und genotypischer Ausprägung aber anzunehmen und es muss vermutet werden, dass ein solcher Nachweis mit den verwendeten Markersystemen lediglich nicht erbracht werden konnte. Die Auswahl der Markersysteme zielte aber auch nicht auf den Nachweis eines solchen Zusammenhangs ab. RAPD- und ISSR-Verfahren wurden ausgewählt, weil mit ihnen eine große Zahl an Markern nachweisbar ist und die Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer statistisch ausreichenden Zahl von Polymorphismen hoch ist. Die SSR-Analyse wurde als ergänzendes Verfahren ausgewählt um gegenüber den beiden dominanten Verfahren einen zusätzlichen Informationsgewinn zu erhalten, insbesondere da hiermit zwischen homo- und heterozygoten Individuen unterschieden werden kann. Allen Methoden zu eigen ist, dass mit ihnen nicht codierende Genomabschnitte abgebildet werden. Das heißt, es werden Polymorphismen nachgewiesen, die die

Grundlage einer Differenzierung darstellen; es kann allerdings keine Aussage dazu getroffen werden, was dieser Unterschied funktional bedeutet. FOURRE et al. (1997) kritisieren in diesem Zusammenhang die RAPD-PCR als vergleichsweise „uninformativ", da dadurch unter Umständen „bedeutende" Variationen überhaupt nicht detektierbar sind bzw. „bedeutende" und „unbedeutende" Informationen nicht unterschieden werden können. Der Nachweis eines funktionalen Zusammenhangs von Geno- und Phänotyp ist nur bei Verfahren zu erwarten, die im exprimierten Bereich angreifen, wie beispielsweise die Isoenzymanalyse oder EST-PCR. Allerdings konnte mit Hilfe der aus diesem Grund verwendeten EST-Marker ebenfalls kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Im Rahmen der EST-Analyse wurden generell hohe Ähnlichkeiten zwischen den untersuchten Populationen ermittelt, mit maximalen Distanzmaßen von Ds = 0,023 ist nicht von Differenzierungen zwischen den Populationen auszugehen. Theoretisch betrachtet kann dies auf zwei Gründe zurückgeführt werden: Zum einen ist anzunehmen, dass die errechneten Distanzmaße aufgrund der niedrigen Markerzahl (n=9) sicherlich statistisch nicht absicherbar sind. Es kann vermutet werden, dass unter Berücksichtigung weiterer EST-Primer eine größere Markerzahl ermittelt werden kann, mit der ein Zusammenhang zwischen Morphologie und Genetik nachweisbar wäre. Zum anderen stellt sich aber viel eher die Frage nach der tatsächlichen Funktionalität der verwendeten EST-Marker. Wie in Kap. 4.2.6 beschrieben wurde, handelt es sich bei den verwendeten Primern nicht um Primer für spezifische Fichten-cDNA-Klone, sondern um Primer, die an DNA-Abschnitten anlagern, die mehr oder weniger homolog zu Proteinen von *Nicotiana tabacum* und *Brassica napus* sind. Nach Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse muss geschlossen werden, dass durch die verwendeten EST-Primer keine ausreichende Funktionalität gewährleistet werden kann. Da zur Zeit allerdings keine anderen EST-Primer für *Picea abies* vorliegen (vgl. RIEGEL 2001, SCHUBERT et al. 2001), kann eine Beziehung von morphologischer und genetischer Differenzierung mit DNA-Markern noch nicht nachgewiesen werden.

Es bleibt festzuhalten, dass lediglich die zukünftige Entwicklung von EST-Markern dieses Problemfeld lösen kann. In diesem Zusammenhang erscheinen insbesondere Markersysteme interessant, die über den Stoffwechsel der Fichte Abhängigkeiten von Standortfaktoren anzeigen können, wie zum Beispiel klimatische oder höhenabhängige Faktoren, wie sie für einzelne Enzymsysteme angenommen werden. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass die Entwicklung derart spezifischer Markersysteme als sehr schwierig betrachtet werden muss und sicherlich noch einige Jahre benötigt. Selbst für die seit zwei Jahrzehnten etablierten Isoenzymverfahren liegen nur wenige Kenntnisse zu einem direkten Zusammenhang zwischen Enzymfunktion und geographischer Differenzierung vor. Während es zwar BERGMANN (1975, 1978) gelang Polymorphismen der Sauren Phosphatase mit der mittleren Jahrestemperatur zu korrelieren (vgl. LUNDKVIST & RUDIN 1977, PAULE et al. 1990), konnten KONNERT & FRANKE (1991) keine Korrelationen zwischen den genetischen Abständen und geographischer Entfernung erreichen (vgl. KONNERT & FRANKE 1991). Hinsichtlich des Zusammenhangs von morphologischer Ausprägung und DNA-Sequenz wären sicherlich Aspekte interessant, wie die für den G-6-PDH-Locus vermutete höhenabhängige Variabilität (vgl. KONNERT & FRANKE 1990,

FRANKE & KONNERT 1990, STUTZ 1990b, GÄRTNER et al. 1996) oder die für Polymorphismen von EST-A, EST-B, LAP-A und LAP-B beschriebene geographisch bedingte Variation (BERGMANN 1973, 1974).

7 Zusammenfassung

Die Gemeine Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) zählt in Mitteleuropa zu den häufigsten und wirtschaftlich bedeutsamsten Baumarten. Aufgrund ihrer forstwirtschaftlichen Nutzbarkeit wird sie – insbesondere in Deutschland – weit über ihr natürliches Verbreitungsgebiet hinaus angebaut und prägt seit Beginn ihrer intensiven Förderung im 18. Jahrhundert weite Landschaftsteile Süddeutschlands, die höheren Lagen der Mittelgebirge sowie zahlreiche Sonderstandorte Norddeutschlands. Die Entwicklungsgeschichte der jeweiligen Populationen und die auf sie einwirkenden Standortfaktoren haben in Bezug auf ihre genetische Konstitution unterschiedlichen Einfluss ausgeübt. Wenn auch anhand morphologischer und isoenzymatischer Studien erste Kenntnisse zur Differenzierung der Fichte in ihrem europäischen Verbreitungsgebiet vorliegen, so muss der Informationsgehalt dieser Verfahren als beschränkt angesehen werden und es muss darüber hinaus vermutet werden, dass die bisher verwendeten Methoden nicht ausreichend in der Lage sind die genetische Variabilität der Fichte und die Differenzierung ihrer Populationen in ihrem deutschen Verbreitungsgebiet zu beschreiben.

Ziel dieser Untersuchung war deshalb die Durchführung einer umfassenden populationsgenetischen Charakterisierung der Fichte in Deutschland auf Basis geeigneter molekulargenetischer Verfahren. Der Schwerpunkt lag insbesondere auf der **Überprüfung möglicher genetischer Differenzierungen von Populationen** und in der **Darstellung ihrer genetischen Variabilität**. Dazu wurden insgesamt vier PCR-gestützte Techniken eingesetzt: **RAPD** (*random amplified polymorphic DNA*), **ISSR** (*inter simple sequence repeats*), **SSR** (*simple sequence repeats*) und **EST** (*expressed sequence tags*). Die dominanten Markersysteme RAPD und ISSR wurden ausgewählt, weil mit ihnen insbesondere nicht codierende Genomabschnitte untersucht werden und damit eine große Anzahl an Polymorphismen nachweisbar ist. Um Informationsverlust durch alleinige Verwendung dominanter Marker zu vermeiden und um zwischen homo- und heterozygoten Individuen unterscheiden zu können, wurden die Analysen durch den Einsatz der codominanten Markersysteme SSR und EST ergänzt. Die populationsgenetischen Analysen erfolgten an sieben Fichtenbeständen, deren Auswahl sowohl die gesamte Nord-Süd-Ausdehnung Deutschlands als auch die wesentlichen Höhenstufen berücksichtigte. Mit den Standorten Berchtesgaden, Bayerischer Wald, Harz, Hunsrück, Solling, Warndt und Belau wurden darüber hinaus sowohl Bestände innerhalb als auch außerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes der Fichte mit einbezogen. Von jeder Fläche wurden 30 Individuen beprobt, morphologisch-biometrisch charakterisiert und populationsgenetisch analysiert. Als Probenmaterial für die genetische Analyse wurden Nadeln einjähriger Triebe verwendet.

Die **morphologisch-biometrische Analyse** ergab bezüglich der Parameter Stammumfang, Baumhöhe, Trieblänge und -gewicht einjähriger Triebe sowie einiger daraus errechneter Relationen große Differenzierungen zwischen den untersuchten Populationen. Insbesondere in Abhängigkeit von der Höhenlage waren drei Wuchstypen zu unterscheiden: Während sich die Bestände in den Höhenlagen durch niedrigen aber kräftigen Wuchs sowie vergleichsweise kurze und kompakt

erscheinende Triebe auszeichneten (Berchtesgaden-Typ), zeigten die Bäume der Niederungen eher ein verhältnismäßig schlankes Erscheinungsbild und lange Triebe bei niedrigen Triebgewichten (Belau-Typ). Die übrigen Bestände waren einem intermediären Typ zuzuordnen, der abhängig von dem betrachteten Parameter der einen oder der anderen Form näher steht und sowohl hinsichtlich der Baumform als auch der Form der Triebe zwischen diesen beiden Extremen anzuordnen ist.

Im Rahmen der **populationsgenetischen Analyse** wurden zahlreiche deskriptive Parameter (Ähnlichkeit der Individuen innerhalb und zwischen den Populationen, Faktorenanalyse, Clusteranalyse der Rohdaten sowie der Allelfrequenzen) und populationsgenetische Parameter (genetische Identität, genetische Distanz, genetische Diversität sowie Schätzungen zu Genfluss, zur *isolation by distance* und zur Ursache genetischer Variation) zur Charakterisierung der Populationen verwendet. Während mit den dominanten Verfahren mit 14 (RAPD) bzw. 4 (ISSR) Primern 234 bzw. 36 Marker amplifiziert wurden, konnten mit Hilfe der jeweils 3 verwendeten SSR- bzw. EST-Primer 34 bzw. 9 Produkte nachgewiesen werden. Es konnte deutlich gemacht werden, dass die Detailbetrachtung der je nach Markersystem ermittelten populationsgenetischen Parameter zum Teil gegensätzliche Ergebnisse erbrachte. Während im Rahmen der ISSR-Analyse eine deutliche Differenzierung der Populationen innerhalb des natürlichen Verbreitungsgebietes gegenüber der Gruppe der künstlichen Bestände erbracht werden konnte, war dies mit den übrigen Markersystemen nicht nachvollziehbar. In der Gesamtbetrachtung aller Ergebnisse sind jedoch drei Schwerpunkte über alle verwendeten Methoden herauszuarbeiten: **(1) zwischen den untersuchten Populationen bestehen lediglich geringe Differenzierungen, (2) die untersuchten Populationen zeichnen sich durch eine hohe bis sehr hohe genetische Variabilität aus, (3) die Variation der Grundgesamtheit ist durch die Variation innerhalb der Populationen begründet**. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die genetische Variation innerhalb einer Population so hoch ist, dass anhand eines zufälligen Griffes in eine einzige Population bereits ein Großteil des Genpools der Fichte beinhaltet ist. Die Variabilität einer Population führt somit dazu, dass Unterschiede zwischen den Populationen durch Unterschiede zwischen den Individuen einer Population überlagert werden. Im paarweisen Vergleich zweier Populationen werden somit keine Differenzierungen nachweisbar. Dies betrifft nach den vorliegenden Erkenntnissen sowohl natürliche Populationen, die über Selektion Anpassungsprozesse an ihren Standort durchlaufen haben können, als auch künstlich angelegte Bestände, deren Ursprung auf in Samenklengen durchgeführte Durchmischungen zurückführbar ist.

Mit diesen Ergebnissen konnte auf Basis von DNA-Analysen die aus theoretischen Überlegungen sowie aus isoenzymatischen Untersuchungen stammenden Vermutungen hoher genetischer Variabilität von Fichtenpopulationen belegt werden. Darüber hinaus konnte deutlich gemacht werden, dass mit den verwendeten Markersystemen trotz großer morphologisch-biometrischer Differenzierung der untersuchten Bestände kein Zusammenhang zwischen Morphologie und Genetik nachweisbar ist. Erst die Entwicklung spezifischer EST-Marker wird die zur Zeit noch bestehende Lücke des funktionalen Zusammenhangs schließen können.

8 Literatur

AAGAARD, J.E.; KRUTOVSKII, K.V. & STRAUSS , S.H. (1998a): RAPD markers of mitochondrial origin exhibit lower population diversity and higher differentiation than RAPDs of nuclear origin in Douglas fir. *Mol Ecol* 7: 801-812.

AAGAARD, J.E.; KRUTOVSKII, K.V. & STRAUSS, S.H. (1998b): RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81: 69-78.

ABBOT, P. (2001): Individual and population variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science* 1(8): 1-4.

ALEXANDROV, A. (1971): The occurence of forms of Norway spruce based on branching habit. *Silvae Genetica* 20: 204-208.

ALTUKHOV, Y.P.; GAFAROV, N.I.; KRUTOVSKII, K.V. & DUKHAREV, V.A. (1986a): Allozyme polymorphism in a natural population of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). III. Correlation between levels of individual heterozygosity and relative number of inviable seeds. *Soviet Genetics* (New York) 22(12): 1580-1585.

ALTUKHOV, Y.P.; KRUTOVSKII, K.V.; GAFAROV, N.I.; DUKHAREV, V.A. & MOROZOV, G.P. (1986b): Allozyme variability in a natural population of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). 1. Polymorphic systems and mechanisms of their genetic control. *Soviet Genetics* (New York) 22(8): 1028-1040.

ANDERSSON, E.; JANSSON, R. & LINDGREN, D. (1974): Some results from second generation crossings involving inbreeding in Norway spruce (*Picea abies*). *Silvae Genetica* 23: 34-43.

ARCADE, A.; ANSELIN, F.; FAIVRE, RAMPANT, P.; LESAGE, M.C.; PAQUES, L.E. & PRAT, D. (2000): Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor Appl Genet* 100: 299-307.

ARNDT, U.; NOBEL, W. & SCHWEIZER, B. (1987): Bioindikatoren – Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse. Eugen Ulmer, Stuttgart. 368 Seiten.

ARNHEIM, N. & ERLICH, H. (1992): Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 61: 131-156.

ARNHEIM, N.; WHITE, T. & RAINEY, W.E. (1990): Application of PCR - Organismal and population Biology. *BioScience* 40: 174-182.

ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.

AUTINO, A.; SPERISEN, C. & VENDRAMIN, G.G. (1998): Sequence announcements – GenBank accession number AF010431-AF010433. *Plant Molecular Biology* 37(6): 1087-1088

BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. (2002): The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 11: 155-165.

BARADAT, P.; ADAMS, W.T. & MÜLLER-STARCK, G. (Hrsg.) (1995): Population genetics and genetic conservation of forest trees. SPB Academic Publishing, Amsterdam.

BARTEL, M. & QUACK, M. (2000): Erstellung gebietsbezogener Probenahmepläne und Vorbereitung der Routineprobenahme für die neuen Probenahmegebiete der Umweltprobenbank des Bundes. Abschlussbericht zum F&E-Vorhaben FKZ 298 91 778, im Auftrag des Umweltbundesamtes. Berlin.

BARTEL, M.; KLEIN, R.; NEITZKE, M.; NENTWICH, K.; PAULUS, M.; WAGNER, G. & MÜLLER, P. (2002): Beiträge zur Probenahme und Probenbeschreibung für die Umweltprobenbank des Bundes – Jahresbericht 2001. Universität Trier, Trier. 214 Seiten.

BARTEL, M.; KLEIN, R.; NENTWICH, K.; PAULUS, M.; QUACK, M.; WAGNER, G. & MÜLLER, P. (2003a): Beiträge zur Probenahme und Probenbeschreibung für die Umweltprobenbank des Bundes – Jahresbericht 2002. Universität Trier, Trier. 146 Seiten.

BARTEL, M; KLEIN, R.; NEITZKE, N.; NENTWICH, K.; PAULUS, M.; QUACK, M. & WAGNER, G. (2003b): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Gemeine Fichte (*Picea abies*), Wald-Kiefer (*Pinus sylvestris*). [Fortschreibung der Richtlinie nach WAGNER et al. 1996, bisher unveröffentlicht.]

BARTELS, H (1971): Isoenzyme und ihre Bedeutung für die Forstpflanzenzüchtung und -genetik. *AFZ* 26: 50-52.

BASTIEN, D.; FAVRE, J.M.; COLLIGNON, A.M.; SPERISEN, C. & JEANDROZ, S. (2003): Characterization of a mosaic minisatellite locus in the mitochondrial DNA of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Theor Appl Genet* 10.1007/s00122-003-1284-2

BAUER, E. (1962): Der Soonwald im Hunsrück – Forstgeschichte eines deutschen Waldgebietes. Dissertation, Universität Freiburg.

BAUER, E. (1966): Zur Geschichte des Nadelholzanbaus im Raume Kaiserslautern und in der Pfalz bis zum Ende des 18. Jahrhunderts. *Jb z Gesch v Stadt u Landkr Kaiserslautern* 4.

BAUER, E. (1969): Aus der Geschichte des Nadelholzanbaus in Hunsrück und Eifel. *Forst- und Holzwirt* 24: 45-47.

BECHSTEIN, J.M. (1815): Forstbotanik. Erfurt.

BECK, C.B. (1970): The appearance of the gymnospermous structure. *Camb Phil Soc Biol Rev* 45: 379-400.

BECKMANN, J.G. (1777): Gegründete Versuche und Erfahrungen von der in unseren Zeiten höchst nötigen Holzsaat. Chemnitz.

BEHM, A.; BECKER, A.; DORFLINGER, H.; FRANKE, A.; KLEINSCHMIT, J.; MELCHIOR, H.G.; MUHS, H.J.; SCHMITT, H.P.; STEPHAN, B.R.; TABEL, U.; WEISGERBER, H. & WIDMAIER, T. (1997): Concept for the conservation of forest genetic resources in the Federal Republic of Germany. *Silvae Genetica* 46(1): 24-34.

BERGMANN, F. & GREGORIUS, H.R. (1979): Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway Spruce (*Picea abies*). In: RUDIN, D. (Hrsg.): Proceedings of the conference on biochemical genetics of forest trees. Umeå. S. 99-107

BERGMANN, F. & HOSIUS, B. (1996a): Effects of heavy-metal polluted soils on the genetic structure of Norway spruce seedling populations. *Water, Air and Soil Pollution* 89: 363-373.

BERGMANN, F. & HOSIUS, B. (1996b): Genetische Variation innerhalb und zwischen Waldbaumarten - Biochemische und populationsgenetische Determinanten der Isoenzympolymorphismen. In: MÜLLER-STARCK, G. (Hrsg.): Biodiversität und nachhaltige Forstwirtschaft. Ecomed Verlag, Landsberg/Lech. S. 26-37.

BERGMANN, F. & LEINEMANN, L. (2000): Nutzen molekularer Marker bei der Ausweisung von Genreservaten (Genressourcen). In: FINKELDEY, R.; BONFILS, P. & LANDOLT, R. (Hrsg.): Forstliche Genreservate. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf. S. 115-120.

BERGMANN, F. & RUETZ, F.W: (1991): Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. *For Ecol Manage* 46: 39-48.

BERGMANN, F. & SCHOLZ, F. (1986): Changes in genetic structure by air pollution as studied by isozyme-gene-systems in Norway spruce. In: MUHS, H.-J. (Hrsg.): Biochemical genetics and legislation of forest reproductive material. Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt f. Forst- u. Holzwirtschaft, Hamburg 154. S. 9-13.

BERGMANN, F. & SCHOLZ, F. (1987): The impact of air pollution on the genetic structure of Norway spruce. *Silvae Genetica* 36(2): 80-83.

BERGMANN, F. & SCHOLZ, F. (1989): Selection effects of air pollution in Norway spruce (*Picea abies*) populations. In: SCHOLZ, F.; GREGORIUS, H.R. & RUDIN, D. (Hrsg.): Genetic effects of air pollutants in forest tree populations. Springer, Berlin. S. 143-160.

BERGMANN, F. (1971): Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. 1. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Fortssaatgut. *Allg Forst- u J-Ztg* 142: 278-280.

BERGMANN, F. (1973): Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. 2. Genetische Kontrolle von Esterase- und Leucinaminopeptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen. *Theor Appl Genet* 43: 222-225.

BERGMANN, F. (1974): Genetischer Abstand zwischen Populationen. 2. Die Bestimmung des genetischen Abstands zwischen europäischen Fichtenpopulationen (*Picea abies*) auf der Basis von Isoenzym-Genhäufigkeiten. *Silvae Genetica* 23: 28-32.

BERGMANN, F. (1975): Herkunfts-Identifizierung von Forstsaatgut auf der Basis von Isoenzym-Genhäufigkeiten. *Allg Forst- u J-Ztg* 146(10): 191-195.

BERGMANN, F. (1978): The allelic distribution at an acid phosphatase locus in Norway spruce (*Picea abies*) along similar climatic gradients. *Theor Appl Genet* 52: 57-64.

BERGMANN, F. (1982): Worin unterscheiden sich Herkünfte? In: Forum Genetik-Wald-Forstwirtschaft, Bericht der 2. Arbeitstagung, Institut für Forstgenetik, Forstpflanzenzüchtung und Forstliche Biometrie, Universität Göttingen. S. 69-73.

BERGMANN, F. (1984): Ein besonderer Fall geographischer Variation an zwei Enzym-Genloci der Fichte (*Picea abies*). Verhandlungen der 3. Arbeitstagung Forum-Genetik-Wald-Forstwirtschaft. Göttingen. S. 8-14.

BERGMANN, F. (1991): Causes and consequences of species-specific genetic variation patterns in European tree species - Examples with Norway spruce and silver fir. In: MÜLLER-STARCK, G. & ZIEHE, M. (Hrsg.): Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt a. Main. S.192-204.

BERGMANN, F.; GREGORIUS, H.R. & MÜLLER-STARCK, G. (1990): Artspezifische Variationsmuster und Deklaration von Genressourcen. Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Nr. 164. Hamburg. S. 29-32.

BERNHART, A. (1963): Beziehungen zwischen Niederschlägen und Jahrringbreiten an Fichten aus dem Bayerischen Wald. *Forstwiss Cbl* 82: 321-336.

BINELLI, G. & BUCCI, G. (1994): A genetic linkage map of *Picea abies* Karst., based on RAPD markers, as a tool in population genetics. *Theor Appl Genet* 88: 283-288.

BIRKY, C.W. (1995): Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes – mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 331-338.

BLAIR, M.W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S.R. (1999): Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 98: 780-792.

BML (Bundesministerium für Landwirtschaft) (1994): Verordnung über die Herkunftsgebiete für forstliches Vermehrungsgut vom 07.10.1994. BGBL I. S. 3578.

BMVEL (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft) (2002): Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) 533-7015/1. Inkrafttreten 1.1.2003.

BONNER, F.T. (1990): Storage of seeds – Potential and limitations for germplasm conservation. *For Ecol Management* 35: 35-43.

BORGHETTI, M.; GIANNINI, R. & MENOZZI, P. (1988): Geographic variation in cones of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genetica* 37(5-6): 178-184.

BORNET, B. & BRANCHARD, M. (2001): Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers – Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.

BOROWSKY, R.L. (2000): Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* http://pages.nyu.edu/~rb4/MPEpaper.pdf. S. 1-6.

BORSCHERS, K. (1959): Die Harzfichtenwirtschaft - Rückblick und Zielsetzung. *Allg Forstz* 14: 301-306.

BORSCHERS, K. (1967): Niedersachsen, Fichte. In: Anonymus: Wertvolle Herkünfte forstlicher Baumarten in der Bundesrepublik Deutschland. München.

BORTZ, J. (1993): Statistik. 4. vollst. überarb. Aufl. Springer Verlag, Berlin.

BORTZ, J.; LIENERT, G.A. & BOEHNKE, K. (1990): Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Springer Verlag, Berlin.

BOSCHERINI, G.; MORGANTE, M.; ROSSI, P.; VENDRAMIN, G.G. & VICARIO, F. (1994): Detection of DNA polymorphisms in *Pinus leucodermis* Ant. using random amplification. *For Genet* 1: 131-137.

BOSCHERINI, G.; VENDRAMIN, G.G. & GIANNINI, R. (1993): Mating system analysis of two Italian populations of Norway spruce. *J Genet Breed* 47: 45-48.

BOUSQUET, J.; SIMON, L. & LALONDE, M. (1990): DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can J Forest Res* 20: 254-257.

BOWDITCH, B.M.; ALBRIGHT, D.G.; WILLIAMS, J.G.K. & BRAUN, M.J. (1993): Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymol* 224(21): 294-309.

BRAUN, G. (1977): Über Ursachen der Immissionsresistenz bei Fichte und Folgerungen für die Resistenzzüchtung. *Forstw Cbl* 96: 62-67.

BREITENBACH-DORFER, M. & GEBUREK, T. (1995): Gene modifies electrophoretic properties of malate dehydrogenase in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Hereditas* 122(2): 103-108.

BRUFORD, M.W. & WAYNE, R.K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genet Dev* 3: 939-943.

BRÜGGER, C. (1886): Mitteilungen über neue und kritische Pflanzenformen. *Jber Naturforsch Ges Graubündens* 29: 46-177.

BRUNEL, D. & RODOLPHE, F. (1985): Genetic neighbourhood structure in a population of *Picea abies* L. *Theor Appl Genet* 71: 101-110.

BUCCI, G. & MENOZZI, P. (1993): Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) in *Picea abies* Karst. *Mol Ecol* 2: 227-232.

BUCCI, G. & MENOZZI, P. (1995): Genetic variation of RAPD markers in a Norway spruce (*Picea abies* Karst.) population. *Heredity* 75: 188-197.

BUCCI, G. & MENOZZI, P. (2002): Spatial autocorrelation and linkage of Mendelian RAPD markers in a population of *Picea abies* Karst. *Mol Ecol* 11: 305-315.

BUCCI, G. & VENDRAMIN, G.G. (2000): Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Mol Ecol* 9: 923-934.

BUCCI, G. (1997): Norway spruce genetic resources in Italy. In: TUROK, J. & KOSKI, V. (Hrsg.): *Picea abies* Network, Report of the 2nd Meeting, September 5-7, 1996, Hyytiälä/Finland. Rom. S. 38-45.

BUCCI, G.; BINELLI, G. & MENOZZI, P. (1995): Identification of a new set of molecular markers in Norway spruce as revealed by random amplification techniques. In: BARADAT, P.; ADAMS, W.T. & MÜLLER-STARCK, G. (Hrsg.): Population genetics and genetic conservation of forest trees, SPB Academic Publ., The Hague, The Netherlands. S. 121-127.

BUCCI, G.; KUBISIAK, T.L.; NANCE, W.L. & MENOZZI, P. (1997a): A population 'consensus', partial linkage map of *Picea abies* Karst. based on RAPD markers. *Theor Appl Genet* 95: 643-654.

BUCCI, G.; VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L. & VICARIO, F. (1997b): Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered populations – use of molecular markers for conservation purposes. *Theor Appl Genet* 95: 1138-1146.

BÜHL, A. & ZÖFEL, P. (2000): SPSS Version 10 – Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. 7. Aufl., Addison-Wesley, München.

Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Erhaltung forstlicher Genressourcen und Forstsaatgutrecht" (2000): Konzept zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung forstlicher Genressourcen in der Bundesrepublik Deutschland. Neufassung 2000. Recklinghausen.

Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Erhaltung forstlicher Genressourcen" (1987): Konzept zur Erhaltung forstlicher Genressourcen in der Bundesrepublik Deutschland. *Forst und Holz* 44: 379-404.

BURG, K.; FLUCH, S. & VENDRAMIN, G. (1998): cpDNA. In: KARP, A.; ISAAC, P. & INGRAM, D. (Hrsg.): Molecular tools for screening biodiversity – plants and animals. Chapman & Hall, London. S. 223-228.

BURKE, T.; HANOTTE, O.; BRUFORD, M.W. & CAIRNS, E. (1991): Multilocus and single locus minisatellite analysis in population biological studies. In: BURKE, T.; DOLF, G.; JEFFREYS, A.J.; & WOLFF, R. (Hrsg:): DNA Fingerprinting - Approaches and applications. Birkhäuser Verlag, Basel. S. 154-168.

BÜSCHER, N.; ZYPRIAN, E. & BLAICH, R. (1993): Identification of grapevine cultivars by DNA analyses - pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. *Vitis* 32: 187-188.

CAETANO-ANOLLÉS, G. (1993): Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Applic* 3: 85-94.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J. & GRESSHOFF, P.M. (1991): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology* 9: 553-557.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J. & GRESSHOFF, P.M. (1992): Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol Gen Genet* 235: 157-165.

CAMACHO , F.J. & LISTON, A. (2001): Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *American Journal of Botany* 88(6): 1065-1070.

CAMPBELL, D.R. (1991): Comparing pollen dispersal and gene flow in a natural population. *Evolution* 455: 1965-1968.

CARLSON, J.E.; HONG, Y.-P.; BROWN, G.R. & GLAUBITZ, J.C. (1994): FISH, DNA amplification markers and conifers. In: GRESSHOFF, P.M. (Hrsg.): Plant genome analysis. CRC Press, Boca Raton. S. 69-82.

CARLSON, J.E.; TULSIERAM, L.K.; GLAUBITZ, J.C.; LUK, V.W.K.; KAUFFELDT, C. & RUTLEDGE, R. (1991): Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83: 194-200.

CASTIGLIONE, S.; WANG, G.; DAMIANI, G.; BANDI, C.; BISOFFI, S. & SALA, F. (1993): RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theor Appl Genet* 87: 54-59.

CATO, S.; GARDNER, R.; KENT, J. & RICHARDSON, T. (2001): A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. *Theor Appl Genet* 102: 296-306.

CERVERA, M.T.; REMINGTON, D.; FRIGERIO, J.M.; STORME, V.; IVENS, B.; BOERJAN, W. & PLOMION, C. (2000): Improved AFLP analysis of tree species. *Can J For Res* 30: 1608-1616.

CHA, R.S. & THILLY, W.G. (1995): Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. In: DIEFFENBACH, C.W. & DVEKSLER, G.S. (Hrsg.): PCR primer - A laboratory manual. CSHL-Press. S. 37-51.

CHAMBERLAIN, C.J. (1935): Gymnosperms – structure and evolution. Chicago University Press, Chicago.

CHAN, K.F. & SUN, M. (1997): Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor Appl Genet* 95: 865-873.

CHANDELIER, A.; DU JARDIN, P.; AVRIL, C. & PAQUES, M. (1999): Identification of mitochondrial plasmid-like DNAs in *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Rep* 18: 841-847.

CHARLESWORTH, B. & CHARLESWORTH, D. (1987): Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.

CHELIAK, W.M & PITEL, J.A. (1984): Genetic control of allozyme variants in mature tissues of white spruce trees. *J Hered* 75: 34-40.

CHELIAK, W.M.; SKRØPPA, T. & PITEL, J.A. (1987): Genetics of the polycross - 1. Experimental results from Norway spruce. *Theor Appl Genet* 73: 321-329.

CHYLARECKI, H. & GIERTYCH, M. (1969): Variability of *Picea abies* (L.) Karst. cones in Poland. *Arboretum Kórnickie* 14: 39-71.

CIESLAR, A. (1887): Über den Einfluss der Größe des Fichtensamens auf die Entwicklung der Pflanzen. *Zentralbl f d ges Forstwes* (ohne weitere Angabe).

CLARK, A.G. & LANIGAN, C.M.S. (1993): Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDS. *Mol Biol Evol* 10: 1096-1111.

CLEGG, M.T. (1989): Molecular diversity in plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L. & WEIR, B.S. (Hrsg.): Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Sinauer Associates, Sunderland, MA. S. 98-115.

COLLIGNON, A.M. & FAVRE, J.M. (2000): Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies'* natural area using RAPD markers. *Annals of Botany* 85: 713-722.

COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J.M.; PIONNEAU, C.; BODÉNÈS, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M.; REMINGTON, D.L. & PLOMION, C. (2000) A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theor Appl Genet* 100: 39-48.

DALE, G. & TEASDALE, B. (1995) Analysis of growth, form and branching traits in an F2 population of the *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* interspecific hybrid using RAPD markers. In: Proceedings of the 25th Southern Forest Tree Improvement Conference. S. 242-253.

DE BUSTOS, A.; CASANOVA, C.; SOLER, C. & JOUVE, N. (1998): RAPD variation in wild population of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). *Theor Appl Genet* 96: 101-111.

DE FILIPPIS, L. & MAGEL, E. (1998): Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in *Robinia* trees using RAPD-PCR. *Trees* 12: 377-384.

DEMEKE, T.; ADAMS, R.P. & CHIBBAR, R. (1992): Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) - a case study in *Brassica*. *Theor Appl Genet* 84: 990-994.

DEMESURE, B.; SODZI, N. & PETIT, R.J. (1995): A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol Ecol* 4: 129-131.

DEVEY, M.E.; BELL, J.C.; SMITH, D.N.; NEALE, D.B. & MORAN, G.F. (1996): A genetic map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 92: 673-679.

DHILLON, S.S. (1987): DNA in tree species. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (Hrsg.): Cell and tissue culture in forestry, Vol. 1. General principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands. S. 298-313.

DIEFFENBACH, C.W.; DRAGON, E.A. & DVEKSLER, G.S. (1995): Setting up a PCR laboratory. In: DIEFFENBACH, C.W. & DVEKSLER, G.S. (Hrsg.): PCR primer - A laboratory manual. CSHL-Press. S. 7-16.

DIETRICH, H.P. & HEITZ, R. (2003): Entwicklung des Ernährungszustandes von Waldbäumen als Reaktion auf baumartenspezifische und äußere Einflussfaktoren (Standortbedingungen, Witterung, Umwelteinflüsse). BMBF-Verbundprojekt Konzept und Machbarkeitsstudie für die Integrierende Auswertung von Daten des Umweltmonitorings im Wald, Teilprojekt 7b; FKZ 0339985. Eberswalde.

DOYLE, J. (1991): DNA protocols for plants. In: HEWITT, G.M.; JOHNSTON, A.W.B. & YOUNG, J.P.W. (Hrsg.): Molecular techniques in taxonomy. NATO ASI Series, Vol. H 57. Berlin. S. 283-289.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. & Horton, L.H.B. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15.

ECHT, C.S. & NELSON, C.D. (1997): Linkage mapping and genome length in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Theor Appl Genet* 94: 1031-1037.

ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. (1990): High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl Acids Res* 18(13): 3739-3744.

ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. (1991): DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Applic* 1(1): 17-24.

ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. (1993): The fidelity of DNA polymerases used in the polymerase chain reactions. In: MCPHERSON, M.J.; QUIRKE, P. & TAYLOR, G.R. (Hrsg.): PCR - A practical approach. Oxford University Press, Oxford. S. 225-244.

EL-KASSABY, Y.A. (1991): Genetic variation within and among conifer populations - Review and evaluation of methods. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M.E.; CANNATA, F. & HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SBP Scientific Publishing, The Hague. S. 61-76.

ELLSWORTH, D.L.; RITTENHOUSE, K.D. & HONEYCUTT, R.L. (1993): Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14: 214-217.

ENGLER, A. (1903): Die Spitzfichten, ihre Entstehung und Bedeutung. *Schweiz Z Forstw* 1: 7-12.

ERLICH, H.A.; GELFAND, D.H. & SNINSKY, J.J. (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUS, J.L. & WOLFE, A.D. (1999): Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri ssp. insperata* (Poaceae) – Comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol Ecol* 8: 443-451.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 136: 343-359.

FAENSEN-THIEBES, A.; KALHOFF, M.; MEYER, G.; MARKAN, K. & DARIUS, F. (1999): Gibt es im Berliner Raum durch Ozon bedingte sichtbare Schäden an Kiefernnadeln? Ergebnisse aus langjährigen Nadelbonituren

und gezielter Ozonbegasungen - Arbeitspapier der Berliner Level II-Arbeitsgruppe (1999). 22 Seiten.

FALKENHAGEN, E.R. (1985): Isozyme studies in provenance research of forest trees. *Theor Appl Genet* 69(4): 335-347.

FELSENSTEIN, J. (1995): PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Release 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

FERNANDO, P.; EVANS, B.J.; MORALES, J.C. & MELNICK, D.J. (2001): Electrophoretical artefacts – a previously unrecognized cause of error in microsatellite analysis. *Mol Ecol Notes* 1: 325-328.

FINESCHI, S.; MALVOLTI, M.E.; CANNATA, F. & HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SBP Scientific Publishing, The Hague.

FINKELDEY, R. (1992): Auswahlkriterien und Anlage genetischer Ressourcen bei der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.). *Forstarchiv* 63: 25-32.

FINKELDEY, R. (1995): Homogeneity of pollen allele frequencies of single seed trees in *Picea abies* (L.) Karst. plantations. *Heredity* 74: 451-463.

FIRBAS, F. (1949): Spät- und nacheiszeitliche Waldgeschichte Mitteleuropas nördlich der Alpen - 1. Allgemeine Waldgeschichte. Jena. 480 Seiten.

FORREST, G.I. (1994): Biochemical markers in tree improvement programmes. *Forestry Abstracts* 55: 123-153.

FOURRÉ, J.-L.; BERGER, P.; NIQUET, L. & ANDRÉ, P. (1997): Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce - Morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor Appl Genet* 94: 159-169.

FRANKE, A. & KONNERT, M. (1990): Nachkommenschaftsprüfung von Fichtenbeständen des Schwarzwaldes (Herkunftsgebiete 840 08 und 840 09) mit den Zielen: 1) Verbesserung der Immissionstoleranz, 2) Erhaltung der Genressourcen geschädigter Hochlagenbestände („Genbank“). Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Kfk-PEF 60.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D. & BURDON, J.J. (1995): The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge. 113 Seiten.

FRÖHLICH, H.J. (1959): Beobachtungen an Fichtentypen. *Allg Forstz* 14: 194-195.

FRÖHLICH, H.J. (1969): Untersuchungen über Benadelungsverhältnisse an Fichten. *Theor Appl Genet* 39: 214-231.

FURMAN, B.J.; GRATTAPAGLIA, D.; DVORAK, W.S. & O'MALLEY, D.M. (1997): Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Mol Ecol* 4: 321-332.

GALLOIS, A.; AUDRAN, J.C. & BURRUS, M.. (1998): Assessment of genetic relationships and population discrimination among *Fagus sylvatica* L. by RAPD. *Theor Appl Genet* 97(1-2): 211-219.

GÄRTNER, G.; WOLF, H. & BRAUN, H. (1996): Untersuchungen zur genetischen Struktur der autochthonen Fichtenpopulationen Carlsfeld im Erzgebirge und ihrer Nachkommenschaften als Grundlage zur Beurteilung der Effektivität von Generhaltungsmaßnahmen. *Silvae Genetica* 45(5-6): 294-301.

GEBUREK, T. & THURNER, G. (1993): Verändert sich der Genpool von Waldbeständen durch forstwirtschaftliche Maßnahmen? *Cbl f d ges Forstwesen* 110: 49-62.

GEBUREK, T. & VON WUEHLISCH, G. (1989): Linkage analysis of isozyme gene loci in *Picea abies* (L.) Karst. *Heredity* 62: 185-191.

GEBUREK, T. (1988): Untersuchungen über genetisch-ökologische Auswirkungen simultaner Immissionsbelastungen des Spross- und Wurzelsystems der Baumart Fichte. In: Umwelt-forschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Hrsg.): Vorhaben Waldschäden, Luftverunreinigungen. F&E-Vorhaben 10607046/24, Abschlussbericht. Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg.

GEBUREK, T. (1997): Isoenzymes and DNA markers in gene conservation of forest trees. *Biodiversity and Conservation* 6: 1639-1654.

GEBUREK, T.; MOTTINGER-KROUPA, S.; MORGANTE, M. & BURG, K. (1998): Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Austria. II – Microspatial patterns derived from nuclear sequence tagged microsatellite sites. *Forest Genetics* 5: 231-237.

GELFAND, D.H. & WHITE, T.J. (1990): Thermostable DNA polymerases. In: INNIS, M.A.; GELFAND , D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (Hrsg.): PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego. S. 129-141.

GIANNINI, R.; MORGANTE, M. & VENDRAMIN, G.G. (1991a): Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genetica* 40(3-4): 160-166.

GIANNINI, R.; MORGANTE, M. & VENDRAMIN, G.G. (1991b): A putative gene duplication in Norway spruce for 6PGD and its phylogenetic implications. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M.E.; CANNATA, F. & HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SBP Scientific Publishing, The Hague. S. 23-29.

GILLET, E. (1993): Genmarker als Entscheidungshilfen für die Genkonservierung. 1. Zweckdienliche Auswahl von Markertypen. *Allg Forst- u J-Ztg* 164: 30-35.

GILLET, E.M. (Hrsg.) (1999): Which DNA marker for which purpose?. Final Compendium of the Research Project "Development, optimisation and validation of melecular tools for assessment of biodiversity in forest trees" in the European Union DGXII, Biotechnology FW IV Research Programme "Molecular tools for biodiversity". Göttingen.

GLAUBITZ, C. & MORAN, G. (2000): Genetic tools – The use of biochemical and molecular markers. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D. & BOYLE, T. (Hrsg.): Forest conservation genetics – Principles and practice. CSIRO Publ., Collingwood, CABI Publ., Wallingford. S. 39-59.

GÖÇMEN, B.; JERMSTAD, K.B.; NEALE, D.B. & KAYA, Z. (1996): Development of random amplified polymorphic DNA markers of genetic mapping in Pacific yew (*Taxus brevifolia*). *Can J For Res* 26(3): 497-503.

GOLDSTEIN, D.B. & SCHLÖTTERER, C. (1999): Microsatellites – Evolution and applications. Oxford University Press, Oxford. 352 Seiten.

GOLDSTEIN, D.B.; LINARES, A.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L. & FELDMAN, M.W. (1995): An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.

GÖMÖRY, D. & PAULE, L. (1993): Isozyme polymorphism in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) from Slovak Carpathians. In: RONE, V. (Hrsg.): Norway spruce provenances and breeding. Mezzinatne 3(36): 60-67.

GÖMÖRY, D. (1992): Isozyme polymorphisms of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) in Slovakia - 2. Population disequilibrium and genetic diversity at mature Norway spruce stands. Acta Facultatis Forestalis, Zvolen 34: 87-93.

GONCHARENKO, G.G. & POTENKO, V (1990): Genetic diversity and differentiation in populations of Norway spruce Picea abies (L. Karst. from Ukraine, Byelorussia and Latvia. *Proc Acad Sci USSR* 314: 492-496.

GONCHARENKO, G.G. & POTENKO, V (1991): The parameters of genetic diversity and differentiation in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.) populations. *Genetika* 27: 1759-1772.

GONCHARENKO, G.G.; POTENKO, V.; ZADEIKA, I.V. & BIRGELIS, J.J. (1993): Isozyme structure of Norway spruce stands in Latvia. In: RONE, V. (Hrsg.): Norway spruce provenances and breeding. Mezzinatne 3(36): 50-59.

GONCHARENKO, G.G.; ZADEIKA, I.V. & BIRGELIS, J.J. (1995): Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations of Latvia. *For Ecol Manage* 72: 31-38.

GOODWIN, I.D.; AITKEN, E.A.B. & SMITH, L.W. (1997): Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528

GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DE MEEUS, T. & ROUSSET, F. (1996): Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1933-1940.

GOVINDARAJU, R. & CULLIS, C. (1991): Modulation in genome size in plants – the influence in breeding system and neighbourhood size. Evol Trends Plants 5: 43-51.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J.; WILCOX, P.; MCCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; MCKEAND, S.; BRIDGEWATER, F.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D. & SEDEROFF, R. (1992): Mapping in woody plants with RAPD markers – application to breeding in forestry and horticulture. In: Anonymus (Hrsg.): Applications of RAPD technology to plant breeding: Proc Joint Plant Breed Symp Series. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science, and American Genetic Association. 1. November 1992, Minneapolis, Minnesota. S. 37-40.

GREGORIUS, H.-R. & ROBERDS, J.H. (1986): Measurement of genetical differentiation among subpopulations. *Theor Appl Genet* 71: 826-834.

GREGORIUS, H.-R. (1974): Genetischer Abstand zwischen Populationen - 1. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica* 23(1-3): 22-27.

GREGORIUS, H.-R. (1977): Some fundamental relationships between genetic and genotypic multiplicities in diploid populations. *Math Biosci* 34: 267-277.

GREGORIUS, H.-R. (1980): The probability of loosing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics* 36: 643-652.

GREGORIUS, H.-R. (1987): The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor Appl Genet* 74: 397-401.

GREGORIUS, H.-R. (1988): The meaning of genetic variation within and between subpopulations. *Theor Appl Genet* 76: 947-951.

GREGORIUS, H.-R. (1991): On the concept of effective number. *Theor Pop Biol* 40: 269-283.

GRILL, D.; HOLZER, K. & ESTERBAUER, H. (1985): Untersuchungen zur Variabilität des Peroxidase-Isoenzymmusters der Fichte und deren Brauchbarkeit für genetische Studien. *Angewandte Botanik* 59: 233-237.

GRIVET, D.; JEANDROZ, S. & FAVRE, J.M. (1999): Nad1 b/c intron polymorphism reveals maternal inheritance of the mitochondrial genome in *Picea abies*. *Theor Appl Genet* 99: 346-349.

GRUBER, F. (1993): Verzweigungssystem, Benadelung und Nadelfall der Fichte (*Picea abies*). Contributiones biologiae arborum Nr. 3. Ecomed, Weinheim.

GUGERLI, F.; SPERISEN, C.; BÜCHLER, U.; MAGNI, F.; GEBUREK, T.; JEANDROZ, S. & SENN, J. (2001): Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Mol Ecol* 10(5): 1255-1263.

GUILLEMAUT, P. & MARECHAL-DROUARD, L. (1992). Plant DNA isolation - a fast, inexpensive and reliable method. *Plant Mol Biol Rep* 10: 60-65.

GULLBERG, V.; YAZDANI, R.; RUDIN, D. & RYMAN, N. (1985): Allozyme variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Sweden. *Silvae Genetica* 34: 193-201.

GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J. & OWEN, J.L. (1994): Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998-1006.

GUSTAFSON, C.E.; ALM, R.A. & TRUST, T.J. (1993): Effect of heat denaturation of target DNA on the PCR amplification. *Gene* 123: 241-244.

HADRYS, H.; BALICK, M. & SCHIERWATER, B. (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1: 55-63.

HAGEN-MANN, K. & MANN, W. (1990): Polymerase Chain Reaction. *Biologie in unserer Zeit* 20: 257-262.

HALBWACHS, G. & ARNDT, U. (1991): Möglichkeiten und Grenzen der Bioindikation. *VDI-Berichte* 901: 7-15.

HALLDÉN, C.; NILSSON, N.O.; RADING, I.M. & SÄLL, T. (1994): Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor Appl Genet* 88: 123-128.

HAMRICK, J.L. & GODT, M.J.W. (1989): Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L. & WEIR, B.S. (Hrsg.): Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Sinauer Associates, Sunderland, MA. S. 43-63.

HAMRICK, J.L. (1979): Genetic variation and longevity. In: SOLBRIG, O.T.; JAIN, S. & RAVEN, P.H. (Hrsg.): Plant Population Biology. Columbia University Press, New York. S. 84-113.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. & SHERMAN-BROYLES, S.L. (1992): Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.

HAMRICK, J.L.; MITTON, J.B. & LINHART, Y. B. (1981): Levels of genetic variation in trees – the influence of life history characteristics. In: CONKLE, M.T. (Hrsg.): Proceedings of the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects. USDA For Serv Gen Tech Rep. PSW-48. S. 35-41.

HANHART-ROESCH, R. & KLEINSCHMIT, J. (1991): Austriebsverhalten von Fichtenklonen (*Picea abies* (L.) Karst.) in unterschiedlichen geographischen Gebieten. *Allg Forst- u J-Ztg* 162(2): 25-28.

HANKE, M. (1992): Die Polymerase Kettenreaktion in Molekularbiologie und Medizin. *Bioforum* 10: 348-351.

HANSSON, B. & WESTERBERG, L. (2002): On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol Ecol* 11:2467-2474.

HANTGE, A. (1992): Eignung der Isoenzymmuster von Peroxidase, Superoxid-Dismutase und Saurer Phosphatase aus Nadeln der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) zur Indikation von Schadstoffeinflüssen. Forstliche Forschungsberichte München, Nr. 118. München.

HARTL, D.L. & CLARK, A.G. (1997): Principles of population genetics. 3. Aufl., Sinauer, Sunderland. 542 Seiten.

HATTEMER, H.H. & ZIEHE, M. (1987): Genetische Grundlagen der Resistenz gegenüber Umweltschäden. *Allg Forst- u J-Ztg* 158: 169-174.

HATTEMER, H.H. (1991): Genetic analysis and population genetics. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M.E.; CANNATA, F. & HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SBP Scientific Publishing, The Hague. S. 5-22.

HATTEMER, H.H.; BERGMANN, F. & ZIEHE M. (1993): Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. 2. Aufl. J.D. Sauerländer's, Frankfurt am Main.

HE, Q.; VILJANEN, M.K. & MERTSOLA, J. (1994): Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular and Cellular Probes* 8: 155-160.

HEDRICK, P. (1992): Shooting the RAPDs. *Nature* 355: 679-680.

HEDRICK, P.W: (1999): Genetics of populations. Jones & Bartlett Publ., London.

HEIKINHEIMO, O. (1920): Über die Fichtenformen und ihren forstwirtschaftlichen Wert. *Commun Inst Quaest Forest Finl* 2: 1-102.

HEINZE, B. & SCHMIDT, J. (1995): Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica* 85(1-3): 341-345.

HEINZE, B.; WESTCOTT, R.; SCHMIDT, J. & GLOSSL, G. (1996): Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genetic variation in Norway spruce. *New Forests* 11(2): 173-184.

HIPKINS, V.D.; KRUTOVSKII, K.V. & STRAUSS, S.H. (1994): Organelle genomes in conifers – structure, evolution and diversity. *For Genet* 1: 179-189.

HOFFMANN, J. (1959): Untersuchungen über das Wachstum der Fichte auf einigen Standortsformen des südöstlichen Thüringer Waldes. *Arch Forstwes* 8: 131-141.

HOLZER, K. (1967): Das Wachstum des Baumes in seiner Anpassung an zunehmende Seehöhe. *Mitt Forstl Bundesvers Anst Wien* 75: 427-456.

HOLZER, K. (1975): Zur Identifizierung von Fichtenherkünften (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genetica* 24(5-6): 169-175.

HOLZER, K. (1982): Entwicklung der forstlichen Saatgutgesetzgebung im Zusammenhang mit der Herkunftsfrage. In: Forum Genetik-Wald-Forstwirtschaft, Bericht der 2. Arbeitstagung, Institut für Forstgenetik, Forstpflanzenzüchtung und Forstliche Biometrie, Universität Göttingen. S. 77-80.

HOLZER, K.; OHENE-COFFIE, F. & SCHULTZE, U. (1991): Vegetative Vermehrung der Fichte für Hochlagenaufforstungen - physiologische und phänologische Probleme der Anpassung. FBVA-Berichte Wien, Nr. 59. 73 Seiten.

HOSIUS, B. & BERGMANN, F. (1993): Adaptation of Norway spruce to heavy metal contaminated soils. In: RONE, V. (Hrsg.): Norway spruce provenances and breeding. Latvian Forestry Research Station 'Silava', Mezzinatne N3 (36), Riga. S. 200-207.

HOSIUS, B. (1994): Auswirkungen von Schwermetallstress auf die genetischen Strukturen verschiedener Fichtenprovenienzen. Göttinger Forstgenetische Berichte Nr. 17. Göttingen. 27 Seiten.

HOSIUS, B.; BERGMANN, F. & HATTEMER, H.H. (1996a): Physiologische und genetische Anpassung von Fichtensämlingen verschiedener Provenienz an schwermetallkontaminierte Böden. *Forstarchiv* 67: 108-114.

HOSIUS, B.; HENKEL, W. & BERGMANN, F. (1996b): Erkennung von Verstößen gegen des Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut. *AFZ* 52: 1450-1451.

HUFF, D.R.; PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. (1993): RAPD variation within an among natural populations of outcrossing buffalo grass (*Buchloe dactyloides* [Nutt.] Engelm.). *Theor Appl Genet* 86: 927-934.

HUI LIU, B.; KNAPP, S.J. & BIRKES, D. (1997): Sampling distributions, biases, variances, and confidence intervals for genetic correlations. *Theor Appl Genet* 94: 8-19.

HUMMEL, M. (1992): Die Polymerase Ketten-Reaktion in der modernen Diagnostik - Möglichkeiten und Grenzen. *Bioforum* 11: 395-400.

HUNTLEY, B. & BIRKS, H. (1983): An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.

HURME, P. & SAVOLAINEN, O. (1999): Comparison of homology and linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers between individual trees of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Mol Ecol* 1: 15-22.

HUSS, J. (1998): Die Fichte in den deutschen Bundesländern – Anbaugeschichte, standörtliche Präferenzen, Bedeutung. *AFZ* 8: 414-419.

INNIS, M.A. & GELFAND , D.H (1990): Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A.; GELFAND , D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (Hrsg.): PCR protocols - A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. S. 3-12.

IPSEN, A.; KASTEN, B.; SCHOLZ, F. & ZIEGENHAGEN, B. (1998): Studying allelic diversity and stress response of PEPC (Phosphoenolpyruvate Carboxylase) in Norway spruce (*Picea abies*). *Chemosphere* 36(4-5): 825-828.

IQBAL, M.J.; AZIZ, N.; SAEED, N.A.; ZAFAR, Y. & MALIK, K.A. (1997): Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 94: 139-144.

ISABEL, N.; BEAULIEU, J. & BOUSQUET, J. (1995): Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6369-6373.

ISABEL, N.; TREMBLAY, L.; MICHAUD, M.; TREMBLAY, F.M. & BOUSQUET, J. (1993): RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theor Appl Genet* 86: 81-87.

JAIN, S.K. & BRADSHAW, A.D. (1966): Evolutionary divergence among adjacent plant populations. *Heredity* 21: 407-411.

JARAMILLO-CORREA, J.P.; BOUSQUET, J.; BEAULIEU, J.; ISABEL, N.; PERRON, M. & BOUILLÉ, M. (2003): Cross-species amplification of mitochondrial DNA sequence-tagged-site markers in conifers – the nature of polymorphism and variation within and among species in *Picea*. *Theor Appl Genet* 106: 1353-1367.

JARNE, P. & LAGODA, J.L. (1996): Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.

JEANDROZ, S.; BASTIEN, D.; CHANDELIER, A.; DU JARDIN, P. & FAVRE, J.M. (2002): A set of primers for amplification of mitochondrial DNA in *Picea abies* and other conifer species. *Mol Ecol Notes* 2: 389-392.

JERMSTAD, K.D.; BASSONI, D.L.; WHEELER, N.C. & NEALE, D.B. (1998): A sex-averaged genetic linkage map in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco var. ‚menziesii') based on RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 97: 762-770.

JERMSTAD, K.D.; REEM, A.M.; HENIFIN, J.R.; WHEELER, N.C. & NEALE, D.B. (1994): Inheritance of restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs in coastal Douglas-fir. *Theor Appl Genet* 89: 758-766.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J. & CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; VAN DE WEIL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATHHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHNEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A. & KARP, A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breeding* 3: 381-390.

JORDE, P.E.; PALM, S. & RYMAN, N. (1999): Estimating genetic drift and effective population size from temporal shifts in dominant gene marker frequencies. *Mol Ecol* 8: 1171-1178.

KALINOWSKI, S.T. (2002): Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Mol Ecol* 11: 1263-1273.

KANTETY, R.V.; ZENG, X.P.; BENNETZEN, J.L. & ZEHR, B.E. (1995): Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol Breeding* 1: 365-373.

KARP, A.; ISAAC, P. & INGRAM, D. (1998): Molecular tools for screening biodiversity – Plants and animals. Chapman & Hall. London.

KARVONEN, P.; SZMIDT, A.E. & SAVOLAINEN, O. (1994): Length variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Picea abies* and related species. *Theor Appl Genet* 89: 969-974.

KAYA, Z. & NEALE, D.B. (1993): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymorphisms in *Pinus nigra* subsp. Pallasiana and *Pinus brutia*. *Tr J Agr For* 17: 295-306.

KAYA, Z. & NEALE, D.B. (1995): Utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.). *Silvae Genetica* 44: 110-116.

KHASA, P.D. & DANCIK, B.P. (1996): Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 92(1): 46-52.

KHOSHOO, T.N. (1961): Chromosome numbers in gymnosperms. *Silvae Genetica* 10: 1-9.

KIELLANDER, C.L. (1950): Polyploidy in *Picea abies*. *Hereditas* 36: 513-516.

KIM, Z.S. (1979): Inheritance of leucine aminopeptidase isoenzymes in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica* 28: 68-71.

KIM, Z.S. (1985): Viability selection at an allozyme locus during development in european beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica* 34(4/5). 181-186.

KIMURA, M. & CROW, J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

KLEIN, R. & PAULUS, M. (1997): Biometric sample characterization. Part II: The relation between the size of needles and concentrations of airborne pollutants. *Chemosphere* 34 (9/10): 2015-2021.

KLEIN, R. & PAULUS, M. (Hrsg.) (1995): Umweltproben für die Schadstoffanalytik im Biomonitoring. Gustav Fischer Verlag, Jena. 365 Seiten.

KLEIN, R.; PAULUS, M.; WAGNER, G. & MÜLLER, P. (1994): Biomonitoring und Umweltprobenbank – 1. Das ökologische Rahmenkonzept zur Qualitätssicherung in der Umweltprobenbank des Bundes. *UWSF – Z Umweltchem Ökotox* 6(4): 223-231.

KLEINSCHMIT, J. (1995): Practical implications of the Forest Genetic Resources Program in Germany. *Silvae Genetica* 44(5-6): 269-274.

KLEINSCHMIT, J.; LUNDERSTÄDT, J. & SVOLBA, J. (1981a): Charakterisierung von Fichtenklonen (*Picea abies* Karst.) mit Hilfe morphologischer, physiologischer und biochemischer Merkmale (III.). *Silvae Genetica* 30(4-5): 122-127.

KLEINSCHMIT, J.; SAUER-STEGMANN, A.; LUNDERSTÄDT, J & SVOLBA, J. (1981b): Charakterisierung von Fichtenklonen (*Picea abies* Karst.) – 2. Korrelation der Merkmale. *Silvae Genetica* 30(2-3): 74-81.

KLOTZ, K. (1958): Die waldbaulichen Folgerungen aus den neuesten Forschungsergebnissen über die Fichte. *Allg Forstz* 13: 760-763.

KLOTZ, K. (1959): Neue Forschungsergebnisse über die Fichte und ihre waldbaulichen Folgerungen. *Allg Forstztg* 70: 4-7.

KNABE, W. (1981): Immissionsökologische Waldzustandserfassung in Nordrhein-Westfalen. *AFZ/Wald* 26: 641-643.

KNABE, W. (1982): Monitoring of air pollutants by wild life plants and plant exposure – suitable bioindicators for different immissions types. In: STEUBING, L. & JÄGER, H.J. (Hrsg.): Monitoring of Air Pollutants by Plants - Methods and Problems. S. 59-72. The Hague, Boston, London.

KNIPPERS, R. (1997): Molekulare Genetik. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart.

KÖHLER, R. (1952): Erste Entwicklung der Fichtenkultur im Harz. *Forst- und Holz* 7: 139.

KOJIMA, T.; NAGAOKA, T.; NODA, K. & OGIHARA, Y. (1998): Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor Appl Genet* 96: 37-45.

KOLLER, B.; LEHMANN, A.; MCDERMOTT, J.M. & GESSLER, C. (1993): Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85: 901-904.

KONNERT, M. & FRANKE, A. (1990): Nachkommenschaftsprüfung und Generhaltung von Fichtenbeständen im Schwarzwald. In: HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Erhaltung forstlicher Genressourcen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt 98. S. 165-177.

KONNERT, M. & FRANKE, A. (1991): Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald - Genetische Differenzierung von Beständen. *Allg Forst- u J-Ztg* 162(5-6): 100-106.

KONNERT, M. (1991a): Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald - Genetische Variation und Korrelationen. *Forstw Cbl* 110(1): 84-94.

KONNERT, M. (1991b): Vergleich der genetischen Struktur verschiedener Generationen zweier natürlich verjüngter Fichtenbestände des Schwarzwaldes. *Silvae Genetica* 40(2):60-65.

KÖPPEN, F.T. (1889): Die geographische Verbreitung der Holzgewächse des europäischen Russlands und des Kaukasus. Petersburg.

KOSTIA, S.; VARVIO, S.L.; VAKKARI, P. & PULKKINEN, P. (1995): Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. *Genome* 38: 1244-1248.

KRAFT, G. (1884): Beiträge zur Lehre von den Durchforstungen, Schlagstellungen und Lichtungshieben. Klindsworth's. Hannover.

KRAJ, W. (2002): The estimation of genetic variation within and between Polish provenances of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) on the basis pf RAPD polymorphism. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities – Forestry* 5(2).

KRAUSS, S.L. (2000): Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length (AFLP) markers. *Mol Ecol* 9: 1241-1245.

KRAWCZAK, M. & SCHMIDTKE, J. (1994). DNA-Fingerprinting. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Berlin, Oxford.

KREIKE, J.; BURG, K.; ZECHMEISTER, M.; HAIDER, T. & GLÖSSL, J. (1991): DNA-Fingerprint and RFLP analysis as tools to study genetic diversity in populations of fir, spruce and oak. In: MÜLLER-STARCK, G. & ZIEHE, M. (Hrsg.): Genetic variation in European populations of forest trees. J.D. Sauerländers Verlag, Frankfurt. S. 95-107.

KRESOVICH, S, WILLIAMS, J.G.K.; MCFERSON, J.R.; ROUTMAN, E.J. & SCHAAL, B.A. (1992): Characterization of genetic identities and relationshps of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet* 85: 190-196.

KRÜSSMANN, G. (1983): Handbuch der Nadelgehölze. 2. neubearb. Aufl., Parey, Hamburg. 396 Seiten.

KRUTOVSKII, K.V. & BERGMANN, F. (1993): Genetic variation of Norway and Siberian spruce species and their zone of introgressive hybridization studied by isozyme loci. In: RONE, V. (Hrsg.): Norway spruce provenances and breeding. Latvian Forestry Research Station 'Silava', Mezzinatne N3 (36), Riga. S.93-99.

KRUTOVSKII, K.V. & BERGMANN, F. (1995): Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity* 74: 464-480.

KRUTOVSKII, K.V.; VOLLMER, S.S.; SORENSEN, F.C.; ADAMS, W.T. & STRAUSS, S.H. (1996): Comparative genome mapping in inter-racial hybrids of Douglas-fir using RAPD markers. SRIEG workshop - Novel applications of molecular markers in forest trees. Houston, 23-26 Juni 1996. P#30

KRUTOVSKII, K.V.; VOLLMER, S.S.; SORENSEN, F.C.; ADAMS, W.T.; KNAPP, S.J. & STRAUSS, S.H. (1998): RAPD genome map of Douglas-fir. *J Hered* 89: 197-205.

KRUTZSCH, P. (1974): The IUFRO 1964/68 Provenance test with Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genetica* 23: 58-62.

KUBISIAK, T.L.; NELSON, C.D.; NANCE, W.L. & STINE, M. (1995): RAPD linkage mapping in a longleaf pine x slash pine F1 family. *Theor Appl Genet* 90: 1110-1127.

KUBISIAK, T.L.; NELSON, C.D.; NANCE, W.L. & STINE, M. (1996): Comparison of RAPD linkage maps constructed for a single longleaf pine from both haploid and diploid mapping populations. *For Genet* 3: 203-211.

KULLMANN, L. & ENGELMARK, O. (1991): Historical biogeography of *Picea abies* (L.) Karst. at its subarctic limit in northern Sweden. *Journal of Biogeography* 18: 63-70.

KWOK, S. & HIGUCHI, R. (1989): Avoiding false positives with PCR - product review. *Nature* 339: 237-238.

KWOK, S. (1990): Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (Hrsg.): PCR Protocols - A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. S. 142-145.

KWOK, S.; KELLOGG, D.E.; MCKINNEY, N.; SPASIC, D.; GODA, L.; LEVENSON, C. & SNINSKY, J.J. (1990): Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction - Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl Acids Res* 18(4): 999-1005.

LAGERCRANTZ, U. & RYMAN, N. (1990): Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*) - concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* 44(1): 38-53.

LAGERCRANTZ, U.; RYMAN, N. & STAHL, G. (1988): Protein loci in diploid tissue of Norway spruce (*Picea abies* L.) - Description and interpretation of electrophoretic variability patterns. *Hereditas* 108: 149-158.

LAMBOY, W.F. (1994a): Computing genetic similarity coefficients from RAPD data – the effects of PCR artifacts. *PCR Methods Applic* 4: 31-37.

LAMBOY, W.F. (1994b): Computing genetic similarity coefficients from RAPD data – correcting for the effects of PCR artifacts caused by variation in experimental conditions. *PCR Methods Applic* 4: 38-43.

LANNÉR, C.; BRYNGELSSON, T. & GUSTAFSSON, M. (1996): Genetic validity of RAPD markers at the intra- and inter-specific level in wild *Brassica* species with n=9. *Theor Appl Genet* 93: 9-14.

LANZA, L.L.B.; DE SOUZA, C.L.; OTTOBONI, L.M.M.; VIEIRA, M.L.C. & DE SOUZA, A.P. (1997): Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94: 1023-1030.

LAROCHE, J.; LI, P.; MAGGIA, L. & BOUSQUET, J. (1997): Molecular evolution of angiosperm mitochondrial introns and exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5722-5727.

LEDEBOUR, C.F. (1833): Flora Altaica IV. Berlin. 301 Seiten.

LEHNER, A.; CAMPBELL, M.A.; WHEELER, N.C.; PÖYKKÖ, T; GLÖSSL, J.; KREIKE, J. & NEALE, D.B. (1995): Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. *pendula*). *Theor Appl Genet* 91: 1092-1094.

LEIBENGUTH, F. & SHOGHI, F. (1998): Analysis of random amplified polymorphic DNA markers in three conifer species. *Silvae Genetica* 47(2-3): 120-126.

LEONARDI, S.; RADDI, S. & BORGHETTI, S. (1996): Spatial autocorrelation of allozyme traits in a Norway spruce (*Picea abies*) population. *Can J For Res* 26(1): 63-71.

LEWANDOWSKI, A.; BURCZYK, J. & CHALUPKA, W. (1997): Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66(2): 197-200.

LEWIS, R.A.; PAULUS, M.; HORRAS, C. & KLEIN , B. (1989): Auswahl und Empfehlung von ökologischen Umweltbeobachtungsgebieten in der Bundesrepublik Deutschland. MaB-Mitteilungen, Band 29. Bonn.

LEWONTIN, R.C. (1972): The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6: 381-398.

LI, P. & ADAMS, W.T. (1989): Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Can J for Res* 19: 149-161.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A. & NEVO, E. (2002): Microsatellites – genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms; a review. *Mol Ecol* 11: 2453-2465.

LIESEBACH, M. (1994): Untersuchungen an ausgewählten Herkünften des internationalen Fichtenprovenienzversuches 1964/68 über den Zusammenhang zwischen Isoenzym-Merkmalen und morphologischen, phänologischen sowie Wachstums-Merkmalen. Dissertation, Univ. Hamburg.

LINDQUIST, B. (1948): The main varieties of *Picea abies* (L.) Karst. in Europe, with a contribution to theory of forest vegetation in Scandinavia during the last pleistocene glaciation. *Acta Horti Bergiani* 14: 249-342.

LU, M.-Z.; SZMIDT, A.E. & WANG, X.-R. (1994): Genetics of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in *Pinus sylvestris* (L.). *Hereditas* 121: 220.

LU, M.-Z.; SZMIDT, A.E. & WANG, X.-R. (1995): Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). *Heredity* 74: 582-589.

LU, M.-Z.; WANG, X.R. & SZMIDT, A.E. (1997): Molecular properties of RAPDs in *Pinus sylvestris* L. and their implications for genetic analysis. *For Genet* 4(4): 227-234.

LUNDKVIST, K. & RUDIN, D. (1977): Genetic variation in eleven populations of *Picea abies* as determined by isozyme analysis. *Hereditas* 85: 67-74.

LUNDKVIST, K. (1979): Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway Spruce (*Picea abies* K.). 1. Estimations of genetic variation within and among populations, genetic linkage and a mating system parameter. *Hereditas* 90: 127-143.

LUNT, D.H.; WHIPPLE, L.E. & HYMAN, B.C. (1998): Mitochondrial DNA variable number of tandem repeats (VNTR) – utility and problems in molecular ecology. *Mol Ecol* 7: 1441-1455.

LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3: 91-99.

LYNCH, M. (1988): Estimation of relatedness by DNA Fingerprinting. *Mol Biol Evol* 5: 584-599.

LYNCH, M. (1990): The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol* 7(5): 478-484.

LYNCH, M. (1991): Analysis of Population Genetic Structure by DNA Fingerprinting. In: BURKE, T.; DOLF, G.; JEFFREYS, A.J. & WOLFF, R. (Hrsg:): DNA Fingerprinting - Approaches and Applications. Birkhäuser Verlag, Basel. S. 113-126.

MAGGINI, F.; FREDIANI, M. & GELATI, M.T. (2000): Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Picea abies* Karst. *DNA Sequence* 11(1-2): 87-89.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1982): Molecular cloning – a laboratry manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 545 Seiten.

MANLY, B.F. (1994): Multivariate statistical methods. 2. Aufl., Chapman & Hall, London. 232 Seiten.

MARTIN, R. (1996): Elektrophorese von Nukleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

MATTIONI, C.; CASASOLI, M.; ONZALEZ, M.; IPINZA, R. & VILLANI, F. (2002): Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species. *Theor Appl Genet* DOI 10.1007/s00122-001-0824-x

MAYER, H. (1968): Zur waldbaulichen Beurteilung der Fichte in den Ostalpen. *Allg Forst- u J-Ztg* 140: 204-209 und 226-231.

MCCLELLAND, M. & WELSH, J. (1994): DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Applic* 4: S59-S64.

MCDERMOTT, J.M. & MCDONALD, B.A. (1993): Gene flow in plant pathosystems. *Ann Rev Phytopathol* 31: 353-373.

MCGREGOR, C.E.;LAMBERT, C.A.; GREYLING, M.M.; LOUW, J.H. & WARNICH, L. (2000): A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113: 135-144.

MCPHERSON, M.J.; ECKSTEIN, P.E.; SCOLES, G.J. & GAJADHAR, A.A. (1993): Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermocyclers and effects of primer and DNA. *Molecular and Cellular Probes* 7: 293-299.

MERKLE, S.A. & ADAMS, W.T. (1987): Patterns of allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in Southwest Oregon. *Can J For Res* 17: 402-407.

MEUNIER, J.R. & GRIMONT, P.A.D. (1993): Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 144: 373-379.

MEYER, H. (1959): Hochharzfichten für Ziele der Forstpflanzenzüchtung. *Forst- und Holzwirt* 14: 77-78.

MICHELI, M.R. & BOVA, R. (Hrsg.) (1997): Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Springer Verlag, Berlin. 441 Seiten.

MICHELI, M.R.; BOVA, R.; CALISSANO, P. & D'AMBROSIO, E. (1993): Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. *BioTechniques* 15: 388-390.

MICHELI, M.R.; BOVA, R.; RASCALE, E. & D'AMBROSIO, E. (1994): Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucl Acids Res* 22: 1921-1922.

MIKSCHE, J.P. (1985): Recent advances in biotechnology and forest trees. *The Forestry Chronicle* 61(5): 449-453.

MILLIGAN, B.G. (1992): Plant DNA isolation. In: HOELZEL, A.R. (Hrsg.): Molecular genetic analysis of populations - A practical approach. Oxford University Press, Oxford. S. 59-88.

Ministerium für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg (2002): Waldzustandsbericht 2002 der Länder Brandenburg und Berlin. Potsdam. 56 Seiten.

MITTON, J.B. (1983): Conifers. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. (Hrsg.): Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. S. 443-472.

MITTON, J.B. (1993): Theory and data pertinent to the relationship between heterozygosity and fitness. In: THORNHILL, N.W. (Hrsg.): The natural history of inbreeding and outbreeding. University of Chicago Press, Chicago. S. 17-41.

MITTON, J.B.; STUTZ, H.P.; SCHUSTER, W.S. & SHEA, K.L. (1989): Genotypic differentiation at PGM in Engelmann spruce from wet and dry sites. *Silvae Genetica* 38: 217-221.

MÖLLEKEN, H.; ECKSTEIN, D.; VENNE, H. & SCHOLZ, F. (1996): Growth of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) as controlled by genotype and environment. *Dendrochronologia* 12: 23-32.

MORGANTE, M. & OLIVIERI, A.M. (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3: 175-182.

MORGANTE, M. & VENDRAMIN, G.G. (1991): Genetic variation in Italian populations of *Picea abies* L. Karst. and *Pinus leucodermis* Ant. In: MÜLLER-STARCK, G. & ZIEHE, M. (Hrsg.): Genetic variation in European populations of forest trees. Sauerländers, Frankfurt. S. 205-227.

MORGANTE, M.; PFEIFFER, A.; COSTACURTA, A. & OLIVIERI, A.M. (1996): Molecular tools for population and ecological genetics in coniferous trees. *Phyton* (Horn) 36(4): 129-138.

MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G.G. & GIANNINI, R. (1989): Genetics of 6PGD and SKDH in Norway spruce (*Picea abies* Karst.). *Journal of Genetics and Breeding* 43: 67-71.

MORGANTE, M.; VENDRAMIN, G.G. & ROSSI, P. (1991): Effects of stand density on outcrossing rate in two Norway spruce (*Picea abies*) populations. *Can J Botany* 69(12): 2704-2708.

MORGENSTERN, E.K. (1997): Geographic variation in forest trees - Genetic basis and application of knowledge in silviculture. UBC Press, Canada.

MOSSELER, A.; EGGER, K.N. & HUGHES, G.A. (1992): Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified DNA markers. *Can J Forest Res* 22: 1332-1337.

MUHS, H.-J. (1996): Stand und Perspektiven der Gesetzgebung für das forstliche Saat- und Pflanzgut. In: MÜLLER-STARCK, G. (Hrsg.): Biodiversität und nachhaltige Forstwirtschaft. ecomed, Landsberg. S. 200-212.

MÜLLER, G. (1976): Einschätzung genetischer Verwandtschafts- und Inzuchtverhältnisse anhand von Pollen- und Samenverbreitung bei Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und Kiefer (*Pinus sylvestris*). Dissertation, Univ. Göttingen. Göttingen.

MÜLLER, G. (1977): Untersuchungen über die natürliche Selbstbefruchtung in Beständen der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica* 26: 207-217.

MÜLLER, P. & WAGNER, G. (1983): Probenahme und genetische Vergleichbarkeit (Probendefinition) von repräsentativen Umweltproben im Rahmen des Umweltprobenbank-Pilotprojektes, Forschungsbericht T 86-040, Technologische Forschung und Entwicklung, Bundesministerium für Forschung und Technologie. Bonn.

MÜLLER-STARCK, G. & SCHUBERT, R. (2000): Genetic markers as a tool for biondication in forest ecosystems. In: YOUNG, A.; BOSHER, D. & BOYLE, T. (Hrsg.): Forest conservation genetics – principles and practice. CABI Publ., Oxford. S. 227-237.

MÜLLER-STARCK, G. (1994): Die Bedeutung der genetischen Variation für die Anpassung gegenüber Umweltstress. *Schweiz Z Forstwes* 145(12): 977-997.

MÜLLER-STARCK, G. (1995a): Genetic variation in high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genetica* 44(5-6): 356-362.

MÜLLER-STARCK, G. (1995b): Protection of genetic variability in forest trees. *For Genet* 2(3): 121-124.

MÜLLER-STARCK, G. (1995c): Genetic variation under extreme environmental conditions. In: BARADAT, P.; ADAMS, W.T. & MÜLLER-STARCK, G. (Hrsg.): Population genetics and genetic conservation of forest trees. SPB Academic Publ., Amsterdam. S. 201-210.

MÜLLER-STARCK, G. (1998): Isozymes. In: KARP, A.; ISAAC, P. & INGRAM, D. (Hrsg.): Molecular tools for screening biodiversity – plants and animals. Chapman & Hall, London. S. 75-81.

MÜLLER-STARCK, G.; BARADAT, P.H. & BERGMANN, F. (1992): Genetic variation within European tree species. *New Forests* 6: 23-47.

MULLIS, K.B. & FALOONA, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155(21): 335-350.

MULLIS, K.B.; FERRÉ, F. & GIBBS, R.A. (Hrsg.) (1994): The polymerase chain reaction. Birkhäuser Verlag, Boston. 458 Seiten.

MUONA, O. (1989): Population genetics in forest tree improvement. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L. & WEIR, B.S. (Hrsg.): Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, USA. S. 282-298.

MUONA, O.; PAULE, L.; SZMIDT, A.E. & KÄRKKÄINEN, K. (1990): Mating system analysis in a central and a northern European population of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 5(1): 97-102.

MUONA, O.; YAZDANI, R. & LINDQVIST, G. (1987): Analysis of linkage in *Picea abies*. *Hereditas* 106: 31-36.

MURALIDHARAN, K. & WAKELAND, E.K. (1993): Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* 14: 362-364.

MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8(19): 4321-4325.

NAGEISKY, B. (1999): Identifizierung von Genen aus einer Elicitor-induzierten cDNS-Bibliothek der Gemeinen Fichte (*Picea abies* [L.] Karst.). Diplomarbeit, Forstliche Fakultät der Technischen Universität München-Weihenstephan. München.

NEALE, D. & WILLIAMS, C.G. (1991): Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. *Can J Forest Res* 21: 545-554.

NEALE, D.B. & HARRY, D.E. (1994): Genetic mapping in forest trees – RFLPs, RAPDs and beyond. *AgBiotech News Inf* 6: 107N-114N.

NEI, M. & LI, W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273.

NEI, M. (1972): Genetic distance between populations. *Am Nat* 106: 283-292.

NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321-3323.

NEI, M. (1987): Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 512 Seiten.

NELSON, C.D.; KUBISIAK, T.L.; STINE, M. & NANCE, W.L. (1994): A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNAs. *J Hered* 85: 433-439.

NELSON, C.D.; NANCE, W.L. & DOUDRICK, R.L. (1993): A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliotti* Engelmann var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. *Theor Appl Genet* 87: 145-151.

NESBITT, K.A.; POTTS, B.M. & VAILLANCOURT, R.E. (1995): Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity* 74(6): 628-637.

NEWTON, C.R. & GRAHAM, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford.

N'GORAN, J.A.K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M. & LANAUD, C. (1994): Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity* 73(2): 589-597.

Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (1996): Waldentwicklung Solling – Fachgutachten. Schriftenreihe Waldentwicklung in Niedersachsen, Heft 6. Hannover. 149 Seiten.

NKONGOLO, K.K. (1999): RAPD and cytological analysis of *Picea* spp. from different provenances – genomic relationship and taxa. *Hereditas* 130: 137-144.

NKONGOLO, K.K.; KLIMASZEWSKA, K. & GRATTON, W.S. (1998): DNA yields and optimization of RAPD patterns using spruce embryogenic lines, seedlings, and needles. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 1-9.

O'MALLEY, D.M. & WHETTEN, R. (1997): Molecular markers and forest trees. In: CAETANO-ANOLLÉES, G. & GRESSHOFF, P.M. (Hrsg.): DNA markers – Protocols, applications and overviews. John Wiley & Sons, New York. S. 237-257.

OELKERS, J. (1959): Klimaansprüche der Baumarten und Klimazahlen der nordwestdeutschen Landkreise. In: MÜLLER, R. (Hrsg.): Grundlagen der Forstwirtschaft. Scharper, Hannover. S. 836-843.

OHRI, D. & KHOSHOO, T.N. (1986): Genome size in gymnosperms. *Pl Syst Evol* 153: 119-131.

PAGE, R. (2001): TREEVIEW 1.66 - Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html

PAGLIA, G.P. & MORGANTE, M. (1998): PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Mol Breeding* 4: 173-177.

PAGLIA, G.P.; OLIVIERI, A.M. & MORGANTE, M. (1998): Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers – a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Mol Gen Genet* 258(5): 466-478.

PALMER, J.D.; ADAMS, K.L.; CHO, Y.; PARKINSON, L.; QIU, Y.L. & SONG, K. (2000): Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes – mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6960-6966.

PARK, Y-H. & KOHEL, R.J. (1994): Effect of concentration of $MgCl_2$ on random amplified DNA polymorphism. *BioTechniques* 16(4): 652-655.

PAULE, L.; LINDGREN, D. & YAZDANI, R. (1993): Allozyme frequencies, outcrossing rate and pollen contamination in *Picea abies* seed orchards. *Scand J For Res* 8(1): 8-17.

PAULE, L.; SZMIDT, A.E. & YAZDANI, R. (1990): Isozyme polymorphism of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) in Slovakia - Genetic structure of adjacent populations. *Acta Facultatis Forestalis Zvolen* 32: 57-70.

PAULUS, M., HORRAS, C., KLEIN, B. & LEWIS, R.A. (1990): Vertiefte Auswahl von Probenahmeregionen für die Umweltprobenbank und ökologische Beratung zu ihrem Betrieb. Umweltforschungsplan des

Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Abschlussbericht zum BMU-Forschungsvorhaben 10808001. Saarbrücken.

PAULUS, M.; KLEIN, R.; ZIMMER, M.; JACOB, J. & ROSSBACH, M. (1995): Biomonitoring und Umweltprobenbank – 1. Die Rolle der biometrischen Probencharakterisierung in der Umweltanalytik am Beispiel der Fichte (*Picea abies*). *UWSF – Z Umweltchem Ökotox* 6(4): 223-231.

PAULUS, M.; SPRENGART, J.; WÜST, R.; KLEIN, R.; WAGNER, G.; NENTWICH, K. & MÜLLER, P. (1997): Erstellung gebietsbezogener Probenahmepläne für die Probenahmegebiete der Umweltprobenbank des Bundes. Forschungsvorhaben FKZ 106 01 062 im Auftrag des Umweltbundesamtes, Berlin. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G. & MOTTO, M. (1998): Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet* 97: 1248-1255.

PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J. & FEDAK, G. (1993): Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Applic* 2: 341-345.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J. & DOMÍNGUEZ, A. (1998): An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol Ecol* 10: 1347-1358.

PERRON, M; GORDON, A.G. & BOUSQUET, J. (1995): Species-specific RAPD fingerprints for the closely related *Picea mariana and P. rubens*. *Theor Appl Genet* 91: 142-149.

PERRY, D.J. & BOUSQUET, J. (1998a): Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes - the utility of black spruce-derived STS primers in other conifers. *Theor Appl Genet* 97: 735-743.

PERRY, D.J. & BOUSQUET, J. (1998b): Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes - Development, characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics* 149: 1089-1098.

PFEIFFER, A.; OLIVIERI, A.-M.; MORGANTE, M (1997): Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 40(4): 411-419.

PFEIL, G. (1991): Vergleich genetischer Strukturen in elf Fichtenbeständen des Forstamtes Westerhof anhand von Isoenzym-Genloci. Diplomarbeit, Univ. Göttingen. Göttingen.

PHILIPPS, A. (1998): Das Plastom der Fichte (*Picea abies* L.) – Gene des Cytochrom b1tn6-f-Komplexes und des genetischen Systems. Diss, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

PLOMION, C. & O'MALLEY, D.M. (1996): Recombination rate differences for pollen parents and seed parents in pine. *Heredity* 77: 341-350.

PLOMION, C.; BAHRMAN, N.; DUREL, C.-E. & O'MALLEY, D.M. (1995a): Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74: 661-668.

PLOMION, C.; O'MALLEY, D.M. & DUREL, C.E. (1995b): Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*) comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. *Theor Appl Genet* 90: 1028-1034.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S. & RAFALSKI, A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.

PRAVDIN, L.F. (1975): Europäische Fichte und Sibirische Fichte in der UdSSR. Izdatel'stro Nauka, Moskau.

PREVOST, A. & WILKINSON, M.J. (1999): A new system of comparing PCR primners applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98:107-112.

PRIEHÄUSSER, G. (1956): Über den Formenkreis der Fichte in ursprünglichen Beständen des Bayrischen Waldes nach den Zapfen- und Zapfenschuppenformen. *Z f Forstgen Forstpflanzenz* 5: 14-22.

PRIEHÄUSSER, G. (1958): Die Fichten-Variationen und -Kombinationen des Bayer. Waldes nach phänotypischen Merkmalen mit Bestimmungsschlüssel. *Forstwiss Cbl* 77: 151-171.

PRIEHÄUSSER, G. (1959): Über die ursprünglichen Fichtenpopulationen des Bayer. Waldes. *AFZ* 14: 417-419.

PROVAN, J.; POWELL, W. & HOLLINGSWORTH, P. (2001): Chloroplast microsatellites – new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trens in Ecology and Evolution* 16: 142-146.

PRUS-GLOWACKI, W. & GODZIK, S. (1995): Genetic structure of *Picea abies* trees tolerant and sensitive to industrial pollution. *Silvae Genetica* 44(2-3): 62-65.

QUACK, M. (1998): Populationsgenetische Untersuchungen an Brassen (*Abramis brama* L.) aus der Elbe zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit jährlicher Probenahmen im passiven Biomonitoring. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes. Saarbrücken. 148 Seiten.

QUACK, M. (2001): Molekulargenetische Untersuchungen an ausgewählten Vorkommen von Buche (*Fagus sylvatica*) und Kiefer (*Pinus sylvestris*) zwecks genetischer Charakterisierung dieser Vorkommen sowie Erfassung ihrer genetischen Differenzierung. Forschungsvorhaben im Auftrag der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz (FAWF). Trippstadt. (unveröffentlicht)

RADDI, S.; STEFANINI, F.M.; CAMUSSI, A. & GIANNINI, R. (1994): Forest decline index and genetic variability in *Picea abies* (Karst.). *For Genet* 1(1) 33-40.

RAFALSKI, J.A. (1997): Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: CAETANO-ANOLLÉES, G. & GRESSHOFF, P.M. (Hrsg.): DNA markers – Protocols, applications and overviews. John Wiley & Sons, New York. S. 75-83.

RAFALSKI, J.A.; HANAFEY, M.K.; TINGEY, S.V. & WILLIAMS, J.G.K. (1993): Technology for molecular breeding – RAPD markers, microsatellites and machines. *Trends Genet* 9: 275-278.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. & WILLIAMS, J.G.K. (1991): RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News Info* 3(4): 645-648.

RAMECKERS, J.; HUMMEL, S. & HERRMANN, B. (1997): How many cycles does a PCR need? Determinations of cycle numbers depending on the number of targets and the reaction efficiency factor. *Naturwissenschaften* 84: 259-262.

RAU, H.-M. & BROCKHAUS, R. (1995): Neue Verordnung über Herkunftsgebiete für forstliches Vermehrungsgut. *AFZ* 6: 315-319.

REISS, J.; KRAWCAK, M.; SCHLOESSER, M.; WAGNER, M. & COOPER, D.N. (1990): The effect of replication errors on the mismatch analysis of PCR-amplified DNA. *Nucl Acids Res* 18(4): 973-978.

RIEGEL, R. (2001): Entwicklung molekulargenetischer Marker bei der Fichte (Picea abies (L.) Karst.) und deren Anwendung für genetische Erhebungen in umweltbelasteten Populationen. Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan. München.

RIESEBERG, L.H. & SOLTIS, D.E. (1991): Phytogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5: 65-84.

RIESEBERG, L.H. (1996): Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol* 5: 99-105.

RITLAND, K. (2002): Estimation of gene frequency and heterozygosity from pooled samples. *Mol Ecol* 2: 370-372.

RÖHLE, H. (1995): Zum Wachstum der Fichte auf Hochleistungsstandorten in Südbayern. Mitteilungen aus der Staatsforstverwaltung Bayerns, Band 48. München.

ROHMEDER, E. (1972): Das Saatgut in der Forstwirtschaft. Paul Paray, Hamburg. 273 Seiten

ROOSEN, J.W. (1959): Beobachtungen an Fichtentypen. *Allg Forstz* 14: 80.

ROSSBACH, M. & JAYASEKERA, R. (1996): Air pollution monitoring at the Environmental Specimen Bank of Germany - spruce and pine shoots as bioindicators. *Fresenius J Anal Chem* 354 (5-6): 511-514.

ROTHE, G.M. (1988): Möglichkeiten und Grenzen von Isoenzymanalysen zur Ermittlung der genetischen Konstitution von Waldbäumen. *AFZ* 43: 1336-1338.

ROTHE, G.M. (1990): Identifizierung von Fichtenklonen durch Isoenzymanalysen an Nadeln. *Allg Forst- u J-Ztg* 161(5): 103-107.

ROUX, K.H. (1995): Optimization and troubleshooting in PCR. In: DIEFFENBACH, C.W. & DVEKSLER, G.S. (Hrsg.): PCR Primer - A laboratory manual. CSHL-Press. S. 53-62.

ROY, A.; FRASCARIA, N.; MACKAY, J. & BOUSQUET, J. (1992): Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor Appl Genet* 85: 173-180.

ROZENBERG, P. & CAHALAN, C. (1997): Spruce and wood quality – genetic aspects (a review). *Silvae Genetica* 46(5): 270-279.

RUBNER, K. (1936): Beitrag zur Kenntnis der Fichtenformen und Fichtenrassen – Teil 1. *Thar Forstl Jber* 87: 101-176.

RUBNER, K. (1939): Beitrag zur Kenntnis der Fichtenformen und Fichtenrassen – Teil 2. *Thar Forstl Jber* 90: 883-915.

RUBNER, K. (1941): Beitrag zur Kenntnis der Fichtenformen und Fichtenrassen – Teil 3. *Thar Forstl Jber* 92: 526-545.

RUBNER, K. (1943): Die praktische Bedeutung unserer Fichtentypen. *Forstwiss Cbl; Thar Forstl Jber* 65: 233-247.

RUBNER, K. (1957): Der Aufbau der Fichtenkrone in höheren Gebirgslagen . *Holz-Zbl.* 83: 1460-1462.

RUETZ, W.F. & BERGMANN, F. (1988): Möglichkeiten der Identifizierung autochthoner Hochlagenbestände der Fichte. Forum Genetik-Wald-Forstwirtschaft. FBVA-Berichte. Schriftenreihe der Forstlichen Bundesversuchsanstalt 28. S. 173-177.

RUETZ, W.F. & BERGMANN, F. (1989): Möglichkeiten zum Nachweis von autochthonen Hochlagenbeständen der Fichte (*Picea abies*) in den Berchtesgadener Alpen. *Forstw Cbl* 108: 164-174.

RUETZ, W.F. (1992): Einsatz biochemischer Differenzierungsverfahren bei waldbaulichen Entscheidungen. In: Landesanstalt für Forstwirtschaft Nordrhein-Westfalen (Hrsg.): Biochemische Untersuchungen zur Genetik von Waldbaumpopulationen. Arnsberg. S. 69-75.

RUOFF, S. (1932): Stratigraphie und Entwicklung einiger Moore des Bayerischen Waldes mit der Waldgeschichte des Gebiets. *Forstwiss Cbl* 54: 479-491 & 517-533.

RUSSELL, J.R.; FULLER, J.D.; MACAULAY, M.; HATZ, B.G.; JAHOOR, A.; POWELL, W. & WAUGH, R. (1997): Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95: 714-722.

RYCHLIK, W.; SPENCER W.J. & RHOADS, R.E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Res* 18(21): 6409-6412.

SAIKI, R.K. (1990): Amplification of genomic DNA. In: INNIS, M.A.; GELFAND , D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. (Hrsg.): PCR protocols - A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. S. 13-20.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

SAITOU, N. & NEI, M. (1987): The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

SAUER, A.; KLEINSCHMIT, J. & LUNDERSTÄDT, J. (1973): Charakterisierung von Fichtenklonen (*Picea abies* Karst.) mit Hilfe morphologischer, physiologischer und biochemischer Methoden. 1. Variationen der untersuchten Merkmale. *Silvae Genetica* 22(5-6): 173-182.

SAX, K. & SAX, H.J: (1933): Chromosome number and morphology in the conifers. *J Arnold Arbor* 14: 356-375.

SCHEEPERS, D.; ELOY, M.-C. & BRIQUET, M. (1997a): Use of RAPD for clones verification and in studying relationships among provenances in Norway spruce (*Picea abies*). *Belgian Journal of Botany* 129(2): 158.

SCHEEPERS, D.; ELOY, M.-C. & BRIQUET, M. (1997b): Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theor Appl Genet* 94: 480-485.

SCHMIDT-VOGT, H. (1949): Die Verzweigungstypen der Fichte und ihre Bedeutung für die forstliche Pflanzenzüchtung . Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

SCHMIDT-VOGT, H. (1972a): Studien zur morphologischen Variabilität der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) - 1. Literaturbericht. *Allg Forst- u J-Ztg* 143(7): 133-144.

SCHMIDT-VOGT, H. (1972b): Studien zur morphologischen Variabilität der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) - 2. Untersuchungen zur morphologischen Variabilität der Fichte im europäischen Verbreitungsgebiet. *Allg Forst- u J-Ztg* 143(9): 177-186.

SCHMIDT-VOGT, H. (1972c): Studien zur morphologischen Variabilität der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) - 3. Der gegenwärtige Stand der Forschung zur morphologischen Variabilität der Fichte - Gesetzmäßigkeiten und Theorien. *Allg Forst- u J-Ztg* 143(11): 221-240.

SCHMIDT-VOGT, H. (1972d): Wachstum und Schneebruchresistenz von Fichtenherkünften des Bayerischen Alpenvorlandes, der Bayerischen Alpen und des Bayerischen Waldes. *Forstw Cbl* 91: 339-357.

SCHMIDT-VOGT, H. (1974a): Das natürliche Verbreitungsgebiet der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) in Eurasien. *Allg Forst- u J-Ztg* 145(10-11): 185-197.

SCHMIDT-VOGT, H. (1974b): Die systematische Stellung der gemeinen Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und der sibirischen Fichte (*Picea obovata* Ledeb.) in der Gattung *Picea*. *Allg Forst- u J-Ztg* 145(3-4): 46-60.

SCHMIDT-VOGT, H. (1975): Analyse der Fichtenbestände nach Provenienzen und deren ökologisches Verhalten. *AFZ*, Sonderdruck 30.

SCHMIDT-VOGT, H. (1976): Fichtenherkünfte (*Picea abies* (L.) Karst.) der Bundesrepublik Deutschland. *Allg Forst- u J-Ztg* 147(8): 149-163.

SCHMIDT-VOGT, H. (1977): Die Fichte. Band 1. Paul Parey, Hamburg.

SCHMIDT-VOGT, H. (1978): Genetics of *Picea abies* (L.) Karst. In: Academia Scientiarum et Artium Slavorum Meridionalium (Hrsg.): Annales Forestales 7(5). Zagreb. S. 147-186.

SCHMIDT-VOGT, H. (1986): Die Fichte. Band 2. Paul Parey, Hamburg.

SCHMIDT-VOGT, H.; FRANKE, A.; KONNERT, M. & DEICHNER, P. (1992): Identifizierung, Wachstum und Schneebruchresistenz von Fichtenherkünften des Schwarzwaldes. *Allg Forst- u J-Ztg* 163(7-8): 145-154.

SCHMIEDEL, T. (1988): Untersuchungen zur Eignung von Isoenzym-Mustern für die Frühdiagnose von Immissionsschäden an *Picea abies*. Diss, TU Dresden. Dresden.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. (2000): ARLEQUIN 2.0 - A software for population genetics data analysis. Genf.

SCHOLZ, F. & BERGMANN, F. (1984): Selection pressure by air pollution as studied by isozyme-gene-systems in Norway spruce exposed to sulphure dioxide. *Silvae Genetica* 33(6): 238-241.

SCHOLZ, F. (1984): Wirken Luftverunreinigungen auf die genetische Struktur von Waldbaumpopulationen? *Forstarchiv* 55(2): 43-45.

SCHOLZ, F.; GREGORIUS, H.-R. & RUDIN, S. (Hrsg.) (1989): Genetic effects of air pollutants in forest tree populations. Springer-Verlag, Berlin.

SCHRÖTER, C. (1898): Über die Vielgestaltigkeit der Fichte. *Viertelj Schrift d Naturforsch Ges in Zürich* 43: 1-130.

SCHUBERT, I.; MÜLLER-STARCK, G. & RIEGEL, R. (2001): Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theor Appl Genet* 103: 1223-1231.

SCHUBERT, R.; ERNST, D.; SANDERMANN, H. & MÜLLER-STARCK, G. (1997): Gene discovery in Norway spruce based on cDNA sequencing. In: Somatic Cell Genet Mol Genet Trees. Joint Meet IUFRO Working Parties 2.04-07 and 2.04-06. Quebec, Kanada. S. 43.

SCHUBERT, R.; SPERISEN, C.; MÜLLER-STARCK, G.; LA SCALA, S.; ERNST, D.; SANDERMANN, H. Jr. & HÄGER, K.-P. (1998): The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene structure in *Picea abies* (L.) Karst. - Genomic sequences, Southern hybridization, genetic analysis and phylogenetic relationships. *Trees* 12: 453-463.

SCOTTI, I.; MAGNI, F.; FINK, R.; POWELL, W.; BINELLI, G. & HEDLEY, P.E. (2000): Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome* 43: 41-46.

SCOTTI, I.; MAGNI, F.; PAGLIA, G.P. & MORGANTE, M. (2002a): Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*) - Their features and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet* 106: 40-50.

SCOTTI, I.; PAGLIA, G.P.; MAGNI, F. & MORGANTE, M. (2002b): Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theor Appl Genet* 106: 1035-1041.

SCOTTI, I.; TROGGIO, M.; SORANZO, N.; VENDRAMIN, G.G. & BUCCI, G. (1998): A new set of PCR-based, locus-specific markers for *Picea abies* (L.) Karst. *Mol Ecol* 6: 789-792.

SHANNON, C.E. (1949): The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

SIGURGEIRSSON, A. & SZMIDT, A.E. (1991): Chloroplast DNA phylogenetics and hybridization in *Picea*. In: ALDÉN, J.; MASTRANTONIO, J.L. & ØDUM S. (Hrsg.): Forest development in cold climates. Plenum Press, New York, London. S. 369-382.

SIGURGEIRSSON, A. & SZMIDT, A.E. (1993): Phylogenetic and biogeographic implications of chloroplast DNA variation in *Picea*. *Nordic Journal of Botany* 13: 233-246.

SIGURGEIRSSON, A. (1992): Insights into the evolution of *Picea* from chloroplast DNA. Dissertation, Univ. Umeå.

SILVA, E.P. & RUSSO, C. (2000): Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia* 42: 119-135.

SINCLAIR, W.T.; MORMAN, J.D. & ENNOS, R.A. (1998): Multiple origins for Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland - evidence from mitochondrial DNA variation. *Heredity* 80(2): 233-240.

SINCLAIR, W.T.; MORMAN, J.D. & ENNOS, R.A. (1999): The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe - evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol Ecol* 8(1): 83-88.

SKOV, E. & WELLENDORF, H. (1998): A partial linkage map of *Picea abies* clone V6470 based on recombination of RAPD-markers in haploid megagametophytes. *Silvae Genetica* 47(5-6): 273-282.

SKOV, E. (1998a): Mendelian inheritance and tissue expression of RAPD-markers in *Picea abies* (L.) KARST. *Silvae Genetica* 47(5-6): 262-270.

SKOV, E. (1998b): Timing of DNA extraction from megagametophytes for PCR during initial steps of seedling development in *Picea abies* (L.) KARST. *Silvae Genetica* 47(5-6): 270-273.

SKOV, E. (1998c): Are RAPD-markers reproducible between different laboratories? A case study of *Picea abies* (L.) KARST. *Silvae Genetica* 47(5-6): 283-287.

Skov, E. (1999): Identification of DNA markers suitable for genome mapping in *Picea abies* (L.) Karst.. Dissertation, The Royal Veterinary and Agricultural University, Hørsholm.

SKROCH, P. & NIENHUIS, J. (1995): Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet* 91: 1086-1091.

SKRØPPA, T. & MAGNUSSEN, S. (1993): Provenance variation in shoot growth components of Norway spruce. *Silvae Genetica* 42(2-3): 111-120.

SKRØPPA, T. (1994): Growth rhythm and hardiness of *Picea abies* progenies of high altitude parents from seed produced at low elevations. *Silvae Genetica* 43(2-3): 95-100.

SLATKIN, M. & BARTON, N.H. (1989): A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1358-1368.

SLATKIN, M. (1973): Gene flow and selection in a cline. *Genetics* 75: 733-756.

SLATKIN, M. (1981): Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* 99: 323-335.

SLATKIN, M. (1985): Geneflow in natural populations. *Ann Rev Ecol Syst* 16: 393-430.

SMITH, D.N. & DEVEY, M.E. (1994): Occurence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37: 977-983.

SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. (1973): Numerical taxonomy. Freeman & Co, San Francisco.

SORANZO, N.; ALIA, R.; PROVAN, J. & POWELL, W. (2000): Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights in to the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Mol Ecol* 9(9): 1205-1211.

SPERISEN, C.; BÜCHLER, U.; MATYAS, G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A.;SKROPPA, T. & VENDRAMIN, G. (1999): Polymorphic tandem repeats in the chloroplast and mitochondrial genomes of Norway spruce. In: SKROPPA, T.; PAULE, L. & GÖMÖRY, D. (Hrsg.): Genetics and breeding of Norway spruce. Arbora Publishers, Zvolen. Seiten.

STARKE, R. (1993): Genmarker als Entscheidungshilfen für die Genkonservierung. 2. Isoenzyme als Genmarker für die Ausweisung forstlicher Genressourcen. *Allg Forst- u J-Ztg* 164(9-10): 181-186.

STEWART, C.N. & VIA, L.E. (1993): A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques* 14(5): 748-749.

STIMM, B. & BERGMANN, F. (1994): Genetische Untersuchungen an Fichtenrotten der subalpinen Waldstufe mit Hilfe von Isoenzympolymorphismen. *Schweiz Z. Forstwes* 145(5): 401-411.

STRAUSS, S.H.; LANDE, R. & NAMKOONG, G. (1992): Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Can J Forest Res* 22: 1050-1061.

STUTZ, H.-P. (1990a): Eigenschaften und Ursachen der genetischen Differenzierung der Fichte im Wallis (Schweiz). In: HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Erhaltung forstlicher Genressourcen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Fortslichen Versuchsanstalt 98. S. 99-114.

STUTZ, H.-P. (1990b): Genetische Differenzierung und natürliche Selektionsfaktoren der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) in einem zentralalpinen Gebiet der Schweiz. Dissertation, Eidgenössische Techn. Hochsch. Zürich.

SUH, H.S.; SATO, Y.I. & MORISHIMA, H. (1997): Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94: 316-321.

SUNNUCKS, P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.

SUTTER, A. (1997): Das Chloroplastengenom der Fichte (*Picea abies* L.) – Molekular-biologische Studien zur Struktur und Organisation ausgesuchter Genloci. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

SUTTON, B.; FLANAGAN, D.; GAWLEY, J.; NEWTON, C.; LESTER, D. & EL-KASABY, Y. (1991): Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones. *Theor Appl Genet* 82: 242-248.

SVOLBA, J. (1990): Evaluierung verschiedener Fichten-Populationen anhand genetischer Merkmale. In: STEPHAN, B.R. (Hrsg.): Erhaltung forstlicher Genressourcen. Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft 164: 57-65.

SYLVÉN, N. (1909): Studien über den Formenreichtum der Fichte, besonders die Verzweigungstypen derselben und ihren forstlichen Wert. *Mitt Forstl Versuchsanst Schwedens* 11: 9-60.

SZMIDT, A. E., WANG, X-R. & LU, M-Z. (1996): Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: 412-420.

SZMIDT, A.E. (1991): Phylogenetic and applied studies on chloroplast genome in forest conifers. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M.E.; CANNATA, F. & HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SBP Scientific Publishing, The Hague. S. 185-196.

TAUTZ, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res* 17: 6463-6471.

TEMESGEN, B.; BROWN, G.; HARRY, D.E.; KINLAW, C.S.; SEWELL, M.M. & NEALE, D.B. (2001): Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor Appl Genet* 102: 664-675.

TEPLOUCHOV, T. (1869): Ein Beitrag zur Kenntnis der sibirischen Fichte – *Picea obovata* Ledebour (deutsch). *Bull Soc Nat Moscou* 3: 244-252.

TIGERSTEDT, P.M.A. (1973): Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas* 75: 47-60.

TIGERSTEDT, P.M.A. (1974): Genetic structure of *Picea abies* as determined by the isozyme approach. In: Proceedings of the IUFRO Joint Meeting on Working Parties on Population and Ecological Genetics, Stockholm. S. 282-292.

TOUSSAINT, V. (1993): Molekulargenetische Untersuchungen an Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) - Präparation hochgereinigter RNA, Translation in zellfreien Systemen und elektrophoretische Auftrennung der Translationsprodukte. Dissertation, Univ. Bonn.

TROGGIO, M.; KUBISIAK, T.L.; BUCCI, G. & MENOZZI. P. (2001): Randomly amplified polymorphic DNA linkage relationships in different Norway spruce populations. *Can J For Res* 31: 1456-1461.

TULSIERAM, L.K.; GLAUBITZ, J.C.; KISS, G. & CARLSON, J.E. (1992): Single tree genetic linkage analysis in conifers using haploid DNA from megagametophytes. *Bio/Technology* 10: 686-690.

TUROK, J. & KOSKI, V. (Hrsg.) (1997): *Picea abies* Network. Report of the 2nd Meeting, September 5-7 1996, Hyytiälä/Finland. Rom.

TUROK, J.; KOSHI, V.; PAULE, L. & FRISON, E. (Hrsg.) (1995): *Picea abies* Network, Report of the 1st Meeting, March 16-18, 1995, Stara Lesna/Slovakia. Rom.

VAN DE VEN, W.T.G. & MCNICOL, R.J. (1995): The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity* 75: 126-132.

VENDRAMIN, G.G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A. SPERISEN, C. & BUCCI, G. (2000): Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43. 68-78.

VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L.; ROSSI, P. & MORGANTE, M. (1996): A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol Ecol* 5: 595-598.

VICARIO, F.; VENDRAMIN, G.G.; ROSSI, P.; LIÒ, P. & GIANNINI, R. (1995): Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. *Theor Appl Genet* 90: 1012-1018.

VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. (1986): Norway spruce (*Picea abies* L.) In: BAJAJ, Y.P.S. (Hrsg.): Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 1: Trees 1. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S. 291-310.

VON BÜLOW, G. (1962): Die Sudwälder von Bad Reichenhall. Mitteilungen aus der Staatsforstverwaltung Bayern, Heft 33. München.

VON SCHANTZ, M. & JUVONEN, S. (1966): Chemotaxonomische Untersuchungen in der Gattung *Picea*. *Acta Bot Fenn* 73: 1-51.

VON WUEHLISCH, G. & KRUSCHKE, D. (1991): Single and multilocus genetic effects on diameter growth in *Picea abies* (L.) Karst. In: FINESCHI, S.; MALVOLTI, M.E.; CANNATA, F. & HATTEMER, H.H. (Hrsg.): Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SBP Scientific Publishing, The Hague. S. 77-86.

VORNAM, B. (1993): Genmarker als Entscheidungshilfen für die Genkonservierung. 3. RFLPs als Genmarker für die Ausweisung forstlicher Genressourcen. *Allg Forst- u J-Ztg* 164(9-10): 186-190.

VOS, P.; HODGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; VAN DE HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMANN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995): AFLP – A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23(21): 4407-4414.

WÄGELE, J.W. (2001): Grundlagen der phylogenetischen Systematik. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München. 320 Seiten.

WAGNER, D.B. (1992): Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population analysis of trees. *New Forests* 6: 373-390.

WAGNER, D.B.; DONG, J.; CARLSON, M.R. & YANCHUK, A.D. (1991): Paternal leakage of mitochondrial DNA in *Pinus*. *Theor Appl Genet* 82: 510-514.

WAGNER, G.; ALTMEYER, M.; KLEIN, R.; PAULUS, M. & SPRENGART, J. (1993): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Fichte/Kiefer (*Picea abies/Pinus sylvestris*). In: Umweltbundesamt (Hrsg.) (1996): Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben. Erich Schmidt Verlag, Berlin.

WANG, Y.-R.; SZMIDT, A.E. & LU, M.Z. (1996): Genetic evidence for the presence of cytoplamic DNA in pollen and megagametophytes and maternal inheritance of mitochondrial DNA in Pinus. *Forest Genetics* 3(1): 37-44.

WEIR, B.S. & COCKERHAM C.C. (1984): Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.

WELLENDORF, H.; KAUFMANN, U. & HANSEN, M. (1971): Thin layer chromatography of fluorescent phenolic compounds in needles – A contribution to chemotaxonomy in *Picea*. Arboretet Hørsholm, Forest Tree Improvement 2.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18(24): 7213-7218.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. (1991): Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucl Acids Res* 19: 5275-5279.

WELSH, J.; HONEYCUTT, R.J.; MCCLELLAND, M. & SOBRALL, B.W.S. (1991): Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet* 82: 473-476.

WHITE, T.; ARNHEIM, N. & ERLICH, H.A. (1989): The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* 5(6): 185-189.

WILD, A. (1990): Physiologische, biochemische und cytomorphologische Untersuchungen an immissionbelasteten Fichten. In: Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (Hrsg.): Vorhaben Waldschäden, Luftverunreinigung. F&E-Vorhaben 10803046/16, Forschungsendbericht.

WILDE, J.; WAUGH, R. & POWELL, W. (1992): Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83: 871-877.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFFY, M.K.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 218: 704-740.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18(22): 6531-6535.

WILLKOMM, X. (1887): Forstliche Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. 2.Aufl. Leipzig, Heidelberg.

WITTLAND, K. (1992): Die genetische Struktur von Naturverjüngungen und Pflanzenbeständen im Vergleich zu der Struktur des gemeinsamen Fichten-Altbestandes. Diplomarbeit, Georg-August-Universität, Göttingen.

WOLF, H. (1995): The conservation of Norway spruce gene resources in the Federal Republic of Germany. In: TUROK, J.; KOSKI, V.; Paule. L. & Frison, E. (Hrsg.) : *Picea abies* Network, Report of the 1st Meeting, March 16-18,1995, Starà Lesnà/Slovakia. Rom. S. 70-78.

WOLF, H. (1997): Research and further development of conservation and use in Germany. In: TUROK, J. & KOSKI, V. (Hrsg.) : *Picea abies* Network, Report of the 2nd Meeting, September 5-7 1996, Hyytiälä/Finland. Rom. S. 20-22.

WOLFE, A.D. & LISTON, A. (1998): Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. & DOYLE, J.J. (Hrsg.): Molecular systematics of plants II - DNA sequencing. Kluwer Academic Publ., Boston, Dordrecht, London. S. 43-86.

WOLFE, A.D.; XIANG, Q.Y. & KEPHART, S.R. (1998): Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Mol Ecol* 7: 1107-1125.

WRIGHT, S. (1978): Evolution and the genetics of populations – Vol. 4: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

YANG, X. & QUIROS, C. (1993): Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86(2-3): 452-455.

YAZDANI, R. & RUDIN, D. (1982): Isozymes as genetic markers in *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Isozyme Bulletin* 15: 118.

YAZDANI, R. (1988): Population genetic structure and dynamics in *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Isozyme Bulletin* 21: 185.

YAZDANI, R.; YEH, F. & RIMSHA, J. (1995): Genomic mapping of *Pinus sylvestris* (L.) using random amplified polymorphic DNA markers. *For Genet* 2: 109-116.

YEH, F.C.; JANG, R.C.; BOYLE, T.; YEH, Z.H. & MAO, J.X. (1999): POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis, version 1.32. University of Alberta.

YU, K. & PAULS, K.P. (1992): Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl Acids Res* 20: 2606.

ZHIVOTOVSKY, L.A. (1999): Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol Ecol* 8: 907-913.

ZIEGENHAGEN, B. (1996): DNA Extraction procedures - Summarised results of a workshop on DNA extraction, September 1995 in Großhansdorf. *Molecular Screening News* 5-9.

ZIEHE, M. & HATTEMER, H.H. (1987): Populationsgenetische Ansätze zur Resistenz gegenüber Umweltschäden. *Allg Forst- u J-Ztg* 158: 217-222.

ZIEHE, M. & MÜLLER-STARCK, G. (1991): Changes of genetic variation due to associated selection. In: MÜLLER-STARCK, G. & ZIEHE, M. (Hrsg.): Genetic variation in European populations of forest trees. J.D. Sauerländer's, Frankfurt a. Main. S. 259-271.

ZIETKIEWICZ; E.; RAFALSKI; A. & LABUDA; D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Anhang

Anhang I	Abkürzungsverzeichnis
Anhang II	Verwendete Chemikalien und Lösungen
Anhang III	Biometrische Übersicht über das Probenmaterial
Anhang IV	Ergebnisse der RAPD-PCR-Primertests (Qualitative Bewertung)
Anhang V	0/1-Matrix der RAPD-PCR-Analyse der Einzelindividuen
Anhang VI	0/1-Matrix der RAPD-PCR-Analyse der Poolproben
Anhang VII	0/1-Matrix der ISSR-PCR-Analyse der Einzelindividuen
Anhang VIII	0/1-Matrix der ISSR-PCR-Analyse der der Poolproben
Anhang IX	Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der mittels RAPD ermittelten binären Daten (vgl. Abb. 34)
Anhang X	Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der mittels ISSR ermittelten binären Daten (vgl. Abb. 44)

Anhang I – Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFLP	*amplified fragment length polymorphism*
AP	*arbitrarily primed*
Be	Berchtesgaden
bp	Basenpaare
BS	Belau (Belauer See)
BSR	Band-Sharing-Rate
BW	Bayerischer Wald
C	Cytosin
cDNA	*complementary DNA*
cpDNA	Chloroplasten-DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff
DAF	*DNA amplification fingerprinting*
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
EST	Esterase
EST	*expressed sequence tags*
FG	Freiheitsgrade
G	Guanin
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamatoxaloacetattransaminase
Ha	Harz
Hu	Hunsrück
Hx	Harz (autochthon)
IDH	Isocitratdehydrogenase
ISSR	*inter simple sequence repeat*
ITS	*internal transcribed spacer*
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
LAP	Leucinaminopeptidase

MDH	Malatdehydrogenase
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Stichprobengröße
n.b.	nicht bestimmt
n.s.	nicht signifikant
nDNA	nukleäre DNA (Kern-DNA)
NN	Normalnull
PCR	*polymerase chain reaction*
PGDH	Phosphogluconatdehydrogenase
RAPD	*random amplified polymorphic DNA*
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	*restriction fragment length polymorphism*
RNAse	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
SCAR	*sequence characterized amplified region*
SKDH	Shikimatdehydrogenase
So	Solling
sp.	Spezies
SSR	*simple sequence repeat*
STMS	*sequence tagged microsatellite site*
STS	sequence tagged site
T	Thymin
T_a	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
T_m	Schmelztemperatur
TNG	Tausendnadelgewicht
U	*units*
VNTR	*variable number of tandem repeats*
Wa	Warndt

Anhang II – Verwendete Chemikalien und Lösungen

Agarose (SERVA) for DNA Electrophoresis - Analytical Grade
(Boehringer Ingelheim Bioproducts)

Agarose Type 1
(AMRESCO Inc., Solon, Ohio, USA)

Bisbenzimid-Lösung (Hoechst)
10^{-3} mol/l Bisbenzimid (H33258x3HClx5 H_2O)

Cethyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid-Verdaulösung
100 mM Tris
1.4 M NaCl
20 mM Na_2EDTA
2 % CTAB
0.2 % β-Mercaptoethanol
pH 9.5

Chloroform p.a.

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden)

DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit (FINNZYMES, Espoo, Finnland)
mit 10x Puffer aus
10 mM Tris-HCl (pH 8.8,)
1.5 mM $MgCl_2$
50 mM KCl
0.1 % Triton® X-100

Ethanol absolut, unvergällt

Ethanol 70 %, unvergällt
in sterilem $H_2O_{deion.}$

Ethidiumbromid-Lösung (Boehringer Ingelheim Bioproducts)
1 µg/ml Ethidiumbromid

Fluoreszenzmarkierte Desoxynucleosid-Triphosphate [F] dNTPs (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Formamid (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Gene-Scan Längenstandard GS 500 ROX (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Genetic Analyzer-Puffer mit EDTA (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Längenstandard (AMRESCO Inc., Solon, Ohio, USA)
Lambda Standard Hind III verdaut

Längenstandard (TaKaRa Biomedicals)
100 bp DNA ladder (100 bp -1000 bp und 1500 bp)

Na-Acetat-Lösung
3.0 M Na-Acetat

PCR-Puffer 10x (PrimeZyme™ Biometra)
100 mM Tris-HCl (pH 8.8)
15 mM $MgCl_2$
500 mM KCl
1 % Triton X-100

Performance Optimized Polymer 4 (POP-4^{TM}) (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Steriles $H_2O_{deion.}$

Stop-Lade-Mix

20	mg	Bromphenolblau
40	%	Saccharose
0.1	M	Na_2EDTA

TE-Puffer

10	mM	Tris-HCl
1	mM	Na_2EDTA

pH 7.5

TBE-Puffer

0.089	M	Tris-HCl
0.089	M	Borsäure
0.002	M	Na_2EDTA

pH 8.0-8.2

Tris-HCl

0.9	M	NaCl
0.1	M	Tris
0.05	M	$MgCl_2$

bei pH 9.5

Anhang III – Morphologisch-biometrische Übersicht über das Probenmaterial

	Bestandestyp	Alter	Umfang	Baumhöhe	Typ	Mittl. Triebl.	TNG
Be01	licht	180	228	23	b	3,1	5,3
Be02	licht	180	166	20	b	2,8	5,5
Be03	licht	180	193	22	b	2,4	5,1
Be04	licht	180	201	21	b	2,0	3,4
Be05	licht	180	178	21	b	2,9	5,1
Be06	licht	300	156	22	b	2,2	3,5
Be07	licht	300	186	25	b	3,3	5,7
Be08	licht	300	228	24	b	2,6	4,1
Be09	licht	300	197	20	b	2,9	4,8
Be10	licht	300	216	23	b	4,1	7,5
Be11	licht	220	232	19	b	2,7	4,2
Be12	licht	220	228	21	b	2,5	4,0
Be13	licht	220	207	19	b	2,9	5,5
Be14	licht	220	198	23	b	3,3	7,0
Be15	licht	220	209	21	b	3,6	5,0
Be16	licht	130	185	21	b	2,7	3,9
Be17	licht	130	127	20	b	2,7	3,2
Be18	licht	130	142	19	b	2,4	2,4
Be19	licht	130	145	21	b	2,6	2,7
Be20	licht	130	152	22	b	3,0	3,9
Be21	licht	180	102	24	b	3,4	3,8
Be22	licht	180	198	22	b	3,8	7,1
Be23	licht	180	135	27	p	3,9	5,9
Be24	licht	180	125	25	b	4,7	6,5
Be25	licht	180	158	29	b	3,5	4,4
Be26	licht	180	115	17	b	4,6	7,3
Be27	licht	180	135	17	b	3,1	4,7
Be28	licht	180	161	19	b	4,6	6,7
Be29	licht	180	135	18	b	3,6	4,5
Be30	licht	180	128	16	b	4,0	4,3
BW01	geschlossen	200	145	28	b	3,0	7,3
BW02	geschlossen	200	110	27	b	3,7	4,6
BW03	geschlossen	200	145	30	b	4,3	8,0
BW04	geschlossen	200	165	27	b	3,9	7,2
BW05	geschlossen	200	170	27	b	4,8	5,6
BW06	geschlossen	200	180	26	k	5,8	6,7
BW07	geschlossen	200	150	25	b	4,1	4,1
BW08	geschlossen	200	130	30	k	5,0	5,6
BW09	geschlossen	200	165	28	k	4,0	6,9
BW10	geschlossen	200	155	24	b	4,3	6,4
BW11	frei	200	165	22	b	4,2	6,0
BW12	frei	200	200	26	b	3,2	4,6
BW13	frei	200	195	28	b	3,8	6,4
BW14	frei	200	180	23	b	4,0	5,5
BW15	frei	200	175	25	b	3,7	5,4
BW16	Rand	200	140	21	b	3,3	8,0
BW17	Rand	200	175	30	b	3,4	5,2

BW18	Rand	200	175	25	b	3,7	7,3
BW19	frei	200	160	26	b	4,2	4,9
BW20	frei	200	150	24	b	4,1	4,6
BW21	Rand	100	75	13	b	3,4	5,0
BW22	geschlossen	100	90	16	p	3,6	5,6
BW23	geschlossen	100	95	16	p	3,7	6,0
BW24	geschlossen	100	95	18	p	3,6	4,1
BW25	geschlossen	100	95	16	b	3,8	5,8
BW26	geschlossen	200	145	22	b	3,4	5,3
BW27	geschlossen	200	155	27	b	3,2	6,7
BW28	geschlossen	200	140	23	b	3,0	4,9
BW29	geschlossen	100	130	21	b	3,7	5,3
BW30	geschlossen	100	180	22	b	3,8	6,3
Ha01	geschlossen	100	132	26	b	4,2	4,5
Ha02	geschlossen	100	130	27	b	3,6	4,3
Ha03	geschlossen	100	170	29	b	5,4	5,1
Ha04	geschlossen	70	145	28	b	4,6	5,1
Ha05	geschlossen	70	120	25	b	8,9	3,3
Ha06	geschlossen	70	120	28	b	5,8	4,0
Ha07	geschlossen	70	131	26	b	6,2	4,1
Ha08	geschlossen	70	142	27	b	5,9	4,7
Ha09	geschlossen	70	129	24	b	7,0	5,2
Ha10	geschlossen	165	113	30	b	5,2	3,4
Ha11	geschlossen	165	143	26	b	5,3	3,7
Ha12	geschlossen	165	117	28	b	4,8	4,1
Ha13	geschlossen	165	135	29	b	4,2	4,3
Ha14	geschlossen	165	133	28	b	5,0	3,8
Ha15	geschlossen	165	119	28	b	4,6	4,0
Ha16	licht	100	120	22	p	4,1	3,2
Ha17	licht	100	124	24	p	5,1	4,6
Ha18	licht	100	148	25	p	4,9	5,4
Ha19	licht	100	139	25	p	4,0	3,9
Ha20	licht	100	136	24	p	3,7	5,1
Ha21	geschlossen	180	168	28	p	3,4	3,7
Ha22	geschlossen	180	206	25	p	2,9	3,2
Ha23	licht	180	158	26	p	3,5	4,9
Ha24	licht	180	173	29	p	4,4	4,8
Ha25	licht	180	186	26	p	3,6	4,0
Ha26	licht	180	199	30	p	4,1	3,7
Ha27	licht	180	180	27	p	5,0	4,8
Ha28	licht	180	171	26	p	3,8	4,5
Ha29	licht	180	166	24	p	4,9	4,1
Ha30	licht	180	205	28	p	4,6	4,6
Hu01	geschlossen	130	168	26	-	5,3	5,6
Hu02	geschlossen	120	172	25	-	4,0	4,2
Hu03	geschlossen	120	143	27	-	4,1	4,2
Hu04	geschlossen	120	180	28	-	5,2	4,5
Hu05	geschlossen	100	129	23	-	7,0	4,7
Hu06	geschlossen	120	130	24	-	5,8	5,4
Hu07	geschlossen	100	133	26	-	6,7	7,0
Hu08	geschlossen	120	144	24	-	6,3	5,2
Hu09	geschlossen	120	153	24	-	7,0	3,6

Hu10	geschlossen	150	198	30	-	4,5	3,3
Hu11	geschlossen	150	171	27	-	5,6	5,0
Hu12	geschlossen	150	184	31	-	4,6	3,5
Hu13	geschlossen	120	147	24	-	5,8	4,4
Hu14	geschlossen	100	129	23	-	6,1	5,0
Hu15	geschlossen	100	142	24	-	6,7	4,2
Hu16	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu17	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu18	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu19	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu20	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu21	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu22	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu23	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu24	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu25	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu26	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu27	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu28	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu29	geschlossen	-	-	-	-	-	-
Hu30	geschlossen	-	-	-	-	-	-
So01	geschlossen	140	158	25	b	5,1	3,3
So02	geschlossen	140	155	24	b	6,0	4,2
So03	geschlossen	140	140	25	b	6,7	4,4
So04	geschlossen	140	152	25	b	6,6	3,9
So05	geschlossen	140	152	25	b	6,3	5,1
So06	geschlossen	140	135	25	b	6,2	3,6
So07	geschlossen	140	148	27	b	6,6	6,5
So08	geschlossen	140	158	25	b	7,7	5,4
So09	geschlossen	140	154	24	b	5,4	4,0
So10	geschlossen	140	177	25	b	6,1	5,2
So11	geschlossen	140	148	24	b	6,9	4,3
So12	Rand	140	94	25	b	6,4	4,3
So13	geschlossen	140	162	25	b	5,7	4,3
So14	geschlossen	140	192	28	b	5,1	4,5
So15	geschlossen	140	187	24	b	6,6	5,3
So16	geschlossen	140	149	26	b	5,7	5,0
So17	geschlossen	140	210	33	b	5,9	5,0
So18	geschlossen	140	202	30	b	5,5	5,3
So19	geschlossen	140	175	30	b	4,5	7,2
So20	geschlossen	140	164	29	b	4,3	5,2
So21	geschlossen	140	141	25	b	4,7	3,2
So22	geschlossen	110	128	22	´b	6,1	3,3
So23	geschlossen	110	134	22	b	5,7	4,2
So24	geschlossen	110	142	22	b	6,4	3,9
So25	geschlossen	100	151	20	b	6,8	5,0
So26	geschlossen	100	156	21	b	4,7	3,8
So27	geschlossen	100	166	20	b	5,3	5,6
So28	geschlossen	140	202	29	b	6,0	5,6
So29	geschlossen	140	178	31	b	5,1	3,8
So30	geschlossen	140	185	30	b	5,8	4,4
Wa01	geschlossen	100	130	25	b	6,6	4,8

Wa02	Rand	100	190	26	k	7,5	4,8
Wa03	Rand	100	130	24	k	6,5	5,9
Wa04	geschlossen	100	190	25	k	6,3	4,8
Wa05	Rand	100	135	23	b	7,7	4,4
Wa06	Rand	100	165	24	b	6,1	5,2
Wa07	Rand	70	140	22	k	7,3	4,0
Wa08	Rand	70	150	23	k	7,2	5,2
Wa09	geschlossen	70	120	20	b	6,8	4,5
Wa10	licht	70	110	25	b	7,8	4,8
Wa11	geschlossen	70	105	19	k	7,7	4,4
Wa12	Rand	70	110	21	k	8,8	6,6
Wa13	geschlossen	70	95	20	b	7,1	4,9
Wa14	geschlossen	70	100	23	k	6,8	3,7
Wa15	licht	70	115	22	k	8,2	4,4
Wa16	geschlossen	70	115	24	b	6,0	4,4
Wa17	geschlossen	70	125	21	b	7,3	4,8
Wa18	geschlossen	70	100	21	b	6,6	3,6
Wa19	geschlossen	70	140	25	k	7,2	4,5
Wa20	geschlossen	70	105	19	k	7,4	5,0
Wa21	geschlossen	70	120	23	k	7,8	4,1
Wa22	geschlossen	70	110	22	b	7,8	3,9
Wa23	geschlossen	70	105	19	b	6,3	4,8
Wa24	geschlossen	70	100	19	b	5,7	5,4
Wa25	geschlossen	70	95	18	b	7,5	4,3
Wa26	geschlossen	70	100	22	b	6,5	4,9
Wa27	geschlossen	70	130	25	b	6,1	4,1
Wa28	Rand	100	155	26	k	7,5	4,7
Wa29	Rand	100	180	27	k	6,2	5,2
Wa30	Rand	100	130	24	k	6,7	4,0
Wa31	Rand	100	135	25	b	7,2	4,7
Wa32	Rand	100	140	26	k	6,0	4,8
Wa33	Rand	100	165	26	b	7,3	5,2
Wa34	Rand	100	175	26	k	7,6	6,4
BS01	geschlossen	60	128	21	b	7,5	3,3
BS02	geschlossen	60	126	22	b	6,0	3,3
BS03	geschlossen	60	151	25	b	7,4	2,8
BS04	geschlossen	60	117	20	b	7,0	3,7
BS05	geschlossen	60	118	22	k	7,2	4,1
BS06	geschlossen	60	125	23	k	9,2	5,7
BS07	geschlossen	60	145	25	k	6,6	2,6
BS08	geschlossen	60	109	19	k	6,4	3,1
BS09	geschlossen	60	125	21	b	7,4	3,2
BS10	geschlossen	60	140	25	b	8,7	3,1
BS11	geschlossen	60	122	22	b	7,2	4,2
BS12	geschlossen	60	139	25	b	7,5	4,3
BS13	geschlossen	60	149	23	k	7,2	2,9
BS14	geschlossen	60	134	25	b	8,3	6,9
BS15	geschlossen	60	135	23	k	5,0	2,8
BS16	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS17	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS18	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS19	geschlossen	60	-	-	-	-	-

BS20	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS21	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS22	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS23	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS24	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS25	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS26	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS27	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS28	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS29	geschlossen	60	-	-	-	-	-
BS30	geschlossen	60	-	-	-	-	-
Hx01	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx02	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx03	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx04	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx05	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx06	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx07	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx08	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx09	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx10	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx11	licht	>300	-	-	-	-	-
Hx12	licht	>300	-	-	-	-	-

Anhang IV – Ergebnisse der RAPD-PCR-Primertests (Qualitative Bewertung)

Primer	DNA-Sequenz	Anzahl amplifizierter Produkte	Anzahl polymorpher Produkte	Anteil polymorpher Produkte	Empfehlung von Binelli & Bucci (1994)	Empfehlung von NAPS	Bewertung der Eignung
A01	CAGGCCCTTC	13	7	54%			§
A02	TGCCGAGCTG	8	0	0%			-
A03	AGTCAGCCAC	16	2	13%			$
A04	AATCGGGCTG	21	11	52%			§
A05	AGGGGTCTTG	16	8	50%			#
A06	GCTCCCTGAC	12	4	33%	X	X	$
A07	GAAACGGGTG	14	8	57%	X		#
A08	GTGACGTAGG	15	7	47%	X	X	#
A09	GGGTAACGCC	7	2	29%		X	$
A10	GTGATCGCAG	16	6	38%			#
A11	CAATCGCCGT	13	7	54%	X	X	#
A12	TCGGCGATAG	19	19	100%	X		+
A13	CAGCACCCAC	15	1	7%			$
A14	TCTGTGCTGG	14	2	14%			$
A15	TTCCGAACCC	5	3	60%			#
A16	AGCCAGCGAA	9	6	67%		X	§
A17	GACCGCTTGT	6	3	50%			#
A18	AGGTGACCGT	13	6	46%			#
A19	CAAACGTCGG	17	4	24%			$
A20	GTTGCGATCC	6	3	50%			§
B01	GTTTCGCTCC	14	5	36%			§
B02	TGATCCCTGG	12	9	75%	X		§
B03	CATCCCCCTG	16	5	31%			$
B04	GGACTGGAGT	10	7	70%			+
B05	TGCGCCCTTC	13	12	92%	X	X	+
B06	TGCTCTGCCC	23	9	39%			§
B07	GGTGACGCAG	15	6	40%			#
B08	GTCCACACGG	16	8	50%	X	X	§
B09	TGGGGGACTC	14	12	86%			+
B10	CTGCTGGGAC	12	0	0%			-
B11	GTAGACCCGT	10	5	50%			§
B12	CCTTGACGCA	0	0	0%			-
B13	TTCCCCCGCT	17	15	88%	X	X	+
B14	TCCGCTCTGG	19	18	95%			+
B15	GGAGGGTGTT	11	5	45%			§
B16	TTTGCCCGGA	20	20	100%	X		+
B17	AGGGAACGAG	8	6	75%			+
B18	CCACAGCAGT	22	16	73%			§
B19	ACCCCCGAAG	16	10	63%			#
B20	GGACCCTTAC	9	3	33%			$
C01	TTCGAGCCAG	10	5	50%			§
C02	GTGAGGCGTC	18	11	61%			§
C03	GGGGGTCTTT	13	1	8%			$
C04	CCGCATCTAC	11	2	18%		X	§
C05	GATGACCGCC	18	9	50%			§
C06	GAACGGACTC	14	6	43%			#

C07	GTCCCGACGA	7	3	43%			#
C08	TGGACCGGTG	15	9	60%			§
C09	CTCACCGTCC	15	9	60%			#
C10	TGTCTGGGTG	18	8	44%	X		#
C11	AAAGCTGCGG	14	3	21%			$
C12	TGTCATCCCC	9	2	22%			$
C13	AAGCCTCGTC	12	8	67%			+
C14	TGCGTGCTTG	22	7	32%			§
C15	GACGGATCAG	15	3	20%			$
C16	CACACTCCAG	11	4	36%			#
C17	TTCCCCCCAG	12	4	33%			$
C18	TGAGTGGGTG	13	7	54%			§
C19	GTTGCCAGCC	7	0	0%			-
C20	ACTTCGCCAC	3	1	33%			$
D01	ACCGCGAAGG	12	4	33%			$
D02	GGACCCAACC	11	3	27%			$
D03	GTCGCCGTCA	19	11	58%			#
D04	TCTGGTGAGG	15	6	40%			#
D05	TGAGCGGACA	23	9	39%			§
D06	ACCTGAACGG	20	20	100%			+
D07	TTGGCACGGG	15	4	27%			$
D08	GTGTGCCCCA	14	2	14%			$
D09	CTCTGGAGAC	0	0	0%			-
D10	GGTCTACACC	9	3	33%			$
D11	AGCGCCATTG	15	7	47%			§
D12	CACCGTATCC	15	14	93%		X	+
D13	GGGGTGACGA	15	9	60%			§
D14	CTTCCCCAAG	10	3	30%	X		$
D15	CATCCGTGCT	10	6	60%			§
D16	AGGGAGTAAG	9	1	11%	X		$
D17	TTTCCCACGG	10	9	90%			+
D18	GAGAGCCAAC	8	2	25%			$
D19	CTGGGGACTT	20	20	100%			+
D20	ACCCGGTCAC	17	8	47%			#
E08	TCATCCACGGT	17	13	76%		X	§
E09	CTTCACCCGA	18	11	61%		X	#
E12	TTATCGCCCC	8	2	25%	X	X	$
E17	CTACTGCCGT	22	13	59%	X	X	§
F06	GGGAATTCGG	16	7	44%	X		§
F07	CCGATATCCC	15	7	47%		X	#
F14	TGCTGCAGGT	10	3	30%	X		$
F16	GGAGTACTGG	18	11	61%	X		§
G04	AGCGTGTCTG	16	11	69%	X		#
G09	CTGACGTCAC	12	1	8%		X	$
G10	AGGGCCGTCT	14	8	57%	X	X	§
G12	CAGCTCACGA	15	6	40%		X	§
J01	CCCGGCATAA	21	12	57%	X	X	§
J04	CCGAACACGG	17	5	29%	X		$
J06	TCGTTCCGCA	15	6	40%	X		§
J08	CATACCGTGG	11	3	27%		X	$
W03	GTCCGGAGTG	14	8	57%	X		§
W05	GGCGGATAAG	12	5	42%	X		#

X04	CCGCTACCGA	15	8	53%	X	X	§
X11	GGAGCCTCAG	14	5	36%	X		§
X14	ACAGGTGCTG	12	3	25%	X		$
X16	CTCTGTTCGG	17	4	24%	X		$
X20	CCCAGCTAGA	17	9	53%	X		§
Y03	ACAGCCTGCT	13	8	62%	X		§
Y08	AGGCAGAGCA	14	5	36%	X		§
Y09	AGCAGCGCAC	9	5	56%		X	§
Y13	GGGTCTCGGT	17	5	29%	X		#
Y17	GACGTGGTGA	8	1	13%		X	$
C116	TACGATGACG	16	6	38%	X	X	#
C119	ATTGGGCGAT	8	1	13%		X	$
C122	GTAGACGAGC	14	7	50%	X		§
C123	GTCTTTCAGG	15	8	53%	X	X	#
C133	GGAAACCTCT	9	2	22%	X		$
C135	AAGCTGCGAG	14	4	29%	X		$
C146	ATGTGTTGCG	16	4	25%		X	#
C153	GAGTCACGAG	13	7	54%	X	X	§
C159	GAGCCCGTAG	22	15	68%	X	X	§
C167	CCAATTCACG	15	9	60%	X	X	#
C168	CTAGATGTGC	9	0	0%	X	X	-
C169	ACGACGTAGG	16	3	19%	X	X	$
C181	ATGACGACGG	12	7	58%	X	X	#
C184	CAAACGGCAC	18	12	67%	X	X	#
C186	GTGCGTCGCT	12	9	75%	X	X	+
C190	AGAATCCGCC	12	9	75%	X	X	+
C193	TGCTGGCTTT	13	8	62%	X	X	#
C195	GATCTCAGCG	15	7	47%	X	X	#
C203	CACGGCGAGT	16	16	100%	X	X	+
C210	GCACCGAGAG	15	7	47%	X		#
C213	CAGCGAACTA	14	5	36%	X	X	#
C225	CGACTCACAG	9	3	33%		X	$
C248	GAGTAAGCGG	10	7	70%		X	§
C254	CGCCCCCATT	6	1	17%		X	$
C256	TGCAGTCGAA	14	8	57%	X	X	§
C257	CGTCACCGTT	14	10	71%	X		#
C258	CAGGATACCA	9	4	44%		X	#
C266	CCACTCACCG	13	6	46%	X	X	#
C268	AGGCCGCTTA	14	9	64%	X	X	#
C269	CCAGTTCGCC	10	2	20%		X	$
C270	TGCGCGCGGG	11	6	55%		X	#
C288	CCTCCTTGAC	8	2	25%	X		$
C295	CGCGTTCCTG	9	5	56%	X	X	§
C297	GCGCATTAGA	21	12	57%	X	X	§
C299	TGTCAGCGGT	18	10	56%	X	X	§
C306	GTCCTCGTAG	20	17	85%	X		§
C315	GGTCTCCTAG	12	7	58%	X		#
C316	CCTCACCTGT	13	8	62%	X		§
C320	CCGGCATAGA	15	8	53%	X	X	§
C322	GCCGCTACTA	12	7	58%		X	#
C324	ACAGGGAACG	0	0	0%		X	-
C327	ATGGCCTTAC	15	10	67%	X	X	§
C330	GGTGGTTTCC	13	7	54%		X	#

C333	GAATGCGACG	12	1	8%		X	$
C336	GCCACGGAGA	4	0	0%		X	-
C337	TCCCGAACCG	12	5	42%		X	#
C348	CACGGCTGCG	8	3	38%		X	#
C352	CACAACGGGT	16	9	56%	X	X	#
C362	CCGCCTTACA	23	7	30%		X	§
C370	TCAGCCAGCG	9	6	67%		X	+
C372	CCCACTGACG	15	8	53%	X	X	#
C375	CCGGACACGA	18	13	72%	X		§
C381	ATGAGTCCTG	17	10	59%	X	X	#
C396	GAATGCGAGG	11	7	64%	X		#
C399	TTGCTGGGCG	14	12	86%	X		+
C402	CCCGCCGTTG	19	14	74%	X	X	§
C403	GGAAGGCTGC	15	13	87%	X		§
C408	CCGTCTCTTT	21	11	52%		X	§
C424	ACGGAGGTTC	26	21	81%	X	X	§
C427	GTAATCGACG	8	2	25%		X	$
C429	AAACCTGGAC	12	7	58%	X	X	#
C452	CTAATCACGG	15	15	100%	X		+
C460	ACTGACCGGC	9	4	44%		X	§
C479	CTCATACGCG	22	21	95%	X	X	+
C485	AGAATAGGGC	13	8	62%		X	§
C493	CCGAATCACT	16	12	75%	X	X	+
C499	GGCCGATGAT	15	8	53%	X	X	#
C502	GCATGGTAGC	14	8	57%	X		§
C503	ATCGTCCAAC	13	7	54%	X		§
C504	ACCGTGCGTC	16	9	56%	X	X	§
C507	AGACGTACTC	22	17	77%		X	§
C509	ACAGAGACTG	13	7	54%	X	X	#
C517	GGTCGCAGCT	12	2	17%		X	$
C519	ACCGGACACT	17	14	82%		X	+
C530	AATAACCGCC	0	0	0%		X	-
C531	GCTCACTGTT	11	8	73%		X	+
C533	GCATCTACGC	19	12	63%	X	X	§
C536	GCCCCTCGTC	15	9	60%	X	X	§
C550	GTCGCCTGAG	17	12	71%		X	+
C554	TCATCCAGGG	14	9	64%	X	X	§
C561	CATAACGACC	9	4	44%		X	#
C564	CGGCGTTACG	10	4	40%		X	#
C570	GGCCGCTAAT	20	16	80%	X	X	§
C579	TGGAATCGTG	20	11	55%		X	#
C580	GCGATAGTCC	18	14	78%		X	§
C586	CCGGTTCCAG	7	5	71%		X	+
C587	GCTACTAACC	15	7	47%	X	X	#
C589	GACGGAGGTC	4	0	0%		X	-
C590	CCGGCATGTT	11	6	55%		X	§
C599	CAAGAACCGC	16	11	69%	X		+
C600	GAAGAACCGC	15	11	73%		X	§
C614	GTAGTCTCGC	17	11	65%	X		#
C628	GTCTGGTTAG	14	14	100%	X		+
C631	GGCTTAACCG	18	13	72%	X	X	+
C667	CGCAGAAATC	20	17	85%	X	X	§

C668	CCCGATTGAG	22	20	91%	X		#
C677	TCTCAGGACA	16	6	38%	X	X	#
C687	ATACAAGGGG	12	7	58%	X		#

Anhang V – 0/1-Matrix der RAPD-PCR-Analyse der Einzelindividuen

Marker: A12-1760, A12-1620, A12-1500, A12-1400, A12-1310, A12-1250, A12-1110, A12-950, A12-930, A12-870, A12-820, A12-750, A12-730, A12-660, A12-630, A12-600, A12-550, A12-480, A12-450, B05-1590, B05-1450, B05-1380, B05-1230, B05-1130, B05-1020, B05-960, B05-930, B05-850, B05-800, B05-760, B05-700, B05-650, B09-1500, B09-1340, B09-1250, B09-1160, B09-1100, B09-1000, B09-950, B09-860, B09-790, B09-750, B09-710, B09-660, B09-600, B09-540, B13-1400, B13-1340, B13-1200, B13-1100, B13-1080, B13-1060, B13-990, B13-890, B13-860, B13-790, B13-750, B13-720, B13-670, B13-620, B13-590, B13-560, B13-520, B14-1880, B14-1750, B14-1560, B14-1380, B14-1270, B14-1210, B14-1100, B14-1020, B14-980, B14-900, B14-820, B14-780, B14-740, B14-660, B14-640, B14-580, B14-500, B14-420, B14-360, B16-2040, B16-1670, B16-1430, B16-1310, B16-1220, B16-1140, B16-1080, B16-1000, B16-960, B16-920, B16-870, B16-820, B16-790, B16-730, B16-670, B16-620, B16-590, B16-520, B16-460, B16-430, D06-2040, D06-1860, D06-1680, D06-1400, D06-1330, D06-1240, D06-1160, D06-1060, D06-980, D06-900, D06-820, D06-790, D06-760, D06-700, D06-660, D06-610, D06-580, D06-550, D06-480, D06-410, D12-1500, D12-1450, D12-1300, D12-1220, D12-1190, D12-1140, D12-1100, D12-1020, D12-950, D12-850, D12-810, D12-780, D12-700, D12-600, D12-480, D17-1920, D17-1270, D17-1120, D17-1040, D17-940, D17-860, D17-750, D17-650, D17-600, D17-550, D19-1940, D19-1600, D19-1550, D19-1450, D19-1400, D19-1350, D19-1300, D19-1200, D19-1120, D19-1050, D19-960, D19-880, D19-800, D19-750, D19-710, D19-690, D19-640, D19-580, D19-490, D19-460, C203-1340, C203-1300, C203-1250, C203-1170, C203-1070, C203-1020, C203-930, C203-860, C203-810, C203-790, C203-740, C203-710, C203-660, C203-580, C203-550, C203-500, C452-1500, C452-1420, C452-1330, C452-1180, C452-1120, C452-1040, C452-980, C452-890, C452-820, C452-770, C452-680, C452-600, C452-580, C452-450, C452-400, C479-1980, C479-1890, C479-1810, C479-1600, C479-1440, C479-1400, C479-1380, C479-1310, C479-1200, C479-1130, C479-1100, C479-1040, C479-980, C479-910, C479-880, C479-820, C479-780, C479-740, C479-710, C479-670, C479-580, C479-520, C628-1580, C628-1520, C628-1340, C628-1130, C628-1050, C628-940, C628-910, C628-860, C628-780, C628-750, C628-710, C628-660, C628-630, C628-580

Be01 0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0

Be02 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,
0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,
1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0

Be03 0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0

Be04 0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0

Be05 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0

Be06 0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0

Be07 0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0

Be08 0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,
0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0

Be09 0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Be10 1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1

Be11 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0

Be12 1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0

Be13 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1

Be14 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,
1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1

Be15 0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0

Be16 0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1

Be17 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1

Be18 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0

Be19 0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Be20 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Be21 1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Be22 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0

Be23 0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0

Be24 1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1

Be25 0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1

Be26 1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,

0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,
1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Be27 1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,
1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0

Be28 1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0

Be29 0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1

Be30 0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0

BW01 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,
1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,
1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1

BW02 0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,
0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0

BW03 0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,
1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0

BW04 0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,
1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0

BW05 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,
1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
,1,1,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0
BW06 0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,
0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0

BW07 0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,
1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0

BW08 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,
0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0

BW09 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0

BW10 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,
1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0

BW11 0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,

1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0

BW12 0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,
1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1

BW13 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0

BW14 0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,
1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0

BW15 0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,
1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0

BW16 1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,
1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0

BW17 0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0

BW18 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,
1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1

BW19 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,
1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0

BW20 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,
1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0

BW21 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,
1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0

BW22 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,
1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0

BW23 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,
0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0

BW24 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,
0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0

BW25 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,
1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1

BW26 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,
0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1

BW27 0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,
0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,
1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0

BW28 0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0

BW29 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,
1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0

BW30 0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0

Ha01 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Ha02 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0

Ha03 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0

Ha04 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Ha05 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,
0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0

Ha06 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,
0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Ha07 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,
1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0

Ha08 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,
1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0

Ha09 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Ha10 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,
0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0

Ha11 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Ha12 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,

0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0

Ha13 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0

Ha14 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1

Ha15 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Ha16 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Ha17 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Ha18 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1

Ha19 0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0

Ha20 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0

Ha21 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,
0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0

Ha22 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Ha23 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0

Ha24 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0

Ha25 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,
0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0

Ha26 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0

Ha27 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,
0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Ha28 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0

Ha29 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0

Ha30 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0

Hu01 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0

Hu02 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,
0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0

Hu03 0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0

Hu04 0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0

Hu05 0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0

Hu06 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0

Hu07 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0

Hu08 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0

Hu09 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Hu10 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0

Hu11 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0

Hu12 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0

Hu13 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,

0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu14 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0

Hu15 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1

Hu16 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,
0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu17 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0

Hu18 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu19 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0

Hu20 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,
0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Hu21 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0

Hu22 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu23 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu24 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu25 0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0

Hu26 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0

Hu27 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0

0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0

Hu29 0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1

Hu30 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0

So01 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0

So02 0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0

So03 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0

So04 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0

So05 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0

So06 0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,
0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0

So07 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0

So08 0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0

So09 0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,
1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0

So10 0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0

So11 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,
1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0

So12 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,
0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0

So13 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,
1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0

So14 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,
0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1

So15 0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,
0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0

So16 0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0

So17 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1

So18 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,
0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1

So19 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,
0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1

So20 0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,
1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1

So21 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1

So22 0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,
1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1

So23 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0

So24 0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1

So25 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0

So26 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0

So27 1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1

So28 0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,
1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0

So29 0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,

0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0

So30 0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0

Wa01 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0

Wa02 0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0

Wa03 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0

Wa04 0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0

Wa05 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0

Wa06 0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0

Wa07 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0

Wa08 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0

Wa09 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0

Wa10 0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0

Wa11 0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1

Wa12 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1

Wa13 0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0

Wa14 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0

Wa15 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0

Wa16 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0

Wa17 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0

Wa18 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1

Wa19 0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0

Wa20 0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1

Wa21 0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1

Wa22 0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0

Wa23 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,

Wa24 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,

Wa25 0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0

Wa26 0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0

Wa27 0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0

Wa28 0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0

Wa29 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0

Wa30 0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,

0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1

BS01 0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1

BS02 0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0

BS03 0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,
0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0

BS04 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1

BS05 0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1

BS06 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1

BS07 0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0

BS08 0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0

BS09 0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0

BS10 0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,
1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1

BS11 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1

BS12 0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0

BS13 0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,
1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0

BS14 0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0

BS15 0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,

0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0

BS16 1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1

BS17 1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1

BS18 1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0

BS19 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1

BS20 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1

BS21 0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0

BS22 0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0

BS23 0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0

BS24 0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,
1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0

BS25 0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0

BS26 0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0

BS27 0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,
0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0

BS28 0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,
0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1

BS29 0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0

BS30 0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,
0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0

Hx01 0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,
1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0

Hx02 0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,
0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0

Hx03 0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,
1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0

Hx04 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0

Hx05 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,
1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0

Hx06 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0

Hx07 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,
1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0

Hx08 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,
1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0

Hx09 0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,
0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1

Hx10 0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,
0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0

Hx11 1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,
0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,
1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0

Hx12 0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,
0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,
0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,
1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0

Anhang VI – 0/1-Matrix der RAPD-PCR-Analyse der Poolproben

Marker: A12-1760, A12-1620, A12-1500, A12-1400, A12-1310, A12-1250, A12-1110, A12-1000, A12-950, A12-930, A12-870, A12-820, A12-750, A12-730, A12-660, A12-630, A12-600, A12-550, A12-480, A12-450, A12-380, B05-1590, B05-1450, B05-1230, B05-1130, B05-1020, B05-930, B05-850, B05-700, B05-650, B09-1500, B09-1340, B09-1250, B09-1160, B09-1100, B09-1000, B09-950, B09-790, B09-750, B09-660, B09-600, B09-540, B13-1400, B13-1340, B13-1200, B13-1100, B13-1060, B13-990, B13-890, B13-860, B13-790, B13-750, B13-720, B13-670, B13-620, B13-590, B13-560, B13-520, B16-2040, B16-1670, B16-1430, B16-1310, B16-1220, B16-1140, B16-1080, B16-1000, B16-960, B16-920, B16-870, B16-820, B16-730, B16-670, B16-620, B16-590, B16-520, B16-460, B16-430, D06-1860, D06-1680, D06-1400, D06-1330, D06-1240, D06-1160, D06-980, D06-900, D06-820, D06-760, D06-700, D06-660, D06-480, D06-410, D12-1450, D12-1300, D12-1220, D12-1140, D12-1020, D12-950, D12-850, D12-700, D17-1920, D17-1270, D17-1120, D17-940, D17-860, D17-600, D19-1940, D19-1600, D19-1550, D19-1450, D19-1350, D19-1300, D19-1200, D19-1120, D19-1050, D19-800, D19-710, D19-640, D19-460, C203-1580, C203-1340, C203-1300, C203-1250, C203-1170, C203-1070, C203-1020, C203-930, C203-860, C203-810, C203-790, C203-740, C203-710, C203-660, C203-580, C203-550, C203-500, C203-410, C479-1980, C479-1890, C479-1810, C479-1600, C479-1440, C479-1400, C479-1380, C479-1310, C479-1200, C479-1130, C479-1100, C479-1040, C479-980, C479-910, C479-820, C479-780, C479-740, C479-710, C479-670, C479-580, C479-520, C628-2010, C628-1960, C628-1580, C628-1520, C628-1340, C628-1130, C628-1050, C628-940, C628-910, C628-860, C628-780, C628-750, C628-710, C628-660, C628-630, C628-580, C628-520

Be 1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,
1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,
1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1

BW 1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,1,
1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,
1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0

Ha 1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,
1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,
1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1

Hu 1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,
1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,
1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0

So 1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,
1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,
1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1

Wa 1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,
1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,
1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1

BS 1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,
1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,
1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1

1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1

Anhang VII – 0/1-Matrix der ISSR-PCR-Analyse der Einzelindividuen

Marker: CA6AC-1120, CA6AC-1100, CA6AC-860, CA6AC-830, CA6AC-810, CA6AC-640, CA6AC-510, CA6AC-490, CA6RG-900, CA6RG-870, CA6RG-820, CA6RG-750, CA6RG-730, CA6RG-650, CA6RG-620, CA6RG-510, CA6RG-460, CA6RG-430, CA6RY-900, CA6RY-860, CA6RY-820, CA6RY-730, CA6RY-690, CA6RY-580, CA6RY-510, CA6RY-430, GA9T-1510, GA9T-1440, GA9T-1200, GA9T-970, GA9T-960, GA9T-930, GA9T-900, GA9T-770, GA9T-680, GA9T-430

Be01	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1
Be02	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1
Be03	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Be04	1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1
Be05	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1
Be06	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1
Be07	1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Be08	1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Be09	1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1
Be10	1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Be11	1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1
Be12	1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Be13	1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1
Be14	1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1
Be15	1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1
Be16	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1
Be17	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1
Be18	1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Be19	1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1
Be20	1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0
Be21	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1
Be22	1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1
Be23	1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1
Be24	1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1
Be25	1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Be26	1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1
Be27	1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Be28	1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Be29	1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1
Be30	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1
BW01	1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW02	1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW03	1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW04	1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW05	1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW06	1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1
BW07	1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW08	1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW09	1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW10	1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1
BW11	1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1
BW12	1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1
BW13	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW14	1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1
BW15	1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW16	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1
BW17	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1
BW18	1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1
BW19	1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW20	1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1
BW21	1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1
BW22	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1
BW23	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW24	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW25	1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1
BW26	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
BW27	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1
BW28	1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1
BW29	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1
BW30	1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1
Ha01	1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1
Ha02	1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Ha03	1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1
Ha04	1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1

Ha05 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha06 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1
Ha07 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha08 1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha09 1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha10 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Ha11 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha12 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha13 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha14 1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha15 1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha16 1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Ha17 1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha18 1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha19 1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha20 1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha21 1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha22 1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha23 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha24 1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha25 1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1
Ha26 1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha27 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha28 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha29 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Ha30 1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1

Hu01 1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1
Hu02 1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0
Hu03 1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1
Hu04 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1
Hu05 1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1
Hu06 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0
Hu07 1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1
Hu08 1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1
Hu09 1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1
Hu10 1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0
Hu11 1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1
Hu12 1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1
Hu13 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1
Hu14 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1
Hu15 1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1
Hu16 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1
Hu17 1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Hu18 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1
Hu19 1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0
Hu20 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1
Hu21 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1
Hu22 1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1
Hu23 1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1
Hu24 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0
Hu25 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1
Hu26 1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0
Hu27 1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1
Hu28 0,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0
Hu29 1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0
Hu30 1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0

So01 1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0
So02 1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1
So03 1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0
So04 1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0
So05 1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1
So06 1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,0
So07 0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1
So08 0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0
So09 0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1
So10 1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0
So11 1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0
So12 1,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0
So13 1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0
So14 0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0
So15 1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0
So16 0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1
So17 0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0
So18 0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1
So19 1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0

So20 1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1
So21 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,0,0
So22 1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1
So23 1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,0
So24 1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1
So25 1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0
So26 1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,0,1,1,1
So27 1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0
So28 1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,0,0
So29 1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1
So30 1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0

Wa01 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1
Wa02 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1
Wa03 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1
Wa04 1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1
Wa05 1,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1
Wa06 1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1
Wa07 1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Wa08 1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1
Wa09 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1
Wa10 1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,1
Wa11 1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1
Wa12 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1
Wa13 1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1
Wa14 1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1
Wa15 1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1
Wa16 1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1
Wa17 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1
Wa18 1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Wa19 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Wa20 1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1
Wa21 1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Wa22 1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1
Wa23 1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1
Wa24 1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,1
Wa25 1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1
Wa26 1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Wa27 1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1
Wa28 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1
Wa29 1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,1
Wa30 1,1,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1

BS01 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0
BS02 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0
BS03 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0
BS04 1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,0,0
BS05 1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,1,0,0,0,1,1
BS06 1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0
BS07 1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,1,0
BS08 1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,0
BS09 1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1
BS10 1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,0,1,1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,0
BS11 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0
BS12 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0
BS13 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,1
BS14 0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0
BS15 1,0,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,0,1,0
BS16 1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0
BS17 1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,1
BS18 0,0,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0
BS19 1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0
BS20 1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,1,0,1,0,1,1
BS21 1,1,0,1,1,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1
BS22 1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1
BS23 1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,0,1,1,0,1,1,0,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1
BS24 1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,1
BS25 1,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1
BS26 0,1,1,1,1,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,0,0,1,0,1,1,0,1,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,0,0,0,1,1
BS27 1,1,0,1,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0
BS28 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0
BS29 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,1,0,1,1,0,1,1,0,0,0,1,0,1,0,0,1,0,0,0,1,0
BS30 1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1,0,0,0,0,0,1,0,0,1,1,1

Hx01 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1
Hx02 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,0,0,0,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1
Hx03 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,1,0,0,0,1,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1

Hx04 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1
Hx05 1,1,1,1,0,1,0,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,1,1,0,0,1,0,1,0,0,1,1,1,0,1,1,1,0,0,0,1
Hx06 1,1,1,1,1,1,0,0,1,0,1,0,1,0,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Hx07 1,1,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,1,1,1,1,0,1,0,1,0,1,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1
Hx08 1,1,1,1,0,1,0,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Hx09 1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,1,1,1,1,0,0,1,0,1,1,1,1,1,0,0,0,1
Hx10 1,0,1,1,1,1,0,0,1,1,0,1,1,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1,0,0,1,1,1,0,0,1,1,0,0,0,1
Hx11 1,0,1,1,0,1,0,0,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,0,1
Hx12 1,0,1,1,0,1,0,0,1,1,0,1,0,0,0,0,0,0,1,0,0,1,0,1,1,0,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,0,1

Anhang VIII – 0/1-Matrix der ISSR-PCR-Analyse der Poolproben

Marker: CA6AC-1120, CA6AC-1100, CA6AC-860, CA6AC-810, CA6AC-640, CA6AC-510, CA6AC-490, CA6RG-900, CA6RG-820, CA6RG-750, CA6RG-650, CA6RG-620, CA6RG-510, CA6RG-460, CA6RY-900, CA6RY-860, CA6RY-730, CA6RY-690, CA6RY-580, CA6RY-510, GA9T-1510, GA9T-1440, GA9T-1200, GA9T-970, GA9T-960, GA9T-900, GA9T-770, GA9T-680

Be	1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1
BW	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1
Ha	1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,0
Hu	1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
So	1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1
Wa	1,0,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1
BS	1,0,1,0,1,1,1,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,1

Anhang IX – Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der mittels RAPD ermittelten binären Daten (vgl. Abb 34)

Die Rotation ist in 9 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung

	1	2	3	4	5	6	7	8
Be01	,151	,654	,118	,253	,164	,102	,197	4,205E-02
Be02	,248	,666	8,149E-02	,166	9,999E-02	,128	-1,512E-03	-3,915E-02
Be03	,218	,690	,168	,117	,110	,140	,122	8,171E-02
Be04	,279	,687	,146	,104	,120	,153	,116	2,873E-02
Be05	,295	,641	,207	,219	6,532E-02	9,543E-02	,174	-,114
Be06	,152	,651	5,081E-02	,166	,239	,136	,201	-3,413E-02
Be07	,184	,719	,113	,115	,189	5,179E-02	,119	2,054E-02
Be08	,133	,666	,122	,173	,190	,139	,213	5,906E-03
Be09	,193	,660	,137	,188	,210	,110	,125	,124
Be10	,119	,685	,127	,278	,264	6,431E-02	5,888E-02	6,920E-02
Be11	,140	,682	,266	,148	3,776E-02	,269	9,969E-02	3,855E-02
Be12	,210	,692	,125	,266	,118	,128	6,364E-02	3,314E-02
Be13	,230	,656	,101	,173	6,818E-02	,190	,173	,108
Be14	,137	,661	,176	,244	1,062E-02	,111	7,856E-02	8,017E-02
Be15	,192	,614	,166	,223	,185	,128	,119	-6,718E-02
Be16	,216	,603	,178	,187	5,690E-02	,206	,153	1,221E-04
Be17	,171	,674	,113	,170	7,682E-02	,235	7,412E-02	,126
Be18	,188	,669	,159	5,584E-02	,207	,165	,185	-2,252E-02
Be19	,208	,651	,154	,190	,167	,213	5,922E-02	-6,158E-02
Be20	,187	,607	8,750E-02	,173	,197	,190	,118	9,367E-02
Be21	,130	,663	,140	,259	8,125E-02	,143	,104	-6,279E-02
Be22	,202	,634	9,357E-02	7,362E-02	5,283E-02	,254	2,607E-02	-4,424E-03
Be23	,127	,588	6,634E-02	,112	,110	,239	,177	,130
Be24	,119	,614	,199	,190	3,072E-02	,102	-1,087E-02	-4,738E-02
Be25	,107	,583	,120	,174	,191	,180	6,433E-02	-3,912E-02
Be26	8,485E-02	,650	3,172E-02	,221	5,881E-02	,194	2,641E-02	-8,433E-03
Be27	,110	,634	5,918E-02	9,035E-02	,188	,175	9,737E-02	6,104E-03
Be28	,107	,684	,150	,114	,164	,186	9,840E-02	-2,102E-02
Be29	,191	,725	,165	,171	7,334E-02	,170	,167	1,939E-02
Be30	,147	,571	,197	,289	9,520E-02	,141	,186	-3,817E-02
BW01	,151	,228	,239	,197	,228	,402	6,997E-02	,248
BW02	,141	8,822E-02	,249	,125	,261	,495	8,095E-02	,201
BW03	,126	,179	,293	9,492E-02	,227	,492	,132	,122
BW04	,117	,136	,182	,170	,167	,529	,168	,106
BW05	,110	,162	,196	,186	,244	,536	,190	,102
BW06	,115	,259	,258	,157	,132	,533	9,437E-02	,124
BW07	,166	8,812E-02	,176	,131	,265	,504	,161	-9,383E-02
BW08	,115	,249	,167	,189	,191	,577	-1,341E-02	1,703E-02
BW09	,177	,262	,200	,100	,173	,503	,127	,108
BW10	,101	,226	,156	,106	,244	,364	8,593E-02	,280
BW11	,166	,216	,290	,126	,192	,450	,169	,269
BW12	,175	,141	,323	,152	,145	,543	7,880E-02	5,128E-02
BW13	,113	,188	,281	,130	,177	,612	,134	3,989E-02
BW14	8,922E-02	,144	,269	,172	,133	,479	,128	3,396E-02
BW15	,174	,194	,144	,119	,181	,591	,229	-,103
BW16	,110	,190	,216	,246	,183	,606	5,653E-02	3,071E-02
BW17	,145	,174	,273	,190	,285	,579	,135	,117
BW18	,145	,172	,158	6,164E-02	,188	,581	,198	7,466E-02
BW19	,184	,147	,194	8,086E-02	,245	,598	3,061E-02	-,159
BW20	,109	,182	,363	,118	,201	,552	,118	-6,042E-02
BW21	9,831E-02	,221	,158	,206	,133	,605	6,595E-02	-6,521E-02
BW22	,174	,188	,132	5,350E-02	,183	,581	,104	-7,981E-02
BW23	,267	,218	,135	,103	,195	,519	,180	4,567E-03
BW24	,184	,229	,224	9,496E-02	,124	,577	,229	-1,868E-02
BW25	4,146E-02	,128	,280	,263	,164	,548	,202	-1,725E-02
BW26	9,362E-02	,247	,170	,174	,135	,565	,147	-9,461E-03
BW27	,170	,158	,144	,197	,120	,610	1,606E-02	-,151
BW28	,123	,205	,288	,175	,185	,553	8,008E-02	-2,689E-02
BW29	4,214E-02	,206	,278	,100	,174	,570	,155	-4,993E-02
BW30	,118	,180	,140	,178	,183	,558	,148	9,729E-02
Ha01	,198	6,799E-02	,199	,157	,613	,152	,172	2,637E-02
Ha02	,233	,134	,290	,159	,621	,174	,108	,216
Ha03	,230	,146	,187	,144	,620	,180	,272	,152
Ha04	,183	,169	,197	,168	,632	,244	-4,762E-03	9,100E-02
Ha05	,212	,123	,254	,205	,556	,141	,180	,254
Ha06	,133	,178	,287	,220	,590	,177	,179	8,530E-02
Ha07	,259	,150	,169	,167	,627	,245	1,756E-02	8,861E-02
Ha08	,246	,152	,184	,151	,539	,396	,122	,182

Ha09	,257	,131	,199	,218	,671	,242	,220	,136
Ha10	,226	6,494E-02	,196	,235	,550	,335	,166	8,100E-02
Ha11	,231	,153	,276	9,547E-02	,626	,289	,158	3,349E-02
Ha12	,256	,168	,192	,137	,584	,279	,231	,151
Ha13	,246	,142	,280	,150	,660	,296	4,558E-02	5,319E-02
Ha14	,279	,201	,218	,222	,529	,199	,194	-3,743E-02
Ha15	,232	,150	,205	,183	,595	,237	,138	8,400E-02
Ha16	,197	,245	8,503E-02	,248	,507	,312	,198	-5,505E-02
Ha17	,269	,195	,258	,173	,461	,289	,149	4,024E-02
Ha18	,175	,264	,171	,190	,592	,218	8,981E-02	6,172E-02
Ha19	,222	,162	,215	,281	,601	,121	,216	2,501E-02
Ha20	,205	,238	,160	,218	,629	,254	,201	-9,487E-02
Ha21	,127	,140	,246	,185	,588	,273	,201	-7,634E-02
Ha22	,237	,169	,210	,241	,640	,257	,251	7,407E-02
Ha23	,255	,241	,135	,250	,599	,194	,194	-,139
Ha24	,246	,279	,158	,168	,548	,222	,149	-9,105E-02
Ha25	,174	,205	,163	,140	,489	,283	,208	-,209
Ha26	,170	,228	,262	,197	,612	,145	,240	-,124
Ha27	,192	9,437E-02	,191	,230	,530	,204	,221	2,539E-02
Ha28	,249	,131	,147	,231	,531	,212	,250	-,143
Ha29	,220	,178	,167	,263	,590	,190	,237	-,221
Ha30	,255	,193	,154	,181	,606	,151	,164	-,154
Hu01	,649	,120	,242	2,465E-02	,187	,140	3,304E-02	9,755E-02
Hu02	,698	,218	,133	8,625E-02	,166	,214	8,194E-02	-7,828E-02
Hu03	,676	,185	,289	,118	,121	,139	7,197E-02	7,173E-02
Hu04	,669	,138	,148	,227	,196	3,737E-02	9,931E-02	,146
Hu05	,695	,127	,165	,209	,153	9,651E-02	9,244E-02	,160
Hu06	,714	,190	,177	,164	,175	,121	1,994E-02	,143
Hu07	,718	,241	,131	,116	,114	,208	4,405E-02	-1,833E-02
Hu08	,615	,226	,256	,103	,232	7,922E-02	,114	,107
Hu09	,692	,181	,219	,188	,260	,196	9,140E-02	4,666E-02
Hu10	,697	,221	,226	,107	,137	,169	,110	3,409E-02
Hu11	,765	,212	,150	,152	9,989E-02	,134	,146	2,400E-02
Hu12	,746	,201	,154	,109	,135	,150	2,229E-02	,160
Hu13	,631	,237	,229	,132	,240	9,936E-02	,146	,118
Hu14	,606	,260	,115	,140	,176	9,385E-02	,149	-1,562E-02
Hu15	,657	,154	,204	,244	,143	,131	,124	8,175E-02
Hu16	,709	,170	,190	8,980E-02	,118	,203	,124	-1,249E-02
Hu17	,666	,133	,253	,163	,163	,189	,153	1,058E-02
Hu18	,707	,191	,195	,193	,139	,121	,186	-5,985E-02
Hu19	,604	,157	,232	,210	,159	,149	,143	-,150
Hu20	,682	,157	,224	,168	,163	6,833E-02	,193	-6,054E-02
Hu21	,616	,182	,163	,168	,224	,106	,180	-4,214E-02
Hu22	,575	,206	,188	,181	,211	8,260E-02	,184	-,165
Hu23	,633	,135	,245	,114	,224	,109	,206	4,655E-02
Hu24	,693	,199	,192	,194	,206	4,969E-02	,179	-4,889E-02
Hu25	,705	8,197E-02	,161	,223	,213	,139	7,831E-02	9,341E-02
Hu26	,701	,106	,200	,216	,204	,116	,141	1,751E-02
Hu27	,666	,231	,160	,103	,297	,120	,135	-6,328E-02
Hu28	,654	,283	8,345E-02	,206	8,283E-02	,129	,204	-,178
Hu29	,607	,204	,130	,184	,106	,124	,180	-5,995E-02
Hu30	,708	,205	8,749E-02	,163	,140	,135	,200	-2,102E-02
So01	,269	,128	,579	,193	,199	,234	,100	-1,038E-02
So02	,213	,220	,592	7,093E-02	,205	,238	1,439E-03	-4,129E-02
So03	,221	,111	,619	,143	9,330E-02	,272	6,560E-02	3,094E-02
So04	,329	8,613E-02	,582	,108	,304	,255	7,468E-02	7,161E-02
So05	,244	,126	,601	,198	,264	,214	2,825E-02	-5,018E-02
So06	,213	,137	,590	,136	,116	9,799E-02	,165	8,770E-02
So07	,257	,122	,597	,180	,232	,229	9,136E-02	7,193E-02
So08	,239	,188	,596	9,800E-02	,117	,116	,115	,115
So09	,273	,138	,577	,141	,142	,259	2,882E-02	,148
So10	,293	4,883E-02	,588	,183	,157	,242	4,980E-02	,114
So11	,182	,180	,651	,121	,195	,262	3,401E-02	-7,350E-02
So12	,215	,189	,630	,191	,276	,202	4,823E-02	-6,701E-02
So13	,211	,154	,682	,118	,158	,220	2,437E-02	-5,134E-02
So14	,203	,124	,547	,221	,170	,204	,168	1,325E-02
So15	,154	,190	,569	6,198E-02	,177	,323	7,823E-02	-,186
So16	,112	8,049E-02	,583	,198	,153	,176	,151	-3,854E-02
So17	,212	,208	,591	,242	,198	,145	,116	,139
So18	,187	,170	,555	,139	,191	,122	,175	3,255E-02
So19	,155	,151	,592	,138	,134	,236	,145	3,688E-02
So20	,133	,114	,625	,172	,172	,218	,222	-4,449E-02
So21	,213	,180	,585	,220	,198	,111	,188	4,190E-03
So22	,144	,187	,678	,179	7,039E-02	,181	,131	8,337E-02
So23	,210	8,800E-02	,616	,249	,282	,183	,155	-5,454E-02
So24	7,139E-02	,167	,617	,308	,180	,213	,160	4,062E-02
So25	,248	5,691E-02	,602	,182	,176	,222	,196	4,312E-02

So26	,195	,163	,555	,157	,192	,285	,249	7,125E-02
So27	,168	,184	,636	,237	,115	,198	,205	5,387E-02
So28	,175	,210	,544	,214	,131	,235	,308	3,739E-03
So29	,196	,142	,610	,112	9,523E-02	,169	,237	-5,137E-02
So30	,179	,226	,634	,142	,223	,203	,231	3,811E-02
Wa01	,241	,219	,170	,186	,228	,310	,521	8,691E-02
Wa02	,182	,133	,298	,291	,244	,227	,406	,308
Wa03	,240	,222	,177	,335	,197	,273	,427	,259
Wa04	,195	,125	,258	,297	,353	,230	,433	,128
Wa05	,299	,163	,214	,362	,272	,204	,456	,149
Wa06	,206	,243	,305	,259	,196	,228	,380	,335
Wa07	,241	,327	,121	,254	,267	,237	,404	,128
Wa08	,279	,229	,132	,225	,273	,296	,543	5,934E-02
Wa09	,202	,180	,273	,241	,244	,295	,431	,317
Wa10	,256	,144	,191	,290	,198	,310	,458	,224
Wa11	,259	,144	,264	,299	,334	9,774E-02	,415	,255
Wa12	,193	,116	,262	,276	,266	,252	,481	,169
Wa13	,265	,146	,192	,235	,186	,279	,552	,110
Wa14	,308	,212	,189	,230	,328	,147	,456	,209
Wa15	,296	,175	,227	,330	,274	,245	,456	4,066E-02
Wa16	,220	,166	,155	,214	,340	,162	,483	-8,808E-02
Wa17	,301	,211	,213	,268	,247	,187	,579	-9,235E-02
Wa18	,217	,207	,241	,328	,145	,125	,571	-4,536E-02
Wa19	,288	,126	,150	,229	,304	,165	,506	-8,099E-02
Wa20	,199	,175	,203	,272	,265	,230	,546	-,111
Wa21	,214	,210	,261	,229	,135	,269	,455	-,129
Wa22	,281	,224	,207	,233	,263	,274	,409	1,291E-03
Wa23	,238	,274	,219	,266	,237	,131	,543	-8,103E-02
Wa24	,195	,174	,228	,227	,276	,220	,508	-4,270E-02
Wa25	,199	,276	,224	,254	,277	,159	,549	-2,651E-02
Wa26	,214	,242	,213	,308	,273	,239	,478	3,553E-02
Wa27	,216	,254	,244	,300	,155	,145	,468	7,411E-02
Wa28	,108	,286	,198	,301	,219	,143	,567	-3,518E-02
Wa29	,188	,213	,277	,244	,352	,122	,481	-,165
Wa30	,136	,234	,170	,228	,349	,134	,536	3,791E-02
BS01	,164	,198	,159	,581	,180	,233	,197	,225
BS02	,142	,163	,240	,466	,128	,245	,198	,209
BS03	,143	7,910E-02	,165	,468	,121	,273	,289	,202
BS04	,246	,202	,193	,537	,174	,188	,330	,159
BS05	,220	,259	,242	,501	,219	,136	,252	,263
BS06	,178	,220	,157	,529	,331	,147	,215	9,482E-02
BS07	,177	,176	,283	,537	,218	,127	,184	4,501E-02
BS08	,206	,218	,212	,640	,270	8,208E-02	,190	,105
BS09	,230	,281	,116	,589	,213	8,131E-02	,122	7,382E-02
BS10	,190	,332	,148	,501	,254	,129	9,010E-02	,198
BS11	,208	,254	,252	,576	,145	,159	9,484E-02	9,275E-02
BS12	,213	,321	,235	,553	,167	6,276E-02	,210	1,798E-02
BS13	,147	,246	,215	,551	,254	,124	,211	,112
BS14	,293	,252	,146	,666	,212	,194	,160	,144
BS15	,143	,209	,156	,631	,134	,175	,148	-2,471E-03
BS16	,146	,285	,156	,607	8,351E-02	,179	,128	,112
BS17	,233	,191	,180	,580	,147	,153	,209	,110
BS18	,177	,185	,206	,618	,273	,175	,189	-3,535E-02
BS19	,167	,155	,195	,720	,132	,119	3,979E-02	-5,067E-02
BS20	,179	,231	8,509E-02	,694	,107	,214	,146	2,222E-02
BS21	,108	,201	,135	,659	,247	,174	6,101E-02	-,211
BS22	,197	,181	,210	,659	9,846E-02	,176	,157	-,102
BS23	,185	,201	,179	,641	,251	,137	,105	-9,497E-02
BS24	,141	,209	,117	,722	,135	,191	,143	-9,500E-02
BS25	,168	,247	,154	,639	,178	,166	,206	-6,953E-02
BS26	,193	,306	,132	,604	,157	8,942E-02	,220	-8,875E-02
BS27	,187	,163	,173	,657	,128	,201	5,171E-02	-,133
BS28	9,215E-02	,279	,204	,579	,131	7,005E-02	,214	-3,401E-02
BS29	,169	,273	,198	,568	,174	,154	,182	-1,243E-02
BS30	,148	,198	,166	,681	,208	,162	,123	3,804E-02

Anhang X – Komponentenmatrix zur Hauptkomponentenanalyse der mittels ISSR ermittelten binären Daten (vgl. Abb 44)

Die Rotation ist in 16 Iterationen konvergiert, Varimax mit Kaiser-Normalisierung

	1	2	3	4	5	6	7	8
Be01	,508	-3,772E-02	2,179E-02	6,783E-02	,666	1,539E-02	1,411E-02	,378
Be02	,415	-6,148E-02	,136	6,926E-02	,661	1,085E-03	1,090E-02	,393
Be03	,605	-9,427E-02	8,415E-02	6,792E-02	,571	6,443E-02	5,269E-02	,386
Be04	,410	8,315E-02	-8,232E-02	-,146	,365	-7,554E-03	,138	,380
Be05	,359	5,796E-03	-,107	-3,135E-02	,688	,153	,130	,383
Be06	,339	8,266E-02	-9,201E-02	-9,392E-02	,712	,259	,138	,251
Be07	,659	-,173	,126	2,411E-02	,558	-5,942E-02	-2,544E-02	,218
Be08	,683	-,117	-2,787E-02	-4,941E-02	,243	2,072E-02	-,135	-,181
Be09	,509	6,020E-02	-,256	-,111	,455	-,348	-9,629E-02	-2,439E-02
Be10	,413	,113	1,028E-02	9,065E-02	,666	,194	5,016E-02	-,210
Be11	,216	8,650E-02	,118	,526	,247	,140	-6,409E-02	-,333
Be12	,475	,166	6,739E-02	,376	,405	,176	,149	-,217
Be13	4,923E-02	,348	,117	,423	,399	,294	,124	-,194
Be14	,181	,211	-,173	,176	,672	,102	,113	-9,462E-02
Be15	,571	8,626E-02	9,997E-03	-9,928E-02	,556	,183	,202	,102
Be16	,527	,173	,123	-9,439E-02	,662	,112	-8,735E-02	,163
Be17	,376	-8,185E-02	-3,893E-02	,105	,753	-5,270E-02	-2,823E-02	-4,162E-02
Be18	,474	-,143	,302	4,752E-02	,429	1,369E-02	-,190	,260
Be19	,523	-2,948E-03	2,092E-02	-9,714E-02	,543	-4,751E-02	2,952E-02	-,108
Be20	,538	5,615E-02	8,981E-03	-7,795E-02	,520	-7,287E-02	-8,128E-03	-5,017E-02
Be21	,604	1,480E-03	,188	3,732E-02	,610	,141	-,165	-,103
Be22	,702	5,026E-02	-7,913E-02	-5,535E-02	,304	-,175	,105	-,298
Be23	,493	9,141E-02	-8,824E-02	,287	,102	7,862E-02	9,492E-02	-4,985E-02
Be24	6,352E-02	,406	,149	,228	,523	-3,125E-02	,212	-,177
Be25	,242	9,908E-03	-1,053E-02	,210	,245	,300	,265	6,599E-02
Be26	,337	,117	,184	,185	,675	,164	-1,841E-02	-,125
Be27	,468	-4,757E-02	,187	3,231E-02	,378	,354	,118	-,245
Be28	,527	-,109	,171	-6,025E-02	-8,839E-02	,305	5,726E-02	-,326
Be29	,528	,154	,162	-7,982E-04	-8,991E-02	-6,776E-02	,284	-,321
Be30	,360	8,210E-02	,101	,293	,688	-,109	-,205	-,153
BW01	,652	9,191E-02	-3,705E-02	-8,751E-02	,256	,147	-,257	-,124
BW02	,763	,218	,106	-3,924E-02	,235	-7,845E-03	-,273	8,466E-02
BW03	,695	,302	-8,795E-02	3,105E-03	,202	7,663E-02	-,392	-9,246E-02
BW04	,815	,199	1,888E-02	2,548E-02	6,787E-03	6,234E-02	-,367	-6,275E-02
BW05	,697	,100	-5,188E-02	,196	9,724E-02	,268	1,462E-02	6,345E-02
BW06	,488	,232	-5,814E-02	,355	,196	,314	6,279E-03	7,130E-02
BW07	,666	8,261E-02	,177	,262	-3,129E-02	,133	-2,118E-02	-8,215E-02
BW08	,675	1,404E-02	6,580E-02	,230	,188	,176	-,313	3,847E-02
BW09	,720	1,607E-02	3,778E-02	-1,791E-02	,115	,356	-,316	-,235
BW10	,621	,182	,305	1,936E-02	8,986E-02	,324	-,363	-1,626E-02
BW11	,572	,144	,206	,156	-1,760E-02	,356	-,168	-,288
BW12	,383	,196	,409	7,075E-02	-5,110E-02	,536	-,139	-,286
BW13	,273	,155	,273	,224	,331	,531	,256	-,144
BW14	,302	9,720E-02	-3,735E-02	,194	,655	,410	6,446E-03	3,554E-02
BW15	,506	7,361E-02	,108	4,265E-03	8,567E-02	,509	6,568E-02	-8,231E-02
BW16	,168	4,052E-02	,209	,245	,371	,491	-6,243E-02	1,596E-02
BW17	8,559E-02	,123	,135	,121	3,738E-02	,429	-,334	6,049E-02
BW18	,335	5,604E-03	,167	2,037E-02	,234	,285	-,215	,544
BW19	,544	,220	,325	,316	-7,836E-02	,183	-,277	,145
BW20	,414	7,422E-02	1,848E-02	,102	,391	,329	-,126	,191
BW21	,490	6,779E-02	,270	,192	5,571E-02	,316	-,166	6,221E-02
BW22	,168	,207	,107	,103	,196	,651	2,467E-02	3,524E-02
BW23	,474	,206	-6,592E-02	-5,241E-02	,209	,652	-3,567E-02	-9,412E-02
BW24	,386	,157	-7,528E-02	,256	,245	,662	-6,114E-02	3,598E-02
BW25	,386	,192	,330	,291	,218	5,412E-02	-9,049E-02	,169
BW26	,489	1,630E-02	,144	,245	,208	,395	-,327	-6,876E-02
BW27	,153	6,507E-02	-4,637E-03	,475	,486	,153	-2,799E-02	-,213
BW28	,459	,243	,186	,116	,301	,486	-,170	,142
BW29	,305	,125	,209	,180	,565	,283	-,340	-8,777E-02
BW30	,448	,128	7,852E-02	,238	,470	,150	-,165	-,279
Ha01	,766	4,015E-02	6,510E-02	-8,763E-02	,191	3,980E-02	,135	,218
Ha02	,818	8,543E-02	5,937E-02	-2,003E-02	,210	,239	,108	9,495E-02
Ha03	,729	-3,052E-02	-5,151E-02	-7,222E-02	,340	1,458E-02	,248	,150
Ha04	,826	-8,562E-02	9,568E-03	-7,035E-02	,258	6,215E-02	,284	,164
Ha05	,696	-4,498E-03	6,542E-02	8,281E-02	,231	8,592E-02	,390	,103
Ha06	,671	-8,169E-02	-2,409E-02	-,135	,299	-6,614E-02	,420	,107
Ha07	,733	-2,606E-02	7,586E-02	,216	6,734E-02	,208	,187	,313
Ha08	,555	,158	6,846E-02	-,181	,217	,206	,432	-,318

Ha09	,668	,224	,331	,100	,199	-2,039E-02	,209	-,109
Ha10	,737	,126	,276	-6,342E-02	8,685E-02	-8,123E-02	,260	-,155
Ha11	,779	7,309E-02	4,222E-02	2,018E-02	,199	6,469E-02	5,226E-03	8,978E-02
Ha12	,689	-2,522E-02	-8,362E-02	-,173	8,036E-02	,226	,304	-3,546E-02
Ha13	,797	,103	,317	-5,434E-02	,170	-4,757E-02	,126	-6,371E-02
Ha14	,620	9,506E-02	-4,115E-02	8,295E-03	8,765E-02	,101	,282	-,228
Ha15	,523	,185	-,170	,387	-,127	7,459E-02	-1,653E-02	-,254
Ha16	,643	7,670E-02	4,613E-02	9,651E-02	-2,348E-02	,335	,402	3,624E-02
Ha17	,731	,146	-2,931E-02	8,822E-02	6,422E-02	,214	9,081E-03	,293
Ha18	,712	-,100	-,140	,284	-3,704E-03	,256	,150	,194
Ha19	,601	,104	,280	,105	,473	8,551E-02	-,279	,136
Ha20	,644	2,903E-02	-6,611E-02	,392	,208	-,158	-2,473E-02	,171
Ha21	,707	4,414E-02	,130	7,624E-02	,445	-,175	-9,915E-02	,140
Ha22	,769	-,106	-4,821E-02	,105	,257	-6,235E-02	-3,639E-02	1,405E-02
Ha23	,821	,178	8,277E-02	,250	-,147	-7,743E-02	-,266	,101
Ha24	,568	-2,939E-04	-,177	,353	7,329E-02	,350	,186	-,179
Ha25	,570	-4,197E-02	,222	,398	,105	9,274E-02	-3,333E-02	9,536E-02
Ha26	,590	-,104	-7,893E-02	,444	,132	,140	,318	,149
Ha27	,772	4,866E-02	-,116	8,755E-02	-,146	-,208	-,117	4,057E-02
Ha28	,635	-9,863E-02	7,696E-02	,136	,117	-,112	,496	-4,150E-02
Ha29	,614	-9,181E-02	-5,215E-03	,403	-,132	,116	-,132	5,444E-02
Ha30	,560	,179	,330	-1,775E-02	2,393E-02	-,121	,288	7,461E-02
Hu01	-7,346E-03	,745	-,177	-2,584E-02	4,415E-02	,116	-7,103E-02	,120
Hu02	2,350E-02	,767	-,184	8,101E-02	,141	3,945E-02	6,663E-02	-5,017E-02
Hu03	,197	,579	,146	,118	,161	2,758E-03	-7,429E-02	-2,502E-02
Hu04	,120	,776	2,930E-02	,206	3,527E-02	-5,365E-02	-,278	-3,367E-02
Hu05	-2,562E-02	,428	,175	,334	1,170E-02	,375	,127	-9,877E-02
Hu06	5,861E-03	,482	,261	,363	,230	-5,787E-03	9,901E-02	-,304
Hu07	3,894E-02	,632	7,865E-02	,186	,137	,302	-9,707E-02	-5,945E-02
Hu08	-4,229E-02	,648	6,107E-02	,291	-3,333E-02	,313	7,800E-02	,219
Hu09	,123	,759	,214	,135	9,477E-02	,210	-7,679E-02	,180
Hu10	,129	,648	,422	,351	-,113	8,464E-02	-,133	7,289E-02
Hu11	,301	,733	,214	,209	-1,422E-02	6,787E-02	3,916E-03	,170
Hu12	1,021E-02	,580	,388	3,192E-02	,245	,322	5,745E-02	-7,199E-02
Hu13	9,145E-02	,536	,104	,448	,120	8,045E-03	-,193	-4,188E-02
Hu14	-1,762E-02	,672	,337	,198	,139	9,728E-02	-7,300E-02	-,370
Hu15	,162	,699	5,739E-02	,119	-,142	,123	-,265	,198
Hu16	-6,173E-02	,439	,496	,138	,204	,297	-,225	-,154
Hu17	,431	,617	8,982E-02	,226	-9,531E-02	,263	,132	-,158
Hu18	,140	,470	,582	,181	-,107	,133	1,387E-02	-,155
Hu19	-3,889E-02	,531	,404	,301	,184	,183	,164	,156
Hu20	9,211E-02	,577	,330	,221	6,192E-02	,131	-,242	-,268
Hu21	9,444E-02	,595	,334	,175	3,536E-02	-,108	-2,897E-02	-,270
Hu22	8,595E-02	,476	,407	-9,420E-03	,255	,174	-,315	-,286
Hu23	6,624E-02	,654	5,965E-02	,323	,113	,329	,210	1,520E-02
Hu24	,124	,734	9,455E-02	,400	3,463E-02	5,686E-02	-,198	-,174
Hu25	-6,340E-03	,593	,325	2,711E-02	-8,324E-02	-3,573E-02	-2,461E-02	-,123
Hu26	4,206E-02	,698	,143	-,106	-3,649E-02	7,255E-02	,309	7,784E-02
Hu27	,209	,532	7,992E-02	3,017E-02	5,572E-02	,339	,138	,211
Hu28	-,129	,407	8,371E-02	-6,045E-02	9,926E-02	,563	-1,222E-02	1,130E-02
Hu29	-9,121E-02	,633	,152	-6,700E-02	,395	,239	,119	,140
Hu30	-5,219E-02	,687	,322	-1,088E-02	4,950E-02	,305	,272	-5,021E-02
So01	,180	,326	,506	,180	1,663E-02	-6,153E-02	,445	-7,633E-02
So02	,387	,605	,434	,221	-,146	-6,271E-03	5,209E-02	-,122
So03	,151	,669	,390	,109	-,210	6,819E-02	,289	2,827E-02
So04	,146	,500	,561	,167	,161	3,154E-02	1,058E-02	3,391E-02
So05	,167	,254	,353	,234	-,162	3,139E-02	-3,494E-02	8,400E-02
So06	-9,753E-02	,502	,368	-,128	-,239	-,129	-1,591E-02	,346
So07	,192	,403	,507	,112	-5,722E-02	-,210	6,675E-02	-1,586E-02
So08	5,912E-02	,485	,260	2,978E-03	,236	2,605E-02	-2,130E-02	,232
So09	1,884E-02	,332	,457	-2,956E-02	-9,217E-02	,477	5,434E-02	,221
So10	5,061E-02	,327	,525	7,940E-02	,117	,449	,302	-,167
So11	8,894E-02	,554	,375	-,133	-1,773E-02	8,819E-02	,357	8,834E-02
So12	6,273E-02	,392	,410	-7,239E-02	,126	,149	2,172E-02	-,226
So13	,145	,543	,572	-3,928E-02	2,618E-02	3,316E-02	-8,654E-02	2,374E-02
So14	-2,345E-02	,571	,269	,174	5,605E-02	8,924E-03	,351	,124
So15	6,683E-02	,528	,391	-,168	,130	5,630E-02	8,346E-02	-,148
So16	5,572E-02	,531	,454	6,974E-02	-9,927E-02	-,158	-,164	,152
So17	-,376	,560	,299	-3,082E-03	,200	,278	,114	-8,144E-02
So18	-1,068E-03	,340	,397	,356	4,012E-02	,139	-,379	5,561E-02
So19	,117	,418	,587	6,641E-02	,209	-,120	,233	4,969E-02
So20	,236	,421	,213	-6,710E-04	6,424E-03	,250	,219	,147
So21	,160	,118	,582	-,134	,173	9,546E-02	,218	-8,901E-02
So22	6,134E-02	,680	,434	,230	-9,701E-02	-1,245E-02	-,156	4,149E-02
So23	-,166	,446	,489	,124	,114	9,511E-03	2,452E-02	,256
So24	,147	,469	,380	-,119	,323	,153	,108	6,776E-02
So25	9,813E-02	,639	,270	-,171	-,179	,299	,186	-,178

So26	6,162E-02	,166	,332	-,297	,181	,397	7,460E-02	3,952E-02
So27	-1,210E-02	,720	,381	-2,763E-02	-7,973E-04	,215	,117	-8,259E-02
So28	5,448E-02	,306	,310	,351	,137	,469	7,025E-02	,242
So29	,350	,289	,411	,195	5,815E-02	-,128	-4,030E-02	,234
So30	6,060E-02	,130	,584	2,561E-02	,291	,277	-4,595E-02	,162
Wa01	7,932E-02	,191	-5,609E-03	,786	7,481E-02	1,281E-02	-,174	-,132
Wa02	,172	8,385E-02	,262	,729	1,846E-02	,102	,147	1,369E-02
Wa03	2,322E-02	4,890E-02	,246	,766	-3,493E-02	,189	-5,067E-02	-,171
Wa04	-,137	,254	,185	,545	7,920E-02	,427	,140	-,246
Wa05	,147	-,106	,257	,569	-7,303E-02	,188	,521	,146
Wa06	-,109	,322	-5,934E-02	,249	,186	,282	,124	,298
Wa07	,193	,354	,157	,369	-9,993E-02	,230	,509	,176
Wa08	,190	,132	-,127	,297	,341	,229	,471	-,111
Wa09	4,198E-02	,312	-5,840E-02	,485	6,801E-03	,159	-,101	6,442E-02
Wa10	,130	,283	,179	,667	,152	4,918E-03	-4,575E-03	8,189E-02
Wa11	-9,372E-02	,400	-,155	,450	-1,031E-02	,286	-5,374E-02	3,609E-02
Wa12	-7,637E-02	,398	,298	,503	-,100	,266	-,297	,125
Wa13	,178	,385	8,316E-02	,488	-,132	,283	-,128	-,214
Wa14	-5,648E-02	,444	6,204E-03	,479	-6,455E-02	,365	-,107	,263
Wa15	-2,503E-02	,160	,314	,392	9,597E-02	,564	9,224E-02	,119
Wa16	5,573E-02	6,941E-02	5,385E-02	,465	,129	2,617E-02	,146	,298
Wa17	,203	-3,643E-02	,371	,652	1,800E-02	,148	,157	,155
Wa18	,224	,266	6,439E-02	5,842E-02	-,237	,464	,437	6,366E-02
Wa19	,392	-5,071E-02	,205	,625	,147	3,317E-02	5,412E-02	,134
Wa20	-1,797E-02	,185	,373	,478	,225	,219	6,605E-03	8,636E-03
Wa21	,286	,235	,268	,344	1,185E-02	,563	,164	7,942E-02
Wa22	6,965E-02	,270	6,060E-02	,741	5,219E-03	-,151	8,707E-02	1,767E-02
Wa23	,153	7,319E-02	,446	,307	-2,199E-02	,544	,110	-,342
Wa24	7,247E-02	,139	,224	,342	-8,866E-02	3,184E-02	,231	,503
Wa25	,178	-1,549E-03	,405	,259	-4,263E-03	,526	-1,883E-03	-,321
Wa26	,221	,193	-3,411E-02	,434	-2,608E-02	7,449E-02	9,617E-02	,587
Wa27	,195	9,423E-02	,336	,383	3,760E-02	,561	-7,261E-03	-,245
Wa28	,200	1,279E-02	,372	,606	,139	-2,966E-03	,222	,199
Wa29	-8,021E-02	,253	,364	,412	9,993E-02	,586	8,137E-02	-9,886E-02
Wa30	,194	,236	,209	,422	,172	,295	-,120	,238
BS01	2,080E-02	,113	,727	,119	-,260	,301	-,115	-3,472E-02
BS02	-,113	,293	,643	,186	-,245	3,699E-02	-,186	2,313E-02
BS03	4,968E-02	,255	,683	,133	-,387	,291	-,101	-6,535E-02
BS04	7,723E-02	,457	,743	5,284E-02	-,156	,193	-5,062E-02	-2,536E-02
BS05	,190	,156	,351	7,069E-02	1,719E-02	,630	-,159	,324
BS06	9,168E-02	,130	,428	-9,857E-03	-4,605E-02	,556	1,593E-02	,356
BS07	1,017E-02	,426	,419	-,195	-,148	,447	-,116	,298
BS08	,142	,187	,516	-,241	-,163	,400	2,656E-02	,266
BS09	,122	7,394E-03	,462	,156	9,437E-03	,471	,260	1,509E-02
BS10	9,175E-02	4,887E-03	,560	-,334	7,940E-02	,166	3,798E-02	,435
BS11	3,034E-03	,171	,579	-9,539E-02	,197	,285	-,196	,124
BS12	-7,048E-02	9,037E-02	,677	,106	3,516E-02	,211	2,847E-02	4,145E-02
BS13	3,916E-02	,131	,700	,250	,155	,221	-9,991E-02	3,440E-02
BS14	-8,828E-02	,235	,688	7,577E-02	,101	4,446E-02	,169	-,298
BS15	2,664E-02	,388	,537	6,691E-02	,273	,402	-4,010E-02	,240
BS16	-4,179E-02	,338	,626	-1,698E-02	,239	3,834E-03	-,121	-2,305E-02
BS17	-8,138E-03	,192	,751	,254	,209	,195	,164	5,319E-02
BS18	-5,724E-02	,198	,511	,241	-3,500E-02	-3,433E-02	,514	,276
BS19	-4,362E-02	,456	,509	,246	8,929E-02	,336	7,503E-02	-5,783E-02
BS20	3,590E-02	8,539E-02	,623	,420	1,960E-02	5,463E-02	-1,061E-02	7,006E-02
BS21	-4,723E-02	,158	,636	,375	-,363	,180	-,135	,131
BS22	-,243	,493	,533	,321	2,521E-02	-,108	-,173	-,128
BS23	,166	,373	,602	5,210E-02	-,272	-8,490E-02	6,317E-02	3,735E-02
BS24	,270	3,681E-02	,627	1,140E-02	,153	,145	2,441E-02	-,262
BS25	,125	-,157	,517	-,273	,380	,196	-9,034E-02	-,178
BS26	,177	7,956E-02	,567	7,750E-02	,135	,377	-,241	2,794E-02
BS27	-,129	,541	,431	,119	-2,109E-02	-,117	-2,820E-02	,273
BS28	6,844E-02	,208	,821	,115	-,105	-7,020E-02	5,099E-02	8,064E-02
BS29	8,352E-02	,111	,772	,158	-,137	8,192E-02	,183	-7,301E-02
BS30	-6,097E-02	,114	,770	,226	,138	,147	9,254E-02	1,185E-02

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Markus Quack
Geburtsdatum	11. April 1972 in Neunkirchen/Saar
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

07/1978 - 06/1982	Besuch der Grundschule, Theley
08/1982 – 05/1991	Besuch des Arnold-Janssen-Gymnasium, St. Wendel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1991 – 04/1993	Studium der Erziehungswissenschaften und der Soziologie, an der Universität des Saarlandes
05/1993 – 08/1998	Studium der Geographie , Fachrichtung Biogeographie, an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, mit den Schwerpunkten: • Biogeographie: Biomonitoring und Bioindikation • Physische Geographie: Geomorphologie und Bodenkunde
Diplomarbeit	Populationsgenetische Untersuchungen an Brassen (*Abramis brama* L.) aus der Elbe zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Probenahmen im passiven Biomonitoring
August 1998	Abschluss als Diplom-Geograph der Fachrichtung Biogeographie der Universität des Saarlandes

Berufstätigkeit

08/1994 – 07/1998	wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität des Saarlandes, Institut für Biogeographie
08/1998 – 07/2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes, Institut für Biogeographie
08/2000 – 02/2001	wissenschaftliche Hilfskraft m.A. an der Universität Trier, Fachberich VI, Geographie/Geowissenschaften – Fachrichtung Biogeographie
seit 03/2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Trier, Fachbereich VI Geographie/Geowissenschaften – Fachrichtung Biogeographie