

## Neue Perspektiven für die Prüfung der Authentizität von Forstsaatgut

**Karl Gebhardt<sup>1</sup> und Hilmar Förstef<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Hann. Münden

<sup>2</sup>TÜV Rheinland Agroisolab GmbH, Jülich

### Einleitung

Die Anfänge der Prüfung von Saatgut sind in einer bemerkenswerten Veröffentlichung der landwirtschaftlichen Versuchsanstalt zu Tharand, verfaßt im Jahr 1869 von Friedrich Nobbe dokumentiert (STEINER, 2000). Darin finden sich Hinweise zur Methodik, zur Probenahme vor Zeugen, zur Ziehung repräsentativer, homogener Proben und ihrer Mindestgröße als auch die Empfehlung der Einlagerung von Rückstellmustern wie sie heute bei forstlichem Saatgut praktiziert wird.

Forstliches Saatgut entsteht periodisch neu in sog. „zugelassenen Beständen“, für deren Elterngeneration ihre besonderen Qualitäten in jahrzehntelangen Herkunftsversuchen nachgewiesen wurden. Nachlassende oder ungenügende Kontrolle begünstigt die Verwendung nichtangepasster Herkünfte, führt zu Schäden der Waldentwicklung, Gewinneinbußen der Forstbetriebe, hohen Folgekosten für Ersatzaufforstungen und Vermeidung oder Reparatur von Umweltschäden. Für gesetzestreue Erzeuger von forstlichem Vermehrungsgut ergeben sich bei mangelnder Herkunftskontrolle Wettbewerbsnachteile.

Forstliches Saatgut zu ernten erfordert deshalb besondere Anstrengungen und Nachweispflichten. In Buchenbeständen müssen großflächig Netze ausgelegt und wieder eingesammelt werden. In Tannen- und Fichtenbeständen muss das Saatgut von einzelnen Bäumen in schwindelerregender Höhe von Hand gepflückt werden. In Kirschenbeständen werden schwere Maschinen eingesetzt, die auch dicke Stämme zu schütteln vermögen, siehe Abbildung 1.



Abbildung 1: Einsatz eines mechanischen Schüttlers zur Ernte von Wildkirschen in einem zugelassenen Bestand.

Samenplantagen fruchten nicht jedes Jahr und oftmals ist der Saatgutertrag nur gering. Um die genetische Vielfalt einer Saatgutpartie sicherzustellen, sind Mindestzahlen der zu beerntenden Bäume eines Bestandes festgesetzt. Saatgutpartien der dem Forstvermehrungsgutgesetz unterliegenden Baumarten sind durch ein amtliches Stammzertifikat gekennzeichnet, das neben den Angaben zur Saatgutquelle auch Angaben zur Erntemenge, zum Reifejahr, Ernteverfahren, Empfänger und Lieferanten enthält.

Doch der europaweite Handel versucht die Kundenwünsche jederzeit zu erfüllen und nutzt manchmal auch unlautere Mittel. Um Kontrollen wirksam zu machen, bedarf es sicherer Methoden zum Nachweis der Authentizität von Saatgutpartien. Im Rahmen eines BMBF-Forschungsvorhabens (FKZ 0330587) bei dem sich neben dem Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht in Teisendorf und der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt in Hann Münden auch die Agroisolab GmbH in Jülich beteiligten, wurden nun erstmalig neben genetischen Methoden auch Stabilisotope zum Herkunftsnachweis genutzt.

## Grundlagen

Bis auf den Sauerstoff und den Schwefel, bestehen die Elemente (Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff), die den Hauptteil der Biomasse ausmachen, aus zwei stabilen Isotopen. Lediglich Sauerstoff und Schwefel bestehen noch aus einem dritten, selteneren stabilen Isotop, von dem aber allgemein angenommen wird, dass es in gleicher Weise fraktioniert wird und damit keine neuen Informationen zum Ergebnis beitragen kann. Dabei hat das schwerere Isotop, das zum Vergleich herangezogen wird, jeweils einen geringeren Anteil (Tabelle 1), siehe auch FRY (2006).

Element	Massen	Relative Häufigkeit in % leichtes/schweres Isotop
<b>C</b> (Kohlenstoff)	12 / 13	98,892 / 1,108
<b>O</b> (Sauerstoff)	16 / 18	99,759 / 0,204
<b>H</b> (Wasserstoff)	1 / 2	99,985 / 0,015
<b>N</b> (Stickstoff)	14 / 15	99,636 / 0,364
<b>S</b> (Schwefel)	32 / 34	95,045 / 4,214

Tabelle 1: Relative Häufigkeit und Massen der „Bioelemente“

Die Konzentrationsverhältnisse dieser natürlichen Isotope variieren aufgrund biochemischer, klimatischer, anthropogener und geologischer Faktoren. So unterscheiden sich Pflanzen mit unterschiedlichen biochemischen Stoffwechselfaden (C3, C4, CAM) in ihren Isotopensignaturen des Kohlenstoffs. Die beiden Elemente, die das Wasser bilden, unterliegen andererseits einer physikalisch bedingten Fraktionierung. Bei der Wolkenbildung aus dem Meer werden die leichteren

Isotope des Wassers angereichert und bei der Wolkenwanderung über die Kontinente verstärkt sich dieser Effekt. Vereinfacht lässt sich sagen, dass sich die Isotopenverhältnisse von Sauerstoff und Wasserstoff mit größerem Abstand vom Meer ändern. Die Isotopenverhältnisse des Schwefels und Stickstoffs werden sowohl durch lokale Gegebenheiten als auch durch die Nutzung fossiler Brennstoffe verändert. Solche An- und Abreicherungen stabiler Isotope bilden die Grundlage für Unterschiede zwischen Saatgutpartien aus unterschiedlichen Beständen und Reifejahren.

### Bestimmungsmethodik

Die „Isotope Ratio Mass Spektroskopie“ (Isotopen-Verhältnis-Massen-Spektrometrie, kurz IRMS) erlaubt eine sehr genaue Bestimmung der Abweichung des Isotopenverhältnisses einer Probe relativ zu einem international festgelegten Standardmaterial des entsprechenden Elementes. Diese Materialien sind so ausgewählt worden, dass sie das bedeutendste Reservoir des jeweiligen Elementes widerspiegeln, für Wasser in diesem Falle den Ozean. Dafür wird ein  $\delta$ -Wert definiert, der angibt, um wieviel Promille ein Material in seiner stabilisotopen Zusammensetzung von diesem international definierten Nullpunkt, dem Primärstandard (Primary Reference Material, siehe Tabelle 2) abweicht. Die zentral verantwortliche Stelle ist die Internationale Atomenergiebehörde (IAEA) in Wien in Zusammenarbeit mit dem National Bureau of Standards and Technology (NIST) der USA in Gaithersburg.

Name	Isotope	$\delta$ in [‰]	Bemerkung
PDB	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0	PeeDee Belemnite (Fossiler Tintenfisch)
SMOW	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ $^2\text{H}/^1\text{H}$	0 0	Standard Mean Ocean Water
GISP	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ $^2\text{H}/^1\text{H}$	- 24,8 vs VSMOW - 189,5 vs VSMOW	Greenland ICE Sheet Precipitation (water)
PEF (IAEA-CH-7)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	- 31,8 vs PDB	Polyethylenfolie
Saccharose (IAEA-CH-6)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	- 10,4 vs PDB	
Ammonium Sulfate (IAEA-N-1)	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	20,3 vs Air- $\text{N}_2$	

Tabelle 2: Internationale Standards (Auswahl einiger von Agroisolab GmbH verwendeter Standards)

Der  $\delta$ -Wert (Delta-Wert) in ‰ errechnet sich nach der Formel

$$\delta = \frac{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Probe})} - {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Standard})}}{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Standard})}} \cdot 1000$$

$$\delta = \left( \frac{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Probe})}}{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{(\text{Standard})}} - 1 \right) \cdot 1000$$

mathematisch vereinfacht

Zur Messung werden speziell konstruierte Massenspektrometer eingesetzt (BRAND, 1996). Da nur für einfache Messgase die geforderte hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden kann, muss das Material bei hohen Temperaturen umgesetzt werden, entweder durch Verbrennung oder durch Pyrolyse. Daher wurde eine Kombination von Elementanalysator und IRMS entwickelt, wie sie in der heutigen Lebensmittelanalytik routinemäßig zum Einsatz kommt (BONER & FÖRSTEL, 2004).

Den Messaufbau zeigt die folgende Abbildung:

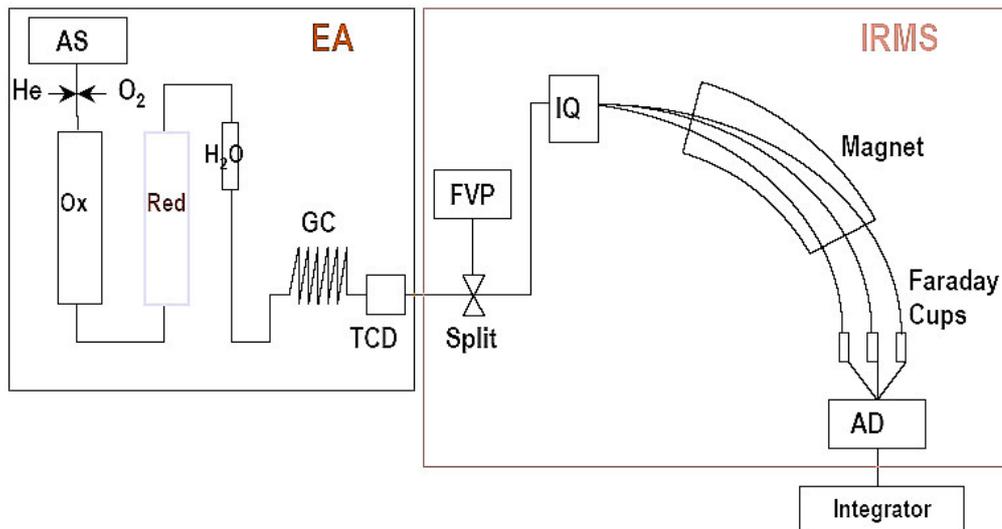


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Messanordnung für das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis; Kopplung von Elementanalysator (EA) und Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS). (AS: Autosampler; Ox: Verbrennungszone; Red: Reduktionsrohr; GC: Gaschromatograph; TCD: Wärmeleitfähigkeitsdetektor; FVP: Diluter; Split: Open-Split-System; IQ: Ionenquelle; AD: Analog-Digital-Umwandler), siehe FÖRSTEL (2008)

Dazu werden die in Zinn- oder Silberkapseln eingewogenen organischen Proben entweder mit oder ohne Sauerstoffzufuhr verbrannt. Bei Sauerstoffzufuhr kann das entstehende Messgas  $\text{CO}_2$  für die Bestimmung von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  analysiert werden. Für das Stabilisotopenverhältnis von  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  wird  $\text{N}_2$  gemessen, das sich nach vollständiger Reduktion der stickstoffhaltigen Verbrennungsprodukte bildet. Sowohl aus den massenspektrometrischen Signalen der Messgase  $\text{CO}_2$  und  $\text{N}_2$  als auch mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor kann der Gehalt von C und N bestimmt werden. Eine unvollständige Verbrennung unter Kohlenstoffüberschuß (Pyrolyse) erlaubt die Bestimmung von  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  sowie die Bestimmung des Isotopenverhältnisses von schwerem und leichtem Wasserstoff ( $^2\text{D}/^1\text{H}$ ).

Die gesamten IRMS-Messungen werden einer mehrstufigen Kontrolle und Kalibration unterworfen:

1. Grundlage der Kalibration bildet der Internationale Laborstandard, bei Stickstoff z.B. IAEA-N1
2. In jeder Messreihe werden laborinterne Standards, die gegen die internationalen Standardmaterialien kalibriert worden sind, mit gemessen.
3. Jede einzelne Messung wird mit einem Referenzgas abgeglichen.

Mit diesen mehrstufigen Kalibrationen wird die angestrebte hohe Präzision der Messungen kontrolliert.

## Ergebnisse

Stabilisotopen prägen das Saat- und Pflanzgut aller untersuchten Baumarten unabhängig von der genetischen Abstammung entsprechend der am Ernteort gegebenen Stabilisotopenverhältnisse. Da das Saatgut die isotope Zusammensetzung seines Ursprungs unverfälschbar widerspiegelt, wird auch von einem „isotopen Fingerabdruck“ gesprochen.

Untersucht wurden die dem Forstvermehrungsgutgesetz (FoVG) unterliegenden Arten: Buche, Stiel- und Traubeneiche, Douglasie, Fichte, Tanne, Hybridlärche, Winterlinde, Roterle, Vogelkirsche, Berg- und Spitzahorn sowie Pappelhybriden. Die Analysenwerte erwiesen sich als abhängig von der Art, den untersuchten Gewebeteilen bzw. Pflanzenorganen (Samen, Knospen, Rinde), dem Reifejahr und dem Ernteort. Die resultierenden Vergleichswerte (Deltawerte  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^2\text{D}/^1\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  und  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  sowie die C- und N-Gehalte) erlauben in einer multivariaten Betrachtung die Differenzierung gleicher Gewebeteile bzw. Pflanzenorgane bezüglich ihrer geografischen Herkunft bei gleichem Reifejahr (GEBHARDT & SCHÖNFELDER, 2008). Baumarten- und standortspezifisch zeigen unterschiedliche Stabilisotope signifikante Differenzen zwischen Herkünften. Am Beispiel von Buchenbestandsernten aus fünf hessischen Forstämtern konnte gezeigt werden, dass eingelagertes Saatgut auch in kleinen Teilmengen (1kg) anhand der Analysenwerte den Ausgangsbeständen sehr sicher zugeordnet werden kann.

Bei der Zuordnung von Einzelbaumabsaaten verursachen die kleinstandörtlichen Unterschiede eine größere Streuung der Analysenwerte und erhöhen die Fehlerrate. Von 127 zufällig gezogenen Saagutpartien deutscher Roterlen-Herkünfte (aus 19 Orten und 16 Reifejahren) konnten anhand der Stabilisotopenwerte und Elementgehalte 84 % der bezeichneten Herkunft zugeordnet werden. Die Sicherheit der Zuordnung wird im Rechenverfahren (Diskriminanzanalyse) für jede untersuchte Saatgutpartie mit Prozentwerten ausgewiesen und kann somit auch 100 % betragen. Wie am Beispiel von außerhessischen Buchen-Saatgutpartien gezeigt, können fallweise auch falsch deklarierte Saatgutpartien allein anhand ihrer Analysenwerte als nichtzugehörig identifiziert werden (GEBHARDT, 2008).

Auch am Beispiel von Beständen des Bergahorns, der Fichte und der Weißtanne konnte gezeigt werden, daß zwischen den Ernten aus diesen Beständen signifikante Unterschiede der Deltawerte verschiedener stabiler Isotopen ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ) bestehen und eine sichere Zuordnung von einzelbaumweise geernteten Saatgutpartien zu den Erntebeständen mithilfe der Diskriminanzanalyse möglich ist (GEBHARDT et al., 2008).

Die Ergebnisse der von der Fa. Agroisolab durchgeführten Hauptkomponentenanalyse mit den Stabilisotopen-Werten der Elemente CHON und S, siehe Abbildung 3, zeigen eine gute Trennung der Saatgutbestände nach einer rechnerischen Glättung der Mittelwerte. Zur Untersuchung kamen die Saatgutproben der beernteten Einzelbäume jeden Bestandes, die trotz kleinstandörtlicher Unterschiede ähnliche Gruppenmerkmale aufweisen.

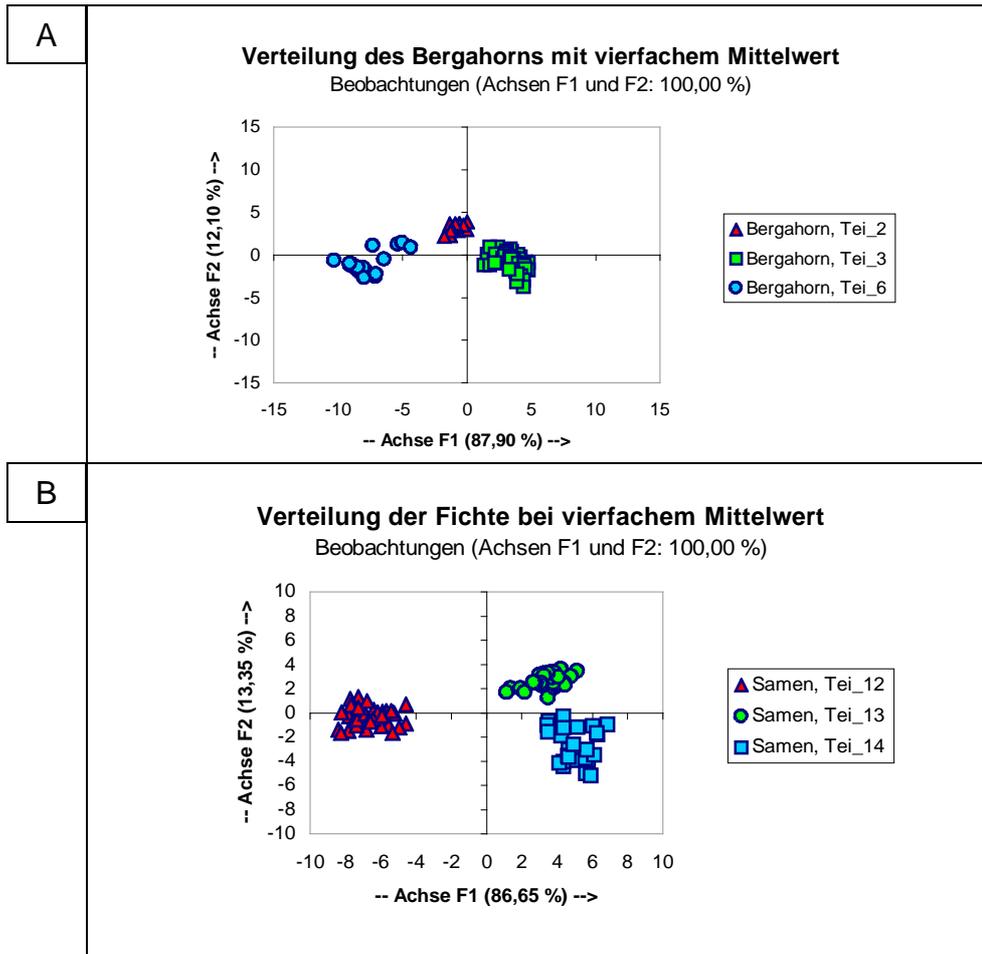


Abbildung 3: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse der Isotopenmuster von  $^{18}O/^{16}O$ org, D/Horg,  $^{13}C/^{12}C$ ,  $^{15}N/^{14}N$ ,  $^{34}S/^{32}S$  für Samenproben von Einzelbäumen des Bergahorns (A) und der Fichte (B) aus jeweils drei zugelassenen Beständen [Bergahorn: Königshofen (Tei\_2), Weißenhorn (Tei\_3) und Hohenschwangau (Tei\_6); Fichte: Altötting (Tei\_12), Weißenhorn (Tei\_13) und Ravensburg (Tei\_14)], siehe Konnerth et. al. (2008).

Wie bei den schon eingeführten genetischen Methoden der Herkunftskontrolle müssen zur Rückverfolgung von Saatgutproben Referenzproben jedes Reifejahres verfügbar sein. Da die Saatgutproben von Einzelbaumernten eines Bestandes ähnliche Gruppenmerkmale besitzen ist es möglich, solche Einzelbaumernten den Ausgangsbeständen zuzuordnen. Der Nachweis der Abstammung von Einzelbaumernten von den bezeichneten Erntebäumen muß allerdings mit Hilfe genetischer Methoden erfolgen, da sich in Knospen andere Stabilisotopenverhältnisse als im Saatgut darstellen. Diese und die oben erwähnten Ergebnisse des BMBF-Forschungsverbundes „Herkunftskontrolle“ sind im Tagungsband „Herkunftskontrolle an forstlichem Vermehrungsgut mit Stabilisotopen und genetischen Methoden“ ausführlich dargestellt. Der Tagungsband findet sich im Internet: ([http://www.nw-fva.de/Herkunftskontrolle/Symposium\\_Tagungsband.pdf](http://www.nw-fva.de/Herkunftskontrolle/Symposium_Tagungsband.pdf)).

## Literatur

- BONER, M.; FÖRSTEL, H. (2004): Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:301-310
- BRAND, W.A. (1996): High Precision Isotope Ratio Monitoring Techniques in Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 31:225-235
- FÖRSTEL, H. (2008): Die natürliche Variation und die Messung der stabilen Isotope als Kontrollmethode. In: „Herkunftskontrolle mit Stabilisotopen und genetischen Methoden.“ Ed. K. Gebhardt, ISBN 978-3-00-024808-5, p. 16-37
- FRY, B. (2006): *Stable isotope ecology*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA
- GEBHARDT, K. (2008): Unterscheidung von Saatgutpartien der Buche und Roterle anhand der Stabilisotopen-Signaturen ( $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ) und Elementgehalte von Kohlenstoff und Stickstoff. In: „Herkunftskontrolle mit Stabilisotopen und genetischen Methoden.“ Ed. K. Gebhardt, ISBN 978-3-00-024808-5, p. 51-66
- GEBHARDT, K.; KONNERT, M.; FÖRSTEL, H. (2008): Nachweis der Herkunft von Saatgutpartien des Bergahorns, der Fichte und der Weißtanne mit Hilfe stabiler Isotopen. In: „Herkunftskontrolle mit Stabilisotopen und genetischen Methoden.“ Ed. K. Gebhardt, ISBN 978-3-00-024808-5, p. 101-110
- GEBHARDT, K.; SCHÖNFELDER, E. (2008): Differentiation of seedlots of wild cherry by the analysis of stable isotopes ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). *Austrian Journal of Forest Science* 125: 121-134
- KONNERT, M.; CREMER, E.; FÖRSTEL, H. (2008): Umsetzung und Verbesserung des ZüF-Verfahrens mit Hilfe genetischer Analysen und der Stabilisotopen-Methode am Beispiel von Bergahorn, Fichte und Weißtanne. In: „Herkunftskontrolle mit Stabilisotopen und genetischen Methoden.“ Ed. K. Gebhardt, ISBN 978-3-00-024808-5, p. 85-101
- STEINER, A.M. (2000) 125 Jahre Vorschriften zur Saatgutuntersuchung - die erste Versammlung der Vorstände von Samencontrol-Stationen zu Graz 1875. In: Bericht über die 51. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, BAL Gumpenstein, 21.-23. Nov. 2000, 77-84