



Universität für Bodenkultur Wien
Department für Integrative Biologie
und Biodiversitätsforschung

Populationsanalysen einer natürlich vorkommenden Blütenvariante des Hirtentäschels, *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.

Theresia Unterfrauner (Matrikelnr.:0740914)
Studium: Agrarbiologie (459)
theresia.unterfrauner@gmx.at

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades Diplomingenieurin (Dipl. Ing.)
an der Universität für Bodenkultur

Erstbetreuer: Univ.Prof. Dipl. Geograph Dr. Karl Georg Bernhardt

Zweitbetreuer: Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Steffen Hameister

Institut für Botanik (H831)

Vorstand: Univ.Prof. Dipl.Geograph. Dr. Karl Georg Bernhardt

DANKSAGUNG

In diesem Zuge möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Bernhardt, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an seinem Institut zu schreiben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Steffen Hameister für die fachliche Betreuung der Masterarbeit. Einen großen Dank für die lebendigen Diskussionen, das inhaltliche Engagement, die konstruktive Kritik, für die hilfreichen Tipps und Ratschläge und eine gute Portion Humor.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Karin Fohringer, die mir die Angst vor dem Labor genommen hat und mit viel Geduld, beruhigenden Worten, einigen Lebensweisheiten und hervorragenden Kaffee dafür gesorgt hat, dass ich mich gern an die Laborzeit zurückerinnere!

Des Weiteren gilt mein Dank allen Personen und Freunden, die hier nicht erwähnt sind, die mich bei der Vollendung dieser Masterarbeit unterstützt haben. Danke für die moralische Unterstützung und die aufmunternden Worte und die gemeinsame Zeit! Ob es nun die bequemen Serienabende auf der Couch waren, das gemütliche Zusammensitzen bei einem feinen Essen oder ausgelassenes Feiern bis in die frühen Morgenstunden! Danke!

Lieben Dank auch an meinen Freund, der mich in allen Lebenslagen unterstützt hat und all mein Stolpern abdämpft.

An letzter Stelle möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die immer für mich da war.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG.....	II
Kurzfassung.....	V
Schlagwörter.....	V
Abstract.....	VI
Keywords.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Evolution und Verbreitung des Genus <i>Capsella</i>	2
1.2 Beschreibung der Art <i>Capsella bursa-pastoris</i>	3
1.3 Konservierte Blütenmorphologie der Brassicaceae.....	3
1.4 MADS-BOX-Gene und der florale Bauplan.....	4
1.4.1 Der <i>Spe</i> -Phänotyp und sein genetischer Hintergrund.....	6
1.5 Der <i>Spe</i> -Phänotyp: Ökologie und Fitness.....	7
1.6 Stand der Forschung.....	7
1.7 Hypothesen, Forschungsfragen und Ziele.....	8
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Untersuchungsregion.....	10
2.2 Mörsern der Probe.....	11
2.3 DNA-Isolation.....	11
2.4 Qualitativer DNA-Nachweis und Kontrolle des RNA-Verdau.....	11
2.4.1 NanoDrop-Messung.....	11
2.4.2 Agarosegel.....	11
2.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	12
2.5.1 Restriktion-Ligation.....	12
2.5.2 Präselektive Amplifikation.....	14
2.5.3 Selektive Amplifikation.....	15
2.5.4 Aufreinigung der Proben.....	16
2.5.5 Test zur Reproduzierbarkeit der AFLP-Daten.....	17
2.6 DNA-Sequenzierung.....	17
2.6.1 Probenauswahl.....	17
2.6.2 PCR.....	18
2.6.3 ExoFastAp-Verdau.....	19
2.6.4 Sequenzreaktion.....	19
2.6.5 Sephadexaufreinigung.....	19
2.7 Datenauswertung.....	20

2.7.1	Auswertung der AFLP-Daten.....	20
2.7.2	Gene Mapper5	20
2.7.3	Gene Marker & Bearbeitung der binären Matrize.....	21
2.7.4	Reduktion der Datenmatrix mit Excel 2007	21
2.7.5	Prüfung der molekularen Diversität.....	22
2.7.6	Distanzbasierte Analyse der Populationsstruktur.....	22
2.7.7	Modellbasierte Analyse der Populationsstruktur	22
2.7.8	Auswertung der Sequenzdaten: Chloroplasten-DNA-Daten und AGdel-Daten.....	23
3.	Ergebnisse	24
3.1	AFLP.....	24
3.1.1	Molekulare Diversität	24
3.1.2	Analyse der molekularen Varianz	26
3.1.3	Manteltest: Beziehung zwischen geographischen und genetischen Distanzen in <i>Spe</i>	27
3.1.4	Principal Coordinates Analysis (PCoA)-Gesamtdatensatz.....	28
3.1.5	Software STRUCTURE.....	29
3.2	Sequenzierung	30
3.2.1	Alignments trnL und AGdel mit Gelbildvergleich.....	30
4.	Diskussion	32
4.1.1	Unterschiede der molekularen Diversität zwischen den Blütenvarianten	32
4.1.2	Entstehungsgeschichte von <i>Spe</i>	36
4.1.3	Molekulare Ursache von <i>Spe</i>	38
5.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	41
	Quellenverzeichnis.....	I
	Abbildungsverzeichnis	V
	Tabellenverzeichnis.....	VII
6.	Anhang	1
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
6.2	Probenverwaltung	3
6.3	Genetische versus Geographische Distanz	10
6.4	PCoAs	12
6.5	STRUCTURE	14
6.6	Sequenzierung	16

Kurzfassung

Die Familie der Brassicaceae ist generell durch eine stark konservierte Blütenmorphologie gekennzeichnet. Abweichungen von diesem einheitlichen Bauplan werden häufig in Zusammenhang mit Artbildungsprozessen untersucht. Forschungsobjekt dieser Masterarbeit ist eine besondere Blütenvariante des Hirtentäschels, *Capsella bursa-pastoris*, in welcher die vier weißen Kronblätter in vier zusätzliche funktionsfähige Staubblätter umgewandelt sind. Es handelt sich hierbei um eine natürlich vorkommende florale homöotische Mutation und der Phänotyp wurde als *Stamenoid Petals (Spe)* beschrieben. Die *Spe*-Variante ist nur von wenigen mitteleuropäischen Populationen beschrieben und tritt dort sympatrisch mit der wildtypischen *C. bursa-pastoris* auf.

Mittels genetischen Fingerabdrucks (AFLPs) wurden 11 Populationen aus Österreich (5) Tschechien (4) und Deutschland (2) untersucht. Analysiert wurde, ob die blütenblattlose Variante auf einer Einfachentstehung mit anschließender Ausbreitung basiert oder ob die Variante mehrfach unabhängig voneinander entstanden ist. Zusätzlich wurden genetische Differenzierungen innerhalb und zwischen Populationen (*Spe*-Variante versus Wildtyp) analysiert und der vermeintliche *Spe*-Locus, eine Deletion im 2. Intron von *AGAMOUS*, sequenziert um zu prüfen ob die Deletion die molekulare Ursache für den *Spe*-Phänotyp ist.

In den AFLPs lieferten drei Primerkombinationen 125 polymorphe Fragmente. Die *Spe*-Subpopulationen besitzen eine geringere molekulare Diversität als die sympatrisch vorkommenden Wildtypen. Dies spricht für geringere Auskreuzungsraten und erhöhte Homozygotie in *Spe*. Die Ergebnisse der STRUCTURE-Analyse lassen den Schluss zu, dass die *Spe*-Varietät mindestens zweimal womöglich sogar dreimal unabhängig voneinander entstanden ist. Die Sequenzierung von *CbpAGdel*- Locus lässt erkennen, dass die Deletion höchstwahrscheinlich nicht die ursächliche molekulare Grundlage für das Auftreten des *Spe*-Phänotyps ist.

In weiterführenden Studien wird es von besonderem Interesse sein zu analysieren, ob die molekularen Grundlagen zur Entstehung von *Spe* in den unterschiedlichen Herkünften die gleichen sind.

Schlagwörter

Capsella bursa-pastoris, staminale Pseudopetalie, natürliche Blütenvariante, Homöosis, ABC-Blütenmodell, MADS-box, AFLPs, molekulare Differenzierung, Mehrfachentstehung, Sequenzierung, *AGAMOUS*

Abstract

The family of the Brassicaceae is generally characterized by a highly conserved floral ground plan. Flower modifications are frequently associated with speciation processes. Research object of this thesis is a floral variant of *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse) in which all four petals have been transformed into additional functional stamens. It is a naturally occurring floral homeotic mutation and the phenotype was termed "*Stamenoid petals*" (*Spe*). The variant has been described from only a few populations in Central Europe in which the *Spe* variant and the wild-type occur sympatrically.

By using a genetic fingerprinting method (AFLP) 11 populations were examined: five populations from Austria, four from Czech Republic and two from Germany. It was determined whether *Spe* is a result of single or multiple independent origins. The genetic differentiation within and between populations was analyzed (*Spe*-variant versus wild type). Furthermore the assumed *Spe*-locus, a deletion in the second intron of AGAMOUS, was sequenced to assess whether the Deletion is a possible molecular cause for the *Spe*- phenotype.

The AFLP analysis yielded 125 reliable AFLP fragments. The molecular diversity was higher in wild-types than in *Spe*. This indicates lower outcrossing rates and increased homozygosity in *Spe*. The results of STRUCTURE, an individual-based assignment analysis, suggested that the *Spe*-variety has evolved at least twice perhaps even three times independently. The sequencing of *CbpAGdel*-locus shows that the Deletion is most likely not the causal-molecular trigger for *Spe*.

For future studies it will be of special interest to analyze whether the molecular basis of the formation of *Spe* of the different origins is the same.

Keywords

Capsella bursa-pastoris, stamenoid petals, homeosis, ABC model, MADS-box, molecular Differentiation, AFLPs, multiple origins, sequencing, AGAMOUS

1. Einleitung

Capsella bursa-pastoris ist ein Kosmopolit (Aksoy et al., 1999). Seine Verbreitung erstreckt sich über weite Gebiete von Europa, Asien, Amerika, Australasien und Afrika (Holm, 1979). Am häufigsten tritt *C. bursa-pastoris* als Unkraut von Ackerkulturen auf und als Besiedler von offenen Ruderalgemeinschaften, gestörten Habitaten und Trampelflächen. Die Spezies ist in ihrer Größe, Frucht- und Blattform extrem variabel (Almquist, 1907; Aksoy et al., 1998). Der größte Anteil dieser Variationen hängt mit der phänotypischen Plastizität zusammen, eine häufige Eigenschaft von einjährigen Unkräutern im Kulturland (Kay, 1994). Als Pionierart von gestörten Bodenflächen wird *C. bursa-pastoris* als opportunistischer Lebensstrategie eingestuft. Nach anfänglicher Etablierung kann sich *C. bursa-pastoris* zwar stark vermehren, sie besitzt jedoch nur eine geringe Konkurrenzfähigkeit und wird im Laufe der Sukzession von mehrjährigen Gräsern verdrängt (Aksoy et al., 1998; Holzner und Glauning, 2005).

Die Gattung *Capsella* ist ein naher Verwandter zur Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Beide Genera gehören zum selben Tribus *Camelineae* (Couvreur et al., 2009). Dies erleichtert das molekulare Arbeiten mit *Capsella*, da bestehende Protokolle von *A. thaliana* auf *Capsella* übertragbar sind. Das ist auch einer der Gründe, weshalb *Capsella* in jüngster Zeit in den Focus von molekularen Arbeiten gerückt ist. Somit bietet *Capsella* hervorragende Möglichkeiten die Gesetzmäßigkeiten der Evolution und Entwicklung der Blütenformation auf Mikro- und Makroebene zu erforschen und deren Auswirkungen auf die Ökologie anhand von Feldstudien zu veranschaulichen (Hurka et al., 2012). Die Modifikation von floralen Merkmalen ist stark an die Entwicklung und Veränderung von Paarungssystemen in Pflanzen gebunden. (Goodwillie et al., 2010). Der Wechsel im Fortpflanzungssystem der Auskreuzung zur Selbstung ist ein evolutionärer Übergang in Angiospermen, der besonders häufig auftritt (Sicard und Lenhard, 2011). Generell wird dieses Phänomen von einem Set von charakteristischen Veränderungen in der Morphologie und Funktion der Blüte begleitet, bekannt als das sogenannte „selfing syndrom“ (Darwin, 1876; Ornduff, 1969; Richards, 1986 zit. nach Sicard und Lenhard, 2011). Dazu zählen die Reduktion der Petalengröße und -anzahl bis hin zur völligen Absenz (Neuffer und Paetsch, 2013). Des Weiteren ist die Produktion von Volatilen betroffen, welche abnimmt, es kommt zur Verringerung des Verhältnisses von Pollen zu Ovula, zur Separation zwischen Antheren und Stigma (Herkogamy) und zur Veränderung der Keimzeit des Pollens nach Bestäubung (Sicard und Lenhard, 2011). Diese genannten Modifikationen und die Neuordnung bzw. Polyploidisierung der Chromosomen können an Artbildungsprozessen beteiligt sein (Rieseberg und Willis, 2007; Neuffer und Paetsch, 2013).

Die Befürworter der synthetischen Entwicklungstheorie (=moderner Darwinismus) verstehen die Evolution als graduell, ein Resultat der Akkumulation von vielen kleinen genetischen Veränderungen, die gelenkt werden durch die natürliche Selektion. Sie passen den Träger besser an die Umwelt an und werden somit an die folgende Generation weitervererbt. Die Summe dieser Veränderung führt zur Trennung der höheren Taxa (Pagel, 2002; Hintz et al., 2006):

„All evolution is due to the accumulation of small genetic changes guided by natural selection...and transspecific evolution is nothing but an extrapolation and magnification of the events that take place within populations and species.“ (Mayr, 1963 S. 586 zit. nach Dembski, 2006).

Makroevolution ist somit die Summe der Adaptionen der Mikroevolution. Die evolutionäre Entwicklungsbiologie (Evo-Devo) entgegnet, dass die Evolution ohne die individuelle Embryonalentwicklung einzelner Lebewesen nicht begriffen werden kann (Carroll, 2008). Die Ontogenese unterliegt vorwiegend bestimmten Kontrollgenen bzw. Entwicklungsgenen, Veränderungen in ihnen können zu drastischen

phänotypischen Abweichungen (Neuerungen =Innovation) führen (Theissen, 2006). Fraglich ist, ob ein phänetischer Sprung, ausgelöst durch eine Mutation in einem Entwicklungsgen einer Makroevolution nahe kommt und causa für eine nachfolgende Artabgrenzung sein könnte. (Nutt et al., 2006; Theissen, 2006). Der Focus dieser Arbeit wurde auf eine petalenlose Variante von *Capsella bursa-pastoris* gerichtet, in welcher sich die vier weißen Blütenblätter in vier Staubblätter umwandeln. Ihr Vorkommen wurde für Deutschland, Österreich, Tschechien Schweden, Russland und Nordamerika beschrieben (Hameister, 2009a). Wahrscheinliche Ursache ist eine Mutationen in einem floralen Kontrollgen, die zur Ausbildung dieser natürlichen homöotischen Blütenvarietät führt (Nutt et al., 2008). Ursprung und Verbreitung solcher homöotischen Neuheiten wurden innerhalb der Angiospermen bereits intensiv studiert (Hameister, 2009a). Dieses Phänomen wird jedoch im Kontext der nicht graduellen Evolution kontrovers diskutiert (Theissen, 2006; Theissen und Melzer, 2007).

Das Auftreten einer floralen Variante von *Capsella bursa-pastoris* in natürlichen Populationen ist somit von evolutionärer und ökologischer Bedeutung und könnte dazu beitragen phänotypische Modifikationen und die dahinter verborgenen molekularen Mechanismen umfassender zu verstehen (Hameister et al., 2013).

1.1 Evolution und Verbreitung des Genus *Capsella*

Der Übergang von Selbstinkompatibilität zu Selbstkompatibilität deckt sich im Genus *Capsella* mit seinem Verbreitungserfolg (Neuffer und Paetsch, 2013). In der Literatur gibt es vier anerkannte *Capsella* Arten (Chater 1993): *C.bursa-pastoris* (L.) Medik., mit Subspecies *C.thracica* Velen., *Capsella grandiflora* (Fauché & Chaub.) Boiss, *C. rubella* Reuter, und *C. orientalis* Klokov. Der Genus *Capsella* besitzt wahrscheinlich einen eurasischen Ursprung welcher diploid und selbstinkompatibel ist. Daraus formierte sich eine westliche (*C.grandiflora* und *C. rubella*) und östliche (*C.bursa-pastoris* und *C.orientalis*) Linie, aus welchen sich im Pleistozän die heutigen Arten entwickelten (Hurka et al., 2012).

Capsella grandiflora ist diploid ($2n=4x=16$) und selbstinkompatibel. Hauptverbreitungsgebiet ist der westliche Balkan und Norditalien. Diese Art besitzt die größten Petalen mit größten Zellen (Hurka et al., 2012; Neuffer und Paetsch, 2013). ***Capsella rubella*** ist ebenso diploid ($2n=4x=16$), jedoch selbstinkompatibel und besitzt im Vergleich zu den anderen Arten die kleinsten Blütenblätter mit kleinster Zellgröße, welche leicht rötlich erscheinen. Zu finden ist *C. rubella* im Mediterranen Raum, sowie Zentralasien und Amerika. ***C. orientalis*** ist diploid ($2n=4x=16$) und selbstinkompatibel. Äußerlich ist sie kaum unterscheidbar von *C. bursa-pastoris*, ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den Arten ist ihr Polyploidisierungsgrad. Das Verbreitungsareal erstreckt sich vom östlichen Europa bis zu Zentralasien.

C. thracica entstand wahrscheinlich durch interspezifische Hybridisierung zwischen *C. bursa-pastoris* und *C. grandiflora*. Sie ist allotetraploid ($2n=4x=32$) und selbstinkompatibel. *C. thracica* ähnelt phänotypisch stark *C. bursa-pastoris*, hat jedoch einen verlängerten Griffel. *C. thracica* ist eine endemische Art in Bulgarien.

C. bursa-pastoris ist autotetraploid ($2n=4x=32$) und selbstkompatibel. Es wird vermutet, dass *C. bursa-pastoris* einen multiplen Ursprung hat und aus intraspezifischen Hybridisierungsereignissen hervorging. Sie gehört heute zu den am meist verbreiteten Blütenpflanzen dieser Welt (Hurka et al., 2012). Diese Kolonisationsfähigkeit hängt größtenteils von der Fähigkeit ab, sich schnell an neue Habitate anzupassen (Williamson, 1997). Diese Anpassung kann geschehen aufgrund eines simplen Switch auf molekularer Ebene oder durch die Einführung von vorangepassten Ökotypen (Linde et al., 2001).

1.2 Beschreibung der Art *Capsella bursa-pastoris*

Capsella bursa-pastoris (Hirtentäschelkraut) gehört zur Familie der Brassicaceae, Kreuzblütengewächse. Das Hirtentäschelkraut ist eine ein-bis zweijährige krautige Pflanze. Die Grundblätter sind behaart und in einer Rosette angeordnet, aus der sich die mehr oder wenig verzweigte Sprossachse entwickelt. Die weißen Blüten sind 2-3mm lang und besitzen eine Glöckchenform (Holzner und Glauninger, 2005; Partzsch et al., 2006). Sie kann mehrere Generationen pro Saison ausbilden (bis zu 5-6) ausgenommen bei längeren Frostperioden (Link Schultze-Motel, 1986). Die Blüte entwickelt sich nach der Bestäubung zum auffallend verkehrt herzförmigen flachen Schötchen. Es vergehen etwa 6 Wochen von der Keimung bis zur Reifung der ersten Früchte, worauf kontinuierlich neue Blüten und Früchtchen erzeugt werden bis die Pflanze abstirbt. In jedem Fach eines Schötchen befinden sich durchschnittlich 8 bis 10 Samen. Dabei kann eine Pflanze in etwa 10.000 bis 40.000 Samen produzieren (Holzner und Glauninger, 2005). Papers sprechen auch von bis zu 64.000 Samen pro Pflanze.

C. bursa-pastoris ist ein alter Kulturbegleiter der Menschheit und ist gut an die Störungen angepasst. Es besitzt einen schnellen Lebenszyklus. Das Hirtentäschel ist allgemein sehr anspruchslos, braucht jedoch offenen Boden, viel Licht (Lichtkeimer) und eine mäßige Nährstoffversorgung (Holzner und Glauninger, 2005; Partzsch et al., 2006). Die vorwiegend selbstende *C. bursa-pastoris* ist weltweit vertreten, ausgenommen der Tropen und Subtropen (Hurka und Neuffer, 1997).

Auf Grund der Polyploidisierung in *C. bursa-pastoris* und die damit verbundene gesteigerte genetische Variation, konnten sich viele Ökotypen differenzieren, die sich an unterschiedliche klimatische und geografische Bedingungen gut anpassen konnten (Hurka und Neuffer, 1997; Neuffer und Hurka, 1999). Die Ökotypen lassen sich insbesondere durch Blattmorphologie, Samenmorphologie, Blühbeginn, Verzweigungsmuster, Anzahl der Blätter in der Rosette und Wuchshöhe unterscheiden (Link Schultze-Motel, 1986; Hurka und Neuffer, 1997; Ziermann, 2010). Die Wuchshöhe kann zwischen 2 bis 80cm variieren. Die Blätter können je nach Standort ganzrandig, gelappt oder fiederspaltig sein. Laubblätter können elliptisch bis lanzettlich spitz, gelappt, ganzrandig bis gezähnt sein (Partzsch et al., 2006).

1.3 Konservierte Blütenmorphologie der Brassicaceae

Die Familie der Brassicaceae lässt sich durch die stark konservierte Blütenmorphologie recht gut von anderen Familien abgrenzen. Grund dafür ist die hoch konservierte Blütenmorphologie der Brassicaceae. Die Blüten sind bilateral symmetrisch angeordnet. Die typische Blütenarchitektur besteht aus vier freien Sepalen, welche in zwei Blütenkreisen angeordnet sind, vier Petalen und sechs freien Stamina, welche ebenfalls in zwei Kreisen angeordnet sind. Die äußeren zwei Stamenoide sind meist kürzer als die der Inneren. Der Fruchtknoten ist bicarpellat (Lysak M., 2011).

Manche Arten zeigen jedoch Abweichungen von diesen uniformen Strukturen, wie etwa die petalenlose Variante von *Capsella bursa-pastoris*. Bereits 1821 wurde diese Sonderform von Opiz in Prag und von Trattinnick in Wien bemerkt (Opiz, 1821; Trattinnick 1821). Die von der Ferne gelblich erscheinende Variante weist statt den vier weißen Petalen zusätzlich vier funktionsfähige Stamina auf, in Summe somit zehn Stamina. Opiz beschrieb sie deshalb auch als „dekandrisch“ und postulierte sie als eigene Art: *Capsella apetala* (Opiz, 1821). Die Umwandlung von Stamina in Petalen benennt Murbeck 1918 als staminale Pseudopetalie. Seit 2006 wurde die Abkürzung „*Spe*“ geläufig welche für „*Stamenoid Petals*“ steht (Nutt et al., 2006). Grundsätzlich handelt es sich hierbei um eine natürlich vorkommende florale homöotische Mutante. Der Begriff Homöosis (BATESON 1894) beschreibt die Transformation der Struktur eines Organs in die homologe Struktur eines anderen Organs: ein Organ wird dort ausgebildet, wo sich normalerweise ein anderes Organ entwickelt (Classen-Linke und Beier, 2001)

1.4 MADS-BOX-Gene und der florale Bauplan

In den vergangenen Jahren hat sich herausgestellt, dass bestimmte Kontrollgene eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl von pflanzlichen Entwicklungsprozessen einnehmen. Dazu zählen Gene welche die Blühinduktion, Formation des floralen Meristems und Pflanzenorganität bestimmen (Kaufmann et al., 2005). Sie sind Mitglieder limitierter Multigenfamilien, welche für putative Transkriptionsfaktoren codieren (Theissen et al., 2000). Transkriptionsfaktoren besitzen die Fähigkeit an spezifische DNA-Sequenzen zu binden, das sind meist kurze *cis*-regulatorische Sequenzabschnitte die im Intron-Bereich liegen, insbesondere in der Promoterregion. Somit können sie die Transkription eines Zielgens regulieren bzw. aktivieren oder reprimieren (Wray et al., 2003; Hughes, 2011).

Im Pflanzenreich sind sie bekannt unter der Bezeichnung MADS-Box-Gene (Jochen, 2010). Diese Transkriptionsfaktoren besitzen eine DNA-bindende Region, Domäne, welche als MADS-Box bezeichnet wird, hochkonserviert ist und eine durchschnittlich Größe von etwa 180 Nukleotide besitzt (De Bodt et al., 2003). Der Ausdruck MADS entstammt den Anfangsbuchstaben der Proteine und ihren Vertretern, in denen sie erstmalig identifiziert wurden: *MCM1* für *MINICHROMOSOME MAINTENANCE* aus *Saccharomyces cerevisiae*, *AG* für *AGAMOUS* aus *A.thaliana*, *DEF A* für *DEFICIENS A* aus *A.majus* und *SRF* für *SERUM RESPONSE FACTOR* aus Säugetieren (Schwarzsommer et al., 1990; Jochen, 2010; Ziermann, 2010).

Die MADS-Box-Gene sind in zwei große Gruppen eingeteilt worden, Gruppe I und Gruppe II, wobei in Gruppe II der **MIKC**-Typ eingeordnet wird, welcher nur in Pflanzen vorkommt (Becker und Theissen, 2003). Er besitzt ferner der **MADS**-Domäne drei zusätzliche funktionale Domänen. Eine stark konservierte **K** (Keratin)-Domäne, zuständig für die Dimerisierung, eine schwächer konservierte Domäne **I** (intervenig), welche wahrscheinlich einen entscheidender Faktor für die Formation von DNA-bindenden Dimeren bildet und eine variable **C**-terminale Region, welche in der transkriptionellen Aktivierung oder in der Herstellung komplexer ternärer und quaternärer Proteinkomplexe involviert ist (De Bodt et al., 2003). Dieser modulare Aufbau erleichtert die Formation von vielseitigen Protein-Interaktionen und übergeordneten Komplexen welche auf ausgeklügelte Weise ihre Zielgene kontrollieren (Kaufmann et al., 2005) siehe Abbildung 1, Abbildung und 4.

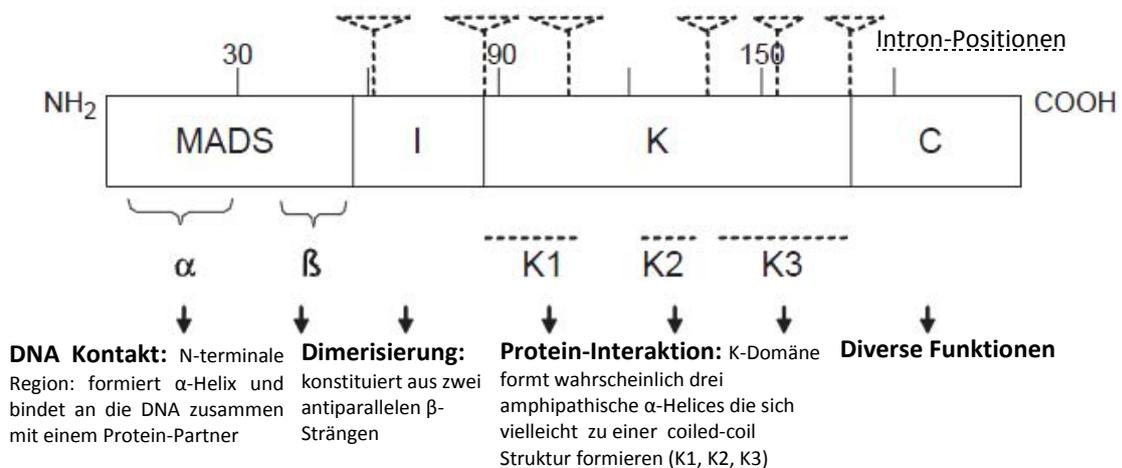


Abbildung 1: Aufbau der MADS-BOX am Beispiel von APETALA 3 (AP3) (Kaufmann et al., 2005 S.184, abgeändert)

Zum MIKC-Typ der MADS Subfamilien gehören wie oben schon genannt die floralen Blütenorganidentitätsgene, welche die Basis des floralen Bauplans bilden (Saedler et al., 2001). Die „idealisierte Blüte“ besteht aus vier konzentrischen Ringen, Organkreise welche als Wirtel bezeichnet werden. Von außen nach innen unterscheidet man somit vier Organ-Typen: Sepalen, Petalen, Stamina

und Karpelle (Causier et al., 2010). In den 90er wurden vermehrt die floralen Organitätsgene mittels homeotischen Mutanten in *Arabidopsis* und *Antirrhinum* untersucht und 1991 verfassten Coen und Meyerowitz das ABC Modell der Blütenentwicklung (Coen und Meyerowitz, 1991; Pua und Davey, 2009). Das Modell beschreibt die Interaktionen von drei Klassen von funktionalen Genen, A, B und C welche in kombinatorischer Weise die Formation von Organen festlegen (Coen und Meyerowitz, 1991; Theissen und Saedler, 2001). Später wurde das Modell um zwei funktionale Klassen, D und E, erweitert (ABCDE-Modell). Die Funktion E fungiert als essentielle Grundinformation zur Spezifizierung aller Blütenorgane und beeinflusst die physikalischen Interaktionen zwischen den anderen Genklassen (Theissen, 2001; Theissen und Saedler, 2001; Immink et al., 2010). Die Klasse der D-Gene legt die Bildung der Ovula fest, welche sich innerhalb der Gewebe der Karpelle ausbilden (D+E) (Colombo et al., 1995). Die Expression von Genklasse A +E führt zur Formation der Sepalen, die Kombination A+B+E spezifiziert Petalen, B+C+E steuert die Ausbildung der Stamina und C+E determiniert die Entwicklung von Karpellen (Theissen, 2001; Krizek und Fletcher, 2005). Ein wichtiger Punkt ist, dass sich die Gene der Funktion A und Gene der Funktion C gegenseitig unterdrücken, antagonistisch wirken (Krizek und Fletcher, 2005). Das Gen-basierte ABCDE-Modell wurde später in ein Protein-basiertes Modell transformiert mit Bezeichnung „the floral quartets“. Das Hauptaugenmerk in diesem Modell liegt auf den floralen homeotischen Proteinen welche die Fähigkeit besitzen tetramerische Komplexe von Transkriptionsfaktoren zu formen (Theissen und Saedler, 2001). Die MADS-Protein Dimere besitzen entsprechende Motive damit sie sich im jeweiligen Wirtel an die CA₂G (CC(A/T)GG)-Box Bindungsstellen in den Promotoren ihrer Zielgene binden können. Diese Bindungsstellen können zueinander in unmittelbarer Nähe auf der DNA liegen oder voneinander entfernt sein. Zusammengefasst bilden zwei MADS-Proteine durch Zusammenlagerung Dimere, die durch Protein-Protein Interaktionen Tetramere ausbilden. Dieser Komplex bindet sich an zwei CA₂G-Box Bindungsstellen auf der DNA und beeinflusst die Expression der umliegenden Gene (Krizek und Fletcher, 2005).

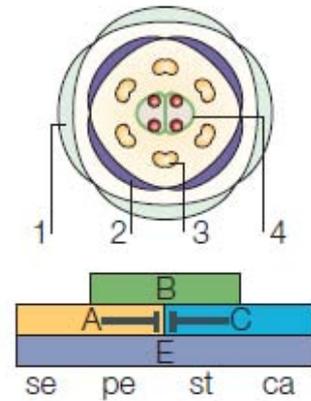


Abbildung 2: ABC(E)-Blütenmodell (Krizek und Fletcher, 2005 S.689)

Tabelle 1: Übersicht der Genklassen und ihrer Protein-Bindungen (Coen und Meyerowitz, 1991; Theissen und Saedler, 2001; Kaufmann et al., 2005; Krizek und Fletcher, 2005)

Genklasse	Gene	Subfamilie MADS-Domäne-bindende Transkriptionsfaktoren	ABCDE- Blütenmodell	Floral Quartets	Wirtel Organ
A	APETALA 1 (AP1)	SQUA-Familie	A+E	AP1 SEP	1. Wirtel Sepalen
	APETALA 2 (AP2)*	AP2/ERF (<i>Ethylene response binding factor</i>) <i>keine MADS-BOX Domäne</i>		SEP AP1	
B	APETALA3 (AP3)	DEF-Familie	A+B+E	AP3 PI	2. Wirtel Petalen
	PISTILLATA (Opiz)	GLO-Familie		AP1 SEP	
C	AGAMOUS (Tang et al.)	AG-Familie	B+C+E	PI AP3 SEP AG	3. Wirtel Stamina
D	SEED STICK (STK)	AG-verwandte Familie	C+E	AG SEP	4. Wirtel Karpelle
	SHATTERPROOF 1 (SHP1)			SEP AG	
	SHATTERPROOF 2 (SHP2)				
E	SEPELLATA (SEP)	AGL2-Familie	D+E	SEP STK SEP SHP	Inh. 4. Wirtel Ovula

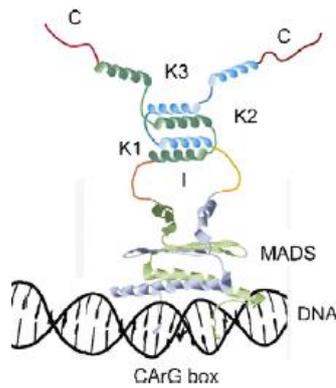


Abbildung 3: schematische Darstellung eines MADS Domäne Protein-Dimer am Beispiel von SEPPELLATA 3 (SEP3) (Immink et al., 2010 S. 88)

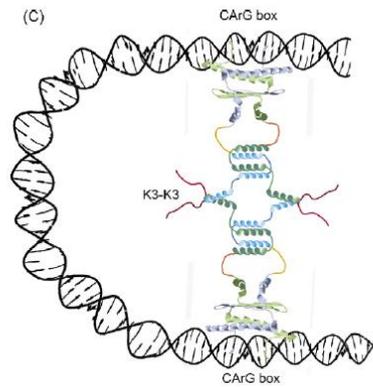


Abbildung 4: Hypothetische 3D Struktur eines MADS-Domäne Protein-Quartetts (gebunden an zwei CArG-Boxen der DNA) (Immink et al., 2010 S.88)

Da es aber einige Widersprüche zwischen dem originalen ABCDE-Modell und den experimentellen Analysen mit Mutanten gibt, insbesondere bezüglich der Funktion A, schlugen Causier et al. 2009 ein überarbeitetes Modell vor: das (A)BC-Modell. Der Funktion A werden dabei mehrere Rollen zugeteilt. Sie sind involviert in der Kontrolle der floralen Meristembildung und erleichtern die Produktion der Sepalen, zudem wird ihnen die Funktion C (SEPPELLATA) zugeschrieben, die den floralen Kontext festlegt. Ebenso braucht es die Gene der Funktion A für die Aktivierung und Regulierung der B- und C-Funktionen und der Festlegung ihrer Expressionsgrenzen (Causier et al., 2010).

1.4.1 Der *Spe*-Phänotyp und sein genetischer Hintergrund

Die Blüte der *Spe*-Variante besitzt statt den vier weißen Petalen vier transformierte Stamina. Es wird vermutet, dass ein einziger Locus oder eng gekoppelte Loci verantwortlich für den *Spe*-Phänotyp ist. Segregationsanalysen, Kreuzung zwischen *Spe*-Phänotyp x Wildtyp, ergaben in den Individuen der F₂-Generation ein Verhältnis zwischen Stamina und Petalen tragenden Nachkommen im zweiten Wirtel von 3:1. Stamina versus intermediäre Organe versus Petalen ergaben ein Verhältnis von 1:2:1, zum gleichen Ergebnis kam Dahlgren 1919 (Nutt et al., 2006; Hameister et al., 2013). Dieses Aufspaltungsverhältnis lässt darauf schließen, dass es sich bei der *Spe*-Variante um ein (co)-dominantes mutiertes Allel (oder mehrere Allele) auf einem einzigen bestimmten Locus handelt (Nutt et al., 2006).

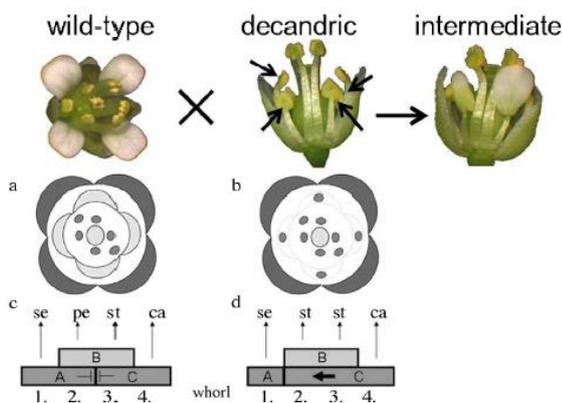


Abbildung 5: *Spe*-Phänotyp: ektopische Expression der Genklasse-C (Hameister et al., 2013 S. 642)

Wang et al. erwähnen jedoch in einem Paper von 2011, dass der *Spe*-Locus als semi-dominant bewiesen wurde und behaupten der *Spe*-Phänotyp entstammt einer „gain-of-function“-Mutation (Wang et al., 2011). Bei einer „gain-of-function“ Mutation ist ein Allel so mutiert, dass es in seiner Funktion aktiver ist als das Wildtyp-Allel. Solche Mutationen ergeben sich oft durch ektopische Expression eines Gens. (Janning und Knust, 2004; Nutt et al., 2008).

Bis jetzt wird angenommen, dass es sich bei der *Spe*-Variante um eine cis-regulatorische Mutation in einer oder mehreren Klasse C-Genen handelt und es folglich zu einer ektopischen Expression eines Gens der Klasse C im 2. Wirtel kommt (Abbildung). Kandidatengene (Tabelle 1) sind somit AGAMOUS und alle Mitglieder der AG-Subklade (SHP1/SHP2 und STK) (Hintz et al., 2006). Mittels einer Co-Segregationsanalyse und Kopplungskarte konnte der verantwortliche *Spe*-Locus lokalisiert werden. Dazu

wurden SNPs (single nucleotide polymorphism) in den Kandidatengenomen zwischen Wildtyp und *Spe*-Variante identifiziert. Durch darauffolgende Genotypisierung einer segregierender F₂-Population (1:3) und Pyrosequenzierung konnte der Locus aufgefunden gemacht werden. Es handelte sich dabei um eine enge Kopplung zwischen *CbpAGa* an den *Spe*-Phänotyp (*CbpAGa* = *Capsella bursa-pastoris* AGAMOUS a). Zwei Genkopien wurden identifiziert, a und b. Diese Genkopien sind co-orthologe Gene, aber nur die Genkopie a co-segregiert mit dem *Spe*-Phänotyp (Nutt et al., 2008; Ziermann, 2010; Hameister et al., 2013).

Da die inneren Organe der *Spe*-Variante normal ausgeprägt sind, konzentrierte sich die Suche auf einen negativen Regulator von *CbpAGa* in der nicht codierenden Region. Dabei wurde ein Sequenzpolymorphismus im 2. Intron bestehend aus einer Deletion von 22 Basenpaaren und 3 Substitutionen gefunden, welche als Bindungsbereich für einen negativen Transkriptionsfaktor in Frage kommen würde und eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Stamina besitzt. Die Deletion könnte dazu führen, dass es einem negativen Transkriptionsfaktor nicht möglich ist zu binden und es zur ektopischen Expression der Funktion C im zweiten Wirtel kommt (Nutt et al., 2008; Ziermann, 2010).

1.5 Der *Spe*-Phänotyp: Ökologie und Fitness

Die homeotische *Spe*-Variante ist in ihrer Fitness nicht drastisch behindert. Sie kommt relativ häufig und ausdauernd in der Wildnis vor und kann sich auch gegen den Wildtyp behaupten. Alle ausgebildeten Stamina der *Spe*-Variante sind voll funktionsfähig (Nutt et al., 2006). In Feldversuchen im Botanischen Garten von Jena und Halle wurden *Spe*-Pflanzen und wildtypische *Capsella bursa-pastoris* miteinander verglichen (Pflanzenmaterial: Gau-Odernheim). Dabei wurde festgestellt, dass das Artenspektrum potentieller Bestäuber nicht signifikant unterschiedlich war, auch der prozentuelle Anteil der einzelnen Arten der Blütenbesucher variierte nicht ausschlaggebend. Jedoch wurde die *Spe*-Variante im Vergleich zum Wildtyp nur halb so oft von Insekten besucht (Ziermann, 2009). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Beobachtungen am Wildstandort in Gau-Odernheim (Hameister, 2009a). Auch wurden die Absonderung von flüchtigem Blütenduftstoffe, wie Monoterpene und Benzaldehyd ermittelt. Beim *Spe*-Phänotyp konnten keine Volatile nachgewiesen werden. Wildtyp-Pflanzen produzieren eine höhere Anzahl an Samen pro Pflanze, im Gegensatz dazu bildet die *Spe*-Variante aber mehr Samen pro Frucht (*Spe*-Variante: Ø24.6 zu Wildtyp: Ø21.2)(Hameister, 2009a; Ziermann, 2010).

In Gewächshausversuchen wurden Unterschiede im Blühzeitpunkt festgestellt. Die *Spe*-Variante blüht durchschnittlich 19 Tage später auf als die wildtypische *C. bursa-pastoris* (Hameister et al., 2009).

Somit hat der Verlust der Kronblätter für die *Spe*-Variante geringen Einfluss auf die reproduktive Fitness. Die hohen Selbstungsraten und die Verschiebung des Blühzeitpunktes könnten den intraspezifischen Genfluss erschweren und eine (beginnende) sympatrische Artbildung fördern (Hurka und Neuffer, 1997; Levin, 2006; Hameister, 2009a; Ziermann, 2010).

1.6 Stand der Forschung

In der Gattung *Capsella* wurde bis jetzt nur *Capsella rubella* vollständig sequenziert (Hurka et al., 2012; Slotte et al., 2013). Für *Capsella bursa-pastoris* fehlt jedoch die komplette Genomsequenz. Die Universität Osnabrück und die Universität Jena haben sich in den letzten Jahren in mehreren Arbeiten der Erforschung der dekandrischen *C. bursa-pastoris* gewidmet: AFLPs und RAPDs wurden zur chromosomalen Lokalisierung des *Spe*-Locus und zur Generierung einer Kopplungskarte angewendet. Die Sequenzen von drei AFLPs von der Kopplungsgruppe CB12 stimmten bei der BLAST-Suche einzig der Region im Chromosom IV von *A. thaliana* überein (Hameister et al., 2013). Auch kamen AFLPs zur Untersuchung der genetischen Diversität von wildtypischen und *spe*-typischen *C. bursa-pastoris* zum

Einsatz. Dabei wurden Individuen aus Deutschland (Gau-Odernheim und Warburg) Russland (Petrozavodsk) und Österreich (Haugsdorf und Wien) analysiert. Die Kombination von AFLP-Daten und Daten der allozymalen Variation teilten in Clusteranalysen die Populationen ihrem geografischen Ursprung zu. Daraus wurde geschlossen, dass der Wildtyp und die *Spe*-Variante von einem Standort näher miteinander verwandt sind als Individuen mit *Spe*-phänotypischer Erscheinung geografisch entfernter Standorte. Dies würde auch auf eine mindestens vierfach-Entstehung des *Spe*-Phänotyps schließen lassen (Hameister, 2009a). Innerhalb der Population von Gau-Odernheim wurde eine signifikante Differenzierung zwischen *Spe*-Phänotyp und Wildtyp gefunden, die zwei Blütenvarianten spalteten sich in zwei deutlich getrennte Gruppen auf (Niepötter, 2007; Hameister et al., 2009). Die Sequenzuntersuchungen des *Spe*-Locus von Nutt et. al. (2008) detektieren die Deletion in einem Individuum von Gau-Odernheim, jedoch fehlte sie im Individuum von Warburg. Auch spätere Untersuchungen von Hameister (unveröffentlicht) in unterschiedlichen Populationen ergaben keine eindeutige Relation zwischen Deletion und *Spe*-Phänotyp. Um ein eindeutigeres Bild um den möglichen Ursprung, Ursprünge und genetischen Hintergrund des *Spe*-Phänotyps zu gewinnen, wurde auf die Grundlagen der bestehenden Arbeiten zurückgegriffen, die AFLP-Methode optimiert und weitere Standorte in die Arbeit mit einbezogen. Der weitaus kleinere Anteil der Arbeit widmete sich der Sequenzierung des vermuteten *Spe*-Locus.

1.7 Hypothesen, Forschungsfragen und Ziele

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der genetischen Differenzierung von der homeotischen Variante von *C. bursa-pastoris* und den wildtypischen Individuen anhand der AFLP-Methode. Dabei wird die genetische Diversität der blütenblattragenden und blütenblattlosen Individuen innerhalb einer Population bzw. zwischen den Populationen, insgesamt elf Populationen, miteinander verglichen. Zu diesem Zweck werden die Diversität nach NEI (1973), Shannon's Informations Index nach LEWONTIN (1972) der prozentuale Anteil der polymorphen Fragmente, Berechnung der privaten Allele sowie eine Analyse der molekularen Varianz angefertigt. Ebenso wurde untersucht ob die Individuen einer Population näher miteinander verwandt sind als im Vergleich zu den geografisch entfernten Populationen. Diese Fragestellung soll mittels eines Manteltests der die geographische und die genetische Distanzen miteinander korreliert, beantwortet werden. Da die petalenlose Variante in verschiedenen, zum Teil geografisch isolierten Populationen auftritt und die Selbstungrate in *C. bursa-pastoris* sehr hoch ist, wurde angenommen, dass genetische Unterschiede zwischen *Spe*-Phänotyp und Wildtyp vorzufinden sind: geringere Unterschiede innerhalb einer Population und vermehrt zwischen den Populationen. Auch wird versucht zu prüfen ob die *Spe*-Variante aus einem einfachen Ursprung hervorging und sich anschließend verbreitete oder ob die Variante mehrfach unabhängig voneinander entstand. Angewendet werden hierfür eine Hauptkoordinatenanalyse und eine modellbasierte Clusteranalyse. Durch Sequenzierung soll überprüft werden ob die Deletion im Locus ***CbpAGa*** Ursache für den *Spe*-Phänotyp in den verschiedenen Populationen ist.

Die formulierten Hypothesen lauten:

1. **Hypothese:**

- a) Innerhalb der Populationen gibt es zwischen *Spe*-Phänotyp und Wildtyp-Individuen geringe Unterschiede in der molekularen Diversität.
- b) Die genetische Variation innerhalb einer Population ist geringer als die genetische Diversität zwischen den Populationen. Weiter entfernte Populationen besitzen somit größere genetische Distanzen.

2. **Hypothese:** Die *Spe*-Variante besitzt mehrere lokale Ursprünge, die unabhängig voneinander entstanden sind.
3. **Hypothese:** Der *Spe*-Phänotyp der verschiedenen Populationen wird *womöglich* durch die gleiche genetische Veränderung (Deletion in *CbpAGa*) verursacht.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsregion

Es wurden insgesamt elf Populationen untersucht. Hierfür wurde Blattmaterial auf Silikagel oder Saatgut (GER) der Individuen eingesetzt. Zwei Populationen entstammten aus Deutschland, fünf Populationen aus Österreich und vier aus Tschechien. Lage der Sammelpunkte, Jahr der Besammlung, kurze Standortbeschreibung, Distanzangaben und Anzahl der untersuchten Individuen sind in Tabelle 2 und Abbildung 7 zu entnehmen.

Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Individuen aus Deutschland, Tschechien und Österreich

LAND Sammeljahr	GEBIET	KÜRZEL Population	Koordinaten	Untersuchte Individuen			STANDORT
				Insg.	Spe	Wild	
DE 2005	Nordrhein-Westfalen/ Rheinessen: Gau-Odernheim	DE24	A N49 47 20.0/E08 11 48.3	2	1	1	Weinberg: sehr viele Populationen: Verhältnis Spe-Individuen zu Wildtyp: 10%; einer der wärmsten und heißesten Region Deutschland; Boden: vorwiegend Ton und Löss, kalkhaltig (Hameister, 2009a)
			C N49 47 24.9/E08 12 02.9	2	1	1	
			G N49 47 32.0/E08 11 56.0	8	4	4	
			J N49 46 55.7/E08 12 52.9	8	4	4	
			N N49 47 29.0/E08 14 08.0	4	2	2	
DE 2005	Rheinlandpfalz: Warburg -Desenberg	DE25	N51 30 02.0/E09 11 58.7	8	4	4	Ruderal: begrenztes Vorkommen weniger Spe-Individuen aufgrund des geringen basaltischen Untergrund auf der Hügelspitze (200m ²) des <i>erloschenen Vulkan Desenberg</i> (Hameister, 2009a)
AT 2012	Wien: Linneplatz	AT05a	N48 14 10.23/E16 20 9.17	8	4	4	Urban- Grünfläche
AT 2012	Niederösterreich: Wachau-Unterloiben	AT11	N 48 23 27.5/E15 31 55.9	8	4	4	Weinberg
AT 2012	Niederösterreich: Wachau-Unterloiben	AT11a	N 48 23.705/E15 32,143	8	4	4	Weinberg
AT 2012	Niederösterreich: Eggenburg	AT12	N48 38 26.4/E15 51 11.2	8	4	4	Feldweg neben Acker
AT 2013	Niederösterreich: Poysdorf	AT15	N48 40 51.8/E16 37 52.8	8	4	4	Weinberg
CZ 2011	Südmähren: Mikulov	CZ08	N48 48 11.33/E 16 39 05.22	8	4	4	Weinberg
CZ 2013	Südmähren: Nova Ves bei Pohorelice	CZ16	N48 56 12.0/E16 31 42.2	8	4	4	Urban-Parkplatz
CZ 2013	Südmähren: Brno Süd- Einfahrtstraße	CZ17	N49 08 24.1/E16 36 12.6	8	4	4	Urban-Parkplatz
CZ 2013	Mittelböhmen: Prag	CZ19	N50 06 37.9/E14 24 47.4	8	4	4	Urban-Grünfläche



Abbildung 6: Lage der Probenstandorte in Deutschland, Österreich und Tschechien

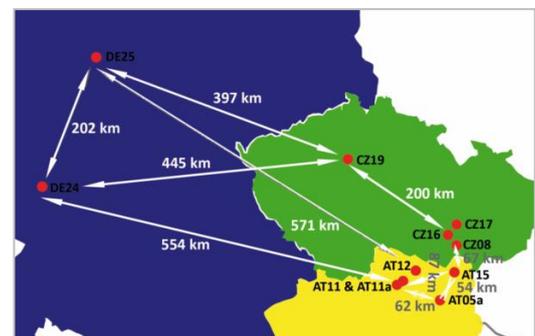


Abbildung 7: Übersicht zu geografischen Distanzen zwischen den untersuchten Populationen

2.2 Mörsern der Probe

20 µg in Silikagel getrocknetes Blattmaterial wurde in 2ml Tubes eingewogen und mit drei Glas-Beads versehen. Darauf wurde die Probe für fünf Minuten im TissueLyser bei einer Frequenz von 25 Hertz zermahlen. Bei grobkörnigen Restbeständen wurde der Schritt nochmals wiederholt.

2.3 DNA-Isolation

Die deutschen Populationen DE24 und DE25 waren bereits mittels Invisorb Spin Plant Kit (Fa. Invitex) extrahiert. Auch der Großteil der österreichischen Populationen und die tschechische Populationen CZ08 waren in früheren Arbeiten schon mittels Qiacube (Fa. Qiagen) halbautomatisch extrahiert. Die Populationen AT15, CZ16, CZ17 und CZ19 wurden im Zuge dieser Masterarbeit nach dem „DNeasy Plant Handbook“ ab Punkt sieben von QIAGEN (2006) isoliert. Nur der Schritt der DNA-Elution wurde statt in einem Schritt in zwei Schritten vollzogen, je 50 µl AE-Puffer wurde auf die Membran pipettiert um die DNA-Konzentration im Eluat zu steigern. Folglich kommt es zu einer Verringerung der Gesamtausbeute der DNA (Qiagen, 2006). Der RNase A Verdau wurde abweichend vom Extraktionsprotokoll erst nach der Extraktion durchgeführt: 1 µl RNase A (*Thermoscientific 10mg/ml*) wurde pro Probe dazu gemengt und in einem Thermomixer für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.4 Qualitativer DNA-Nachweis und Kontrolle des RNA-Verdaus

2.4.1 NanoDrop-Messung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration der Lösung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) laut Protokoll von THERMO FISHER SCIENTIFIC mit dem *NanoDrop-Spektrophotometer 2000*. Als Blankprobe diente 1 µl des AE-Elutionspuffer der Extraktion, dadurch wurde der Nullwert festgesetzt. Danach konnten die Proben gemessen werden. Jeweils 1 µl von der Probe wurde auf die Messzelle des NanoDrops pipettiert. Bei andauernden Messungen wurde der Blank nach 30 Minuten nochmals wiederholt. Das Messergebnis wurde in einer Spektralkurve sowie in Zahlenwerten abgebildet: Das Adsorptionsmaxima von RNA und DNA liegt bei etwa 260 nm. Proteine adsorbieren stark bei 280 nm und Polysaccharide haben ihr Maximum annähernd bei 230 nm. Die Konzentration ergibt sich aus der OD_{260} multipliziert mit der Verdünnung und dem Multiplikationsfaktor. Der Multiplikationsfaktor beträgt 50 für dsDNA, 40 für dsRNA = wenn der OD_{260} der Probe 1 beträgt, ist die Konzentration der DNA in etwa 50 mg/mL und für RNA 40 mg/mL (Mülhardt, 2013).

Zudem erhält man aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} einen Wert über die Proteinkontamination bzw. Reinheit der Probe. Ideal wäre für die DNA ein Wert von annähernd 2. Liegt das Verhältnis unter diesem Wert deutet dies auf eine erhöhte Konzentration von Proteinen und Phenolen hin. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{230} überprüft die Nukleinsäurereinheit, gewöhnlich liegt es im Bereich von 1.8 und 2.2, liegt das Verhältnis deutlich unter diesem Wert weist dies auf eine Mitextraktion von fremdartigen Substanz, wie etwa von Algen oder Pilze, hin (ThermoScientific, 2009; Mülhardt, 2013).

2.4.2 Agarosegel

Zur qualitativen Kontrolle der isolierten DNA und des RNA-Verdaus wurde in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Standard war die Benutzung eines kleinen Gelschlittens und einem 15-Kamm. 0,96g Agarose wurden in 240 ml 1x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer) gelöst und mehrfach in der Mikrowelle aufgeköcht (Mülhardt, 2013). Das Gel wurde auf etwa Handtemperatur abgekühlt und anschließend in den Gelträger gegossen. Nach Erstarren kam das Gel in die Elektrophoresekammer welche ebenfalls mit 1xTBE gefüllt war. 5 µl der DNA Probe vermischt mit 2 µl des Farbstoffes *Blue Dye* wurde in die Taschen aufgetragen. Eine Spannung von 90 Volt für 60 Minuten wurde angelegt. Dabei wandern die

Nukleinsäuren durch die negative Eigenladung in Richtung Katode. Kleine Moleküle wandern schneller und größere Moleküle langsamer in Richtung positiven Pol (Pingoud und Urbanke, 1997). Das Agarosegel wurde anschließend mit *GelRed Nucleic Acid Stainingsolution* für 15 Minuten gefärbt, damit die Banden mit dem *UVP*-Geldokumentationssystem unter UV Licht sichtbar wurden.

2.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Die geläufigsten Fingerprinting –Methoden, die keine vorausgehende Sequenzinformation benötigen, sind Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) und Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Sie alle sind dominante Marker und unterscheiden nicht ob ein Gen in homozygoten oder heterozygoten Zustand vorkommt, sondern ob ein Allel vorhanden oder nicht vorhanden ist (Meudt und Clarke, 2007).

Die AFLP-Methode wurde von Vos et al. 1995 im Namen von Keygene entwickelt und patentiert. Die AFLP-Technik besteht aus vier großen Teilschritten: 1) Restriktion der DNA, 2) Ligation der Adaptoren, 3) Amplifikation der Fragmente und 4) Visualisierung der vervielfältigten Fragmente (Vos et al., 1995; Gort, 2010). Die AFLP-Methode wird besonders geschätzt, da sie im Vergleich zu den anderen Techniken hoch sensitiv und reproduzierbar ist. Sie kann viele Polymorphismen in verschiedenen genomischen Regionen zugleich detektieren und ist dabei verhältnismäßig billig. Ideal ist sie für Untersuchungen an Polyploiden und bei Individuen die durch Hybridisierung hervorgingen (Meudt und Clarke, 2007; Gort, 2010).

Dennoch gibt es einige Nachteile von AFLP: bei Kontamination mit fremdartige DNA kommt es zur Bewertung von fehlerhaften Banden. Bekannt sind auch die Phänomene von sog. Homoplasien und Kollisionen. Bei Homoplasie werden zwei gleich lange Fragmente von unterschiedlichen Individuen, die nicht vom selben Loucs stammen, fehlerhafterweise einem Marker zugeordnet. Kollision trifft zu, wenn in einem Individuum zwei unterschiedliche Fragmente ähnlich lang sind und sie irrtümlich als nur ein Marker bewertet werden (Gort, 2010).

2.5.1 Restriktion-Ligation

Zuerst wurde die DNA mit autoklavierten Millipore-H₂O auf 100 ng/μl verdünnt. Restriktion und Ligation passierte in einem Schritt: dabei werden 5,5μl der DNA mit 5,5μl des Mastermix, siehe Tabelle 3, zusammengemischt und für zwei Stunden bei 37°C in einem Thermocycler der Firma Eppendorf inkubiert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix zur Restriktion und Ligation

Mastermix: Restriktion - Ligation	pro Probe in μl
<i>Finale Konzentration</i>	
10x T4 Ligase Puffer	1,1
0,5 M NaCl	1,1
1mg/ml BSA	0,55
Mse Adaptor (50μM)	1
EcoR1 Adaptor (5μM)	1
Mse I (10 U/μl); 1U	0,1
EcoR1 (20 U/μl); 5U	0,25
T4 Ligase (CelU) 67U	0,1675
Wasser	0,2325
Gesamtvolumen 1 Probe:	5,5μl

Während der Restriktion wird der DNA-Doppelstrang mittels zweier Restriktions-Endonukleasen geschnitten. Diese Restriktionsenzyme erkennen spezifische Nukleotidsequenzen innerhalb des DNA-

Stranges und können ihn dort spalten. Das häufig schneidende Restriktionsenzym *Mse I* lagert sich an der Basenfolge 5'TTAA an. Seltener schneidet *EcoRI* beim Sequenzmotiv 5'GAATTC. So entstehen sog. „sticky ends“, das sind überhängende 5' Enden an denen sich die passenden Adaptoren anlagern können (Gort, 2010).

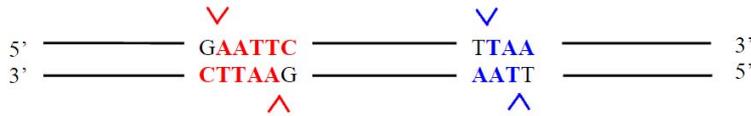


Abbildung 8: Aktivität der Restriktionsenzyme EcoRI (➤)& MseI (➤) (Magali, 2003 S. 91)

Das *MseI* Adaptorpaar setzt sich aus den Adaptoren MSE-Adaptor⁻ und MSE-Adaptor⁺ zusammen, hingegen Adaptorpaar *EcoRI* aus den Adaptoren ECO-Adaptor⁻ und Eco-Adaptor⁺:

Tabelle 4: Sequenz der Adaptorpaare EcoRI und MseI

Sequenzen in 5'-3'	
Eco-Adapter ⁻	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Eco-Adapter ⁺	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
Mse-Adapter ⁻	GAC GAT GAG TCC TGA G
Mse-Adapter ⁺	TAC TCA GGA CTC AT

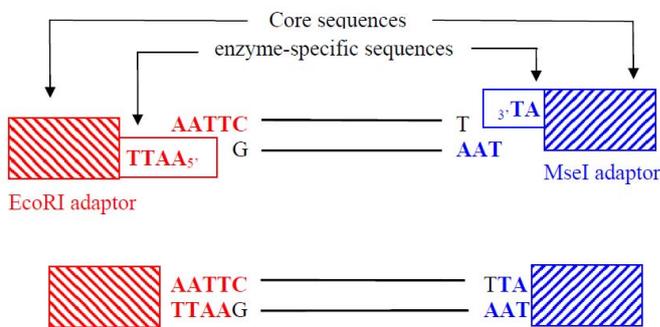


Abbildung 9: Ligation der Adaptoren [bekannte DNA-Sequenz = zukünftigen Primer] (Magali, 2003 S. 91)

Die Adaptoren werden vor der Beifügung in den Mastermix auf 95°C für 5 Minuten erhitzt und damit denaturiert und schließlich für 10 Minuten bei Raumtemperaturen abkühlen gelassen, damit sich die DNA-Stränge wieder binden, renaturieren. Durch diesen Schritt werden etwaige Fehlbindungen zwischen den Einzelsträngen von ECO+/- und MSE +/- aufgetrennt. Während der Abkühlphase entstehen wieder die überhängenden Enden, die sich passend an die Schnittstellen anlagern können. Diese Adaptoren dienen als Andockstellen für die Primer im nächsten Schritt.

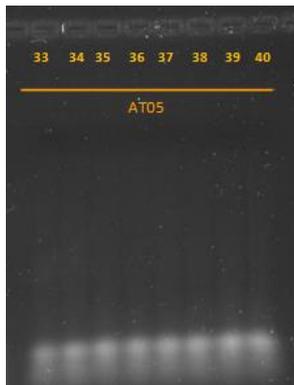


Abbildung 10: Agarosegel der Restriktion und Ligation

Zur Kontrolle ob die Restriktion und Ligation erfolgreich war, wurde mittels einem 1,5% Agarosegel überprüft (Abbildung). Hierzu wurden 4µl des Restriktions-Ligationsansatzes mit 2µl Blue Dye vermischt. Die Proben wurden bei 90Volt Spannung für zwei Stunden aufgetrennt. Die Färbung des Gels und Ansicht mit UVP-Geldokumentationssystem war ident wie in Punkt 2.4.2. Die übrigen 7µl des Restriktions-Ligationsansatzes wurden mit 93µl TE_{0,1}-Puffer (Tris-HCl; EDTA) verdünnt (Gort, 2010). Die Proben wurden entweder kurzfristig bei 4°C gelagert oder bei -20°C dauerhaft eingefroren.

2.5.2 Präselektive Amplifikation

Die präselektive Amplifikation ist im Grunde eine normale PCR (siehe dazu Kapitel 2.6.2) in denen die Adaptoren als Primer-Bindestelle fungieren. In diesem Schritt werden einzelsträngige DNA-Oligonukleotide zugefügt, welche sich an die Gegensequenz der DNA (erzeugt durch die vorangegangene Restriktion-Ligation) anlagern und als Startpunkt für die DNA-Vervielfältigung dienen. Bei AFLPs stimmt der Primer jedoch nicht zu 100% mit der Adaptorsequenz überein, sondern wird mit sog. selektiven Basen erweitert. Durch diese Basen werden nicht alle Fragmente vermehrt. Bei Erweiterung des Primers um eine selektive Base wird die Anzahl der zu vervielfältigenden Fragmente um ¼ reduziert, bei Erweiterung auf beiden Seiten um 1/16 (Weising et al., 2005). Die Primer wurden um jeweils folgende selektiven Base erweitert:

Eco- Adaptor + 1. Nukleotid A: 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
 Mse- Adaptor + 1. Nukleotid C: 5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'

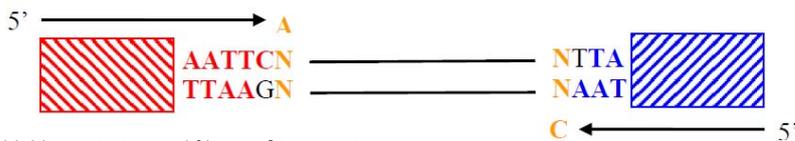


Abbildung 11: Preamplifikation [Primer + 1 Nukleotid] (Magali, 2003 S. 91)

Jeweils 2µl der verdünnten Restriktion-Ligation-Probe wurden mit 8µl Mastermix gemischt. Folgende Reagenzien beinhaltete der Mastermix:

Tabelle 5: Reagenzien der Präselektiven Amplifikation

Mastermix: Präselektive Amplifikation	pro Probe
<i>Finale Konzentration</i>	in µl
10x Poylmerase Puffer	1,0
25mM dNTPS each (0,25mM)	0,10
Präselektives Primer Paar (0,275µM)*	0,55
Dream Taq-Polymerase (1,25U/s.)	0,125
Wasser	6,225
Gesamtvolumen 1. Probe	8,00

* Primer: vor Zugabe in Mastermix verdünnt und zusammengemischt

Anschließend kamen die Proben in den Thermocycler und durchliefen wie in Tabelle 6 ersichtlichen Reaktionsbedingungen. Zur Überprüfung der präselektiven Amplifikation wurde 4µl der Probe mit 3µl *Blue Dye* vermischt und im 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die übrigen 6µl wurden wieder mit TE_{0,1}-Puffer verdünnt.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der präselektiven Amplifikation

1	72°C / 2min
2	94°C / 20sec
3	56°C / 30sec
4	72°C / 2min
5	*zurück zu Schritt 2 (20x)
6	60°C 30min
7	10°C / hold

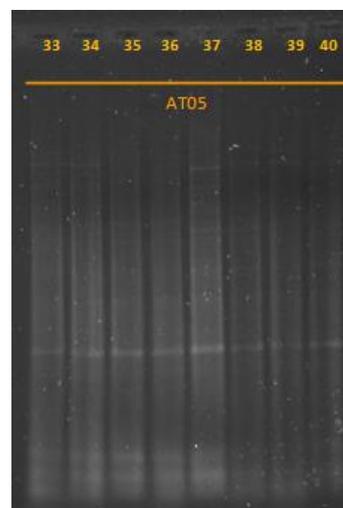


Abbildung 12: Gelbild der präselektiven Amplifikation

2.5.3 Selektive Amplifikation

In diesem Schritt werden die Fragmente nochmals um 1/256 reduziert, da Primer verwendet werden, die jeweils drei zusätzliche Basen am 3' Ende besitzen. Für die spätere Detektion ist der *EcoRI* Primer am 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff, gelb, grün oder blau, markiert.

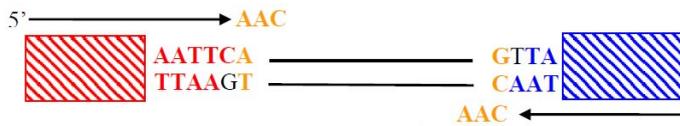


Abbildung 13: Selektive Amplifikation (Primer + 3 Nukleotide) (Magali, 2003 S. 91)

Die selektiven PCRs erfolgen für jedes gelabelte Primerpaar in getrennten Reaktionen. Nach der PCR werden die verschiedenen gelabelten PCR-Produkte wieder zusammengemischt. Für die selektive Amplifikation werden 2µl des präselektiven Ansatzes mit 8µl Mastermix, siehe Tabelle 7, vermengt und durchliefen im Thermocycler das Programm wie in Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix zur selektiven Amplifikation

Mastermix: Selektive Amplifikation	Pro Probe
Finale Konzentration	in µl
10x Poylmerase Puffer	1,0
25mM dNTPS (0,25mM)	0,10
Mse I Selektiver Primer (5 µM) 0,275µM final	0,55
EcoRI Selektiver Primer (1 µM) 0,055µM final	0,55
Dream Taq-Polymerase (1,25U/s.)	0,05
Wasser	5,75
<i>Volumen</i>	<i>8,00</i>

Tabelle 8 Reaktionsbedingungen der selektiven Amplifikation

1	94°C / 2min	
2	94°C / 10sec	
3	65°C bis 56°C / 30sec	
4	72°C / 2min	
5	<i>*geh zu Schritt 2 (9x)</i>	
6.	94°C / 10sec	* Touchdown PCR, 1°C Abnahme pro Zyklus (10 Zyklen)
7	56°C / 30sec	
8	72°C / 2min	
9	<i>*geh zu Schritt 6 (23x)</i>	
10	60°C 30min	
11	10°C / hold	

Zunächst wurden mit je 4 Individuen aus den Regionen DE24, DE25, AT15 und CZ16 Pilotversuche durchgeführt um die bestmögliche Primerkombination für die Bearbeitung des Gesamtprobenpools auszuwählen. Ausschlaggebend war die Findung von eindeutigen anamorphen Markern, welche die Populationen kennzeichnen. Ebenfalls war es wichtig Primerkombinationen zu finden, die zusammen gut funktionieren und später in der Kapillaren- Elektrophorese stabile homogene Fragmentkurven liefern. Auch wurde versucht sog. „OFF-scale Peaks“ zu vermeiden, die entstehen wenn ein Fragment mit einer bestimmten Länge im Verhältnis zu den anderen viel zu oft amplifiziert wurde. Die ausgetesteten Primerkombinationen sind in Tabelle 9 angeführt. Die ausgewählten Primerkombinationen wurden farbig hinterlegt: FAM-ACT mit Mse-CAC von Primerset 02 und NED-ACC und VIC-ACG mit Mse-CTA von Primerset 04.

Tabelle 9: Übersicht der EcoRI und MseI Primerkombinationen

Primerkombination	Gelb	Grün	Blau	Mse
Primerset 01	NED-AAC 32y	VIC-AAG 33g	FAM-ACA 35b	Mse-CAC M48
Primerset 02	NED-ACC 36y	VIC-ACG 37g	FAM-ACT 38b	Mse-CAC M48
Primerset 03	NED-AAC 32y	VIC-AAG 33g	FAM-ACA 35b	Mse-CTA M59
Primerset 04	NED-ACC 36y	VIC-ACG 37g	FAM-ACT 38b	Mse-CTA M59
Primerset 05	NED-ACC 36y	VIC-ACG 37g	FAM-ACT 38b	Mse-CAG kt (M49)
Primerset 06	NED-ACC 36y	VIC-ACG 37g	FAM-ACT 38b	Mse-CTC kt (M60)

2.5.4 Aufreinigung der Proben

Die Aufreinigung der markierten DNA-Fragmente erfolgte über Sephadex G-50 fein. Das Sephadexpulver ist ein durchlässiges Dextrangel mit einem hohen Anteil an Hydroxylgruppen in den Polysaccharidgruppen. Versetzt mit Wasser quillt es somit schnell zu einem Gel auf. Sephadex besitzt mehrere Dextranfunktionen mit Epichlorhydrin, die Stärke der Vernetzung bestimmt die Größe der Substanzen welche durch den Filter passieren können. Im Falle von G-50 werden Nukleinsäuren kleiner 20bp aufgehalten, Moleküle welche größer sind, können durchlaufen. Dadurch werden dNTPs, ddNTPs und überschüssiger Primer in der Säule zurückgehalten (Rammé, 2010; GE_Healthcare, 2014).

In den Vorversuchen wurde eine Sephadexsäule in mehreren Schritten aufgebaut: hierfür wurden 5g Sephadexpulver mit 60ml TE₁-Puffer vermischt und für drei Stunden quellen gelassen. Dann wurden jeweils dreimal 200µl Sephadex in eine Filterplatte pipettiert und das überschüssige Wasser mit einer Großzentrifuge 5810R von Eppendorf raus gepresst (zweimal 750rcf für 1Minuter, dritte Mal für 5 Minuten).

Da diese Methode sehr zeitintensiv ist, wurde auf eine effizientere Technik zurückgegriffen. Das Sephadex wurde hierbei auf eine *MultiScreen 45 Column Loader*, das ist eine 96-Loch-Filterplatte mit Porenvolumina von je 45µl, ausgestrichen. Auf dem *Column Loader* wurde die *MultiScreen-HV-Platte* geschichtet und beide Platten umgedreht und damit das Sephadex in die *HV-Platte* überführt. Schließlich wurde jede Pore mit 300µl Merck-Wasser befüllt und für drei Stunden quellen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die drei Ansätze des selektiven Amplifikationsproduktes in einer *Mischplatte*, einer Standardmikrotiterplatte, im Verhältnis: Gelb 3.7µl, Grün 4.3µl und Blau 3.15µl, zusammengesetzt. Dieses Mischverhältnis entstammte aus den Erfahrungen der Vorversuche. Um das Wasser aus der Filtersäule zu entfernen wurde die *HV-Platte* mit einer unterliegenden *Waste-Platte* für fünf Minuten bei 2.000rpm in der Großzentrifuge zentrifugiert. Die gesamte selektive Mischung, 11.15 µl, wurde vorsichtig auf die Mitte der Sephadexsäule aufgetragen ohne sie anzustechen. Die *Waste-Platte* wurde durch eine Poolplatte ausgetauscht und die Konstruktion *HV-Platte* und Poolplatte erneut für fünf Minuten bei 2.000rpm zentrifugiert. In der *Sequenzierplatte* wurden pro Vertiefung 15µl *HidiTM*-Formamid mit 0.25µl Größenstandard *LIZ 600* vorgelegt und 1µl des PCR-Pools bzw. Durchflusses dazupipettiert. Die Proben in der Sequenzierplatte wurden im Thermocycler für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Sequenzierplatte wurde in den sog. *Retainer- Base Set* gelegt und war bereit für die Auftrennung im *Genetic Analyzer 3.500* (Applied Biosystem). In Tabelle 10 sind die Parameter für die Runs aufgelistet.

Tabelle 10: Parameter für die AFLP-Läufe

Laufparameter	
Injection Time	8 sec
Injection Volt	1,6 kV
Oven Temperatur	60°C
PreRun Time	180 sec
PreRun Volt	15 kV
Capillary Length	50 cm
Run Volt	19,5 kV
Run Time	22 min 10 sec
Dye Set	G5
Polymer	POP7
Laser Power	20 mW
Data Delay	1 sec

Der benutzte *LIZ 600* -Standard deckt einen Größenbereich von 20 bis 600 Basen ab, dazwischen liegen 34 einzelsträngige und gelabelte Fragmente. Die Analyse-Software benutzt den Größenstandard von jeder Probe zur Erstellung einer individuellen Standardkurve. Die relative Länge von jedem farbgelabelten Fragment wird durch die spezifische Vergleichung zwischen individueller Standardkurve und einzelner Probe bestimmt. (Applied_Biosystems, 2005).

2.5.5 Test zur Reproduzierbarkeit der AFLP-Daten

Um die Verlässlichkeit der AFLP-Ergebnisse zu überprüfen sollten mindestens 5-10% der Proben den gesamten Versuch anonymisiert durchlaufen. Von den analysierten Proben war aber vorwiegend zu wenig Blattmaterial für eine weitere Einwaage vorhanden, weshalb die DNA-Isolation nicht erneut durchgeführt werden konnte. Wiederholt wurde somit ab dem Schritt der DNA-Verdünnung vor Restriktion und Ligation, siehe Kapitel 2.5.1.

Tabelle 11: statistische Wiederholung

LAND	Vergleichsprobe	Probename	Individuum-Bezeichnung
DE24	1	113	DE24-A16spe_stat
	5	114	DE24-G5-2spe_stat
	6	115	DE24-G25spe_stat
	13	116	DE24-N11-1spe_stat
DE25	17	117	DE25-1_4-1wt_stat
	20	118	DE25-2_3-1wt_stat
	21	119	DE25-1_2-1spe_stat
	24	120	DE25-2_10-2spe_stat
AT15	65	121	AT15-01spe_stat
	69	122	AT15-05wt_stat
	71	123	AT15-08wt_stat
	72	124	AT15-09wt_stat
CZ16	73	125	CZ16-01spe_stat
	75	126	CZ16-03spe_stat
	78	127	CZ16-09wt_stat
	80	128	CZ16-11wt_stat

2.6 DNA-Sequenzierung

Um die Deletion der 22bp im zweiten Intron von Cbp-AGAMOUS nachzuweisen, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Zur weiteren Identifizierung von möglichen phylogenetischen Mustern wurde der intergenic spacer trnL- trnF verwendet. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Das Grundprinzip der Kettenabbruchmethode ist die Verhinderung der Verlängerung des DNA Stranges mithilfe von modifizierten Nukleotiden (Alphey, 1998).

2.6.1 Probenauswahl

Für die Sequenzierung wurden folgende Individuen herangezogen:

Tabelle 12: Auswahl der Individuen für die Sequenzierung

LAND	Probename	LAND	Probename
DE24 Gau-Odernheim	DE24-G20wt	AT12 Weinviertel: Eggenburg	AT12-03spe
	DE24-N11-1spe		AT12-08wt
	DE24-N9-1wt	CZ08 Südmähren: Mikulov	CZ08-02spe
	DE24-G23-2spe		CZ08-23wt
DE25 Warburg -Desenberg	DE25-1_20-1wt	CZ16 Südmähren: Nova Ves bei Pohorelice	CZ16-03spe
	DE25-1_21-3spe		CZ16-08wt
AT05a Wien: Linneplatz	AT05a-12spe	CZ17 Südmähren: Brno Süd-Einfahrtstraße	CZ17-03spe
	AT05a-17wt		CZ17-06wt
AT11 Wachau-Unterloiben	AT11-02spe	CZ19 Mittelböhmen: Prag	CZ19-06spe
	AT11-11wt		CZ19-12wt
AT15 Poysdorf	AT15-01spe		
	AT15-06wt		

2.6.2 PCR

Zunächst wird über spezifische Primer (Tabelle 13) die jeweilige DNA Region vervielfältigt: der Vorwärts- und Rückwärts-Primer grenzen diesen Abschnitt ein. Nach der thermischen Denaturierung, lagern sie sich diese beim Abkühlen bei einer Primer-spezifischen „annealing“ Temperatur an. Anschließend synthetisiert die *Taq*-Polymerase die komplementäre DNA-Sequenz zum Einzelstrang. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt und es kommt zur exponentiellen Vervielfältigung der Abschnitte.

Tabelle 13: Basensequenz der Primer trnL und CbpAGa

Primer	Sequenz	Erwartetes Produkt
trnL-E	5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3'	350-500bp
trnL-F	5' GGTTCAAGTCCCTCTATCCC 3'	
<i>CbpAGa</i> _del_fwd	5' AGTTTTGATCATACAACACTACACATGTC 3'	240-260bp
<i>CbpAGa</i> _del_rev	5' GAAATCTCAAATCTTTTATGGTTGGAGATG 3'	

Die PCR- Reaktion wurde jeweilig mit einem Gesamtvolumen von 25µl pro Ansatz durchgeführt. Die DNA wurde auf 50ng/µl verdünnt. Mastermix für trnL und AGdel und Programme in Tabelle 14, 15 und 16 ersichtlich.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die PCR

Komponente	Finale Konzentration	Pro Probe in µl
H2O		19,125
Dream T-Buffer (10x)	1x (cont.20mM MgCl ₂)	2,5
dNTP (25mM each)	0,25mM each	0,25
Primer forward (10µM)	0,4µM	1
Primer reverse (10µM)	0,4µM	1
Dream Taq (5u/µl)	1,25u/50µl	0,125
DNA	50ng/ µl	1

Tabelle 15: Cycler-Programm für die PCR mit Primerpaar trnL-E - trnL-F

1	94°C / 2min
2	94°C / 60sec
3	50°C / 20sec
4	72°C / 45 sec (zurück zu Schritt 2: Wiederholung 34X)
5	72°C / 20min
6	10°C / hold

Tabelle 16: Cycler-Programm für die PCR mit Primerpaar AGdel

	<i>Deckeltemperatur: 110C°</i>
1	94°C / 2min
2	94°C / 1min
3	65°C / 30sec Ramping 3°C/sec -1C°
4	72°C / 45 sec (zurück zu Schritt 2: WH 9X)
5	94°C / 1min
6	55°C / 30sec
7	72°C / 45sec (zurück zu Schritt 6: WH 19X)
8	72°C / 20min
6	11°C / hold

Zur Überprüfung der Reaktionsprodukte der PCR wurde die Agarosegel-Elektrophorese angewendet. Dabei wurden wie in Kapitel 2.4.2 ein 1.5 % Gel gegossen, jedoch wurde der Schritt der Einfärbung mit *peqGreen* schon vor Gießen des Gels während seiner Abkühlphase vollzogen.

Im ersten Versuch wurden weder bei *trnL* noch bei *AGdel* Doppelbanden gefunden. Die Proben von *AGdel* wurden dennoch laut *QIAquick PCR Purification Kit* für die Zentrifuge vom Gel extrahiert. Diese Sequenzen waren jedoch nicht auswertbar. Infolgedessen wurde die PCR mit *AGdel* erneut durchgeführt mit dem Unterschied, dass die DNA unverdünnt eingesetzt wurde. Dies führte zu bessere Resultate im Gelbild. Das weitere Verfahren war ident wie bei *trnL*.

2.6.3 ExoFastAp-Verdau

Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen Exonuklease I und FastAP verdaut. Die Exonuklease I reinigt das Produkt von überschüssigen Primer, da sie einzelne Nukleinsäuren von der DNA abspaltet. FastAp, eine basische Alkaline-Phosphatase, dephosphoryliert alle Typen von DNA-Enden. Pro Probe wurde 1µl Exonuklease und 2µl FastAp zugefügt. Die Proben wurden bei 37°C für 25 Minuten und anschließend bei 80°C für 15 Minuten im Thermocycler inkubiert. (Rammé, 2010; ThermoScientific, 2013).

2.6.4 Sequenzreaktion

Das *BigDye Terminator –Kit* wurde für die Sequenzierung benutzt. Dieser enthält den *BigDye-Ready-Reaktion Mix* und den 5x Sequenzierungspuffer. Im Ersteren befinden sich u.a. dNTPs aber auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs. ddNTPs sind 2',3'-Didesoxynukleotide. Ihnen fehlen die 3'-OH-Gruppe daher können sie keine Phosphodiesterbrücke ausbilden und es kommt zum Syntheseabbruch während der PCR. Im *Genetic Analyzer 3.500* werden mittels Kapillarelektrophorese die Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt. Die Farbmarkierung wird durch einen Detektor festgestellt, so kann die vollständige Reihenfolge der Basen bestimmt werden (Alphey, 1998). Beim Mastermix wird einzeln der *Forward-* bzw. *Reverse-*Ansatz hergestellt. Dadurch vermindert sich der Produktanstieg. Für *trnL-E – trnL-F* wurden beide Richtungen sequenziert, für *AGdel* reichte der *Forward-*Primer. Der Mastermix wurde vorgelegt (Tabelle 17) und das verdaute PCR-Produkt 1:10 verdünnt und dazu gemischt. Die Proben wurden in den Thermocycler entsprechend dem in Tabelle 18 angeführten Programm inkubiert.

2.6.5 Sephadexaufreinigung

Tabelle 17: Mastermix für die Sequenzreaktion

Mastermix: Sequenzreaktion	Pro Porbe in µl
H2O	3
Big Dye Buffer	1
Big Dye	2
Primer (forward/reverse)	1
<i>PCR-Produkt: verdünnt 1:10</i>	3

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen der Sequenzreaktion

1	95°C / 1min
2	95°C / 30sec
3	50°C / 15sec
4	60°C / 4min (zurück zu Schritt 2: WH 29X)
5	60°C / 4min ^S
6	10°C / hold

Die Sequenzreaktion wird ebenfalls über eine Sephadexsäule aufgereinigt, wie in Punkt 2.5.4 schon erläutert wurde. Nach dem ersten Schritt der Entwässerung wurde jedoch unter die *HV-Platte* die *Sequenzierplatte* gegeben, in welcher schon zuvor 10µl *Hidi* pro Pore vorgelegt wurde. Die Proben wurden für 5 Minuten in der Großzentrifuge bei 2.000rpm geschleudert. Es folgte kein Denaturierungsschritt, die Sequenzierungsplatte wurde direkt in das *Retainer- Base Set* gegeben.

Tabelle 19: Laufparameter der Sequenzierungen

Laufparameter	
Injection Time	8 sec
Injection Volt	1,6 kV
Oven Temperatur	60C°
Capillary Length	50 cm
Electrophoresis Voltage Setting	8,5 kV
Polymer	POP7
Dye Set	Z 4
Laser Power	15,8 mW
Data Delay	1 sec

2.7 Datenauswertung

2.7.1 Auswertung der AFLP-Daten

Zur Beurteilung der AFLP-Banden wurde mit GeneMapper5, GeneMarker2.4.0® und Excel 2007 gearbeitet. Für die statistischen Analysen wurde das Erweiterungsprogramm GenAlex 6.5, Poppene und STRUCTURE verwendet.

2.7.2 Gene Mapper5

Für die anfängliche Auswertung der Vorversuche bzw. der Rohdaten aller Ergebnisse wurde auf Gene Mapper, ein Softwarepaket von Applied Biosystems, zurückgegriffen. Mittels Gene Mapper erfolgte die Fragmentanalyse. Dabei werden die farbmarkierten Fragmente in einem Elektropherogramm dargestellt. Jeder abgebildete Peak steht für eine Allelvariante, die mit ihrer Länge bezeichnet wird. Die Peakhöhe wird in RFU (*Relative Fluorescent Units*) Einheit angegeben. Die Fragmente werden durch einen Laser zum fluoreszieren gebracht, die einzelnen Farbstoffsignale werden durch ein integriertes Beugungsgitter in ihre spektralen Anteile aufgespalten. Diese werden auf eine CCD-Kamera projiziert, welche die Intensität der Fluoreszenz misst. Proben die mehr Menge von einer bestimmten Länge eines Fragments besitzen haben folglich auch einen erhöhten RFU-Wert. In Tabelle 20 sind die RFU-Werte, Adsorptionsmaxima und –minima sowie Schwellenwerte wie sie Applied Biosystems für die verwendeten Farbstoffe anführt, abgebildet (Applied_Biosystems, 2012).

Tabelle 20: Genmapper Parameter

Dye Set	G5				Instrument 3500 Series	
Matrix Standard	DS-33\$	Adsorption Max	Emission Max	Relative Intensität	Empfohlener Bereich der Signal Intensität	Fluoreszenz Sättigung
Blue	5-FAM™	494 nm	530 nm	100 RFU	175-10.000 RFU	30.000 RFU ↑=OFF-scale
Green	VIC®	538 nm	554 nm	100 RFU		
Yellow	NED™	546 nm	575 nm	40 RFU		
Orange *	LIZ®	638 nm	655 nm	50 RFU		

*der Peak vom Standard sollte im Vergleich zur Intensität der Peakhöhe der Proben in etwa 30 bis 100% betragen

Die Peak-Sequenzen werden automatisch in Tabellenform konvertiert, dabei erhält jeder Peak den Wert seiner Länge. Bei Nichtvorhandenseins eines Peaks oder Peakhöhe unter dem angegebenen Schwellenwert wird dieser mit 0 bewertet. Die Untergrenze für alle Farben wurde auf 150 RFU festgelegt. Für jede Farbe wurde somit eine Matrize aus Fragmentlängen erzeugt, die in Excel importiert werden konnten und dort in eine binäre Matrize umgewandelt wurden. Diese Matrize wurde in den Vorversuchen für erste statistische Auswertungen benutzt, wie etwa Clusteranalysen, um bestehende Unterschiede zwischen den Individuen, Populationen aufzudecken.

Vorwiegend wiesen die mit dem Farbstoff VIC und NED markierten Fragmente OFF-scale Peaks auf, die schwer unter Kontrolle zu kriegen waren. Eine mögliche Sättigung der Kamera durch OFF-scale Peaks wird in Gene Mapper mit dem Vorhandensein von einer pinken Linie im Elektropherogramm angedeutet und warnt den Analysator vor Missinterpretation.

Bei Ausfall einer Probe wurde die selektive PCR für alle drei Farben wiederholt, waren nur einzelne Primer betroffen wurde die selektive PCR für die einzelne Farbe erneut ausgeführt. Zwei österreichische Populationen wurden ganz aus dem Projekt gestrichen, da die DNA-Qualität zu gering war (AT03=Wien/Hadersdorf und AT04 = Wien/Hadersdorf-Laudon).

2.7.3 Gene Marker & Bearbeitung der binären Matrize

Für die Endauswertung wurde ein manuelles Scoring mit der Software GeneMarker von Soft Genetics durchgeführt. Das Programm GeneMarker besitzt eine benutzerfreundliche Oberfläche und bietet viele einzigartige Funktionen, wie etwa zum Reparieren von gesättigten Peaks. Es entfernt Überstrahlungen (Pull-up Peaks) und erhöht Peaks die durch Off-scale Peaks womöglich unterdrückt wurden (Phillips, 2009; Schmidt, 2011). Gene Marker bietet zusätzlich im Panel Editor die Möglichkeit zwischen Synthetischen Gelbild, Einzelansicht einer Spur auf die Ansicht mit überlappten Spuren (*Overlay view*) ausgewählter Individuen zu wechseln. Die Overly-Darstellung eignet sich besonders zur Bearbeitung der Allele bzw. der Generierung der sog. Bins. Mit den in Tabelle 21 ersichtlichen Voreinstellungen wurde ein automatisches Panel erstellt und die daraus resultierte binäre Matrize mit der Matrize von GeneMarker verglichen.

Tabelle 21: Parameter GeneMarker

Dye Set	ABI 5 Colors	Peak Filter-Parameter	
Size Standard	GS600	Aktivierte Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> • Smooth • Peak Saturation • Baseline Substraction • Pull up Correction • Spike Removal
Standard Colour	Orange		
Analysis Type	AFLP	Minimum Inensity	100
		Maximum Intensitx	30.000

Dabei wurde überprüft, ob die gleichen Allele auf derselben Position-bzw. Länge detektiert wurden. Im zweiten Schritt wurde das automatisch generierte Panel jeder Farbe in GeneMapper manuell nachkontrolliert. Allele (Bins) wurden editiert, gelöscht bzw. manche hinzugefügt. Darauf wurden die Panels nochmals über das gesamte Projekt geladen. Peaks welche das Programm nicht zuweisen konnte, vorhanden oder nicht vorhanden, wurden in der Matrize mit einem Fragezeichen versehen. Diese Unschärfe kann von mehreren Faktoren abhängen: einer zu hohen Basislinie, der Peak fällt nicht in den vordefinierten Bereich der Bin-Grenzen rein oder die Breite eines Peaks überschreitet den maximalen Breitenwert. Deshalb mussten alle Fragezeichen nochmals von Hand mithilfe des Elektropherogramm nachbearbeitet werden. Auch wurden sicher zugewiesene Allele beiläufig nachkontrolliert. Fragmentlängen unter 45bp und ober 617bp wurden ignoriert. Der Abstand zwischen den Peaks musste mindesten ± 0.60 Basen betragen, ansonsten wurden sie zu einem Marker zusammengezogen.

2.7.4 Reduktion der Datenmatrix mit Excel 2007

Als monomorph wurde ein Marker gewertet, wenn er in 95% der Proben vorhanden war (bei 120 Individuen somit in über 114). Diese wurden entfernt, ausgenommen wenn mehr als drei von ihnen in einer einzigen Population fehlten. Auch wurden Marker gelöscht die unter die 5% Grenze fielen (unter

6). Die Marker wurden jedoch belassen, wenn mehr als 3 Fehlende sich in derselben Population befanden.

2.7.5 Prüfung der molekularen Diversität

Zur Untersuchung der allelischen Diversität der Populationen und Regionen wurde mittels der Software Programms Popgene 1.32 (Yeh et al., 1997) der Shannon Index (I) nach Lewontin (1972) und der Nei – Index (Nei und Li, 1979) berechnet.

Zur Berechnung der Gesamtdiversität wird der Shannon Index benutzt. Er liegt zwischen 0 und 1. Je größer die genetische Diversität ist, desto höher ist auch der Wert (Gerdo, 2006, S. 42):

$$I = -\sum p_i \log_2 p_i \quad p_i \dots \text{Frequenz eines bestimmten AFLP-Fragments.}$$

Zur Ermittlung der Gendiversität diente der Nei- Index (Gerdo, 2006, S. 41):

$$h = 1 - \sum_{i=1}^q x_i^2 \quad x_i \dots \text{Populationsfrequenz des i-ten Allels} \quad q \dots \text{Anzahl der Allele}$$

Der Nei –Index befindet sich in einem Bereich von 0-1, wobei der Wert 0 für alle Individuen sind ident und der Wert 1 für alle Individuen sind verschieden, steht (Gerdo, 2006).

Auch wurde der prozentuale Anteil von polymorphen Allelen und privaten Allelen, Allele welche ausschließlich in einer Population vorkommen, kalkuliert. Die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) wurde mit dem Programm GenAIX Version 6.5 (Peakall und Smouse, 2012) durchgeführt. Die AMOVA untersucht die Verteilung der genetischen Variation zwischen den Regionen, zwischen den Populationen und innerhalb der Populationen zwischen den Individuen. In Excel wurde auch der durchschnittliche Bandenreichtum pro Individuum per Populationen berechnet.

2.7.6 Distanzbasierte Analyse der Populationsstruktur

Die Hauptkoordinatenanalyse (principal coordinates analysis, PCoA) wurde mit dem Programm GenAIX erstellt. Dies wurde mit dem Gesamtdatensatz und mit einzelnen Populationen durchgeführt um mögliche Differenzierungen zwischen den Populationen sowie *Spe*- und Wildtyp zu visualisieren. Die PCoA basiert auf den genetischen Distanzen zwischen den Individuen, den sog. gepaarten Φ_{iPT} Werten. Außerdem wurde in GenAIX ein einfacher Manteltest zwischen genetischen (Φ_{iPT} –Matrix) und geographischen Distanzen (GGD) für *Spe* berechnet (999 Permutationen). Die geographische Distanz zwischen den Populationen wurde mittels Lufteinmessung in GOOGLE EARTH 4.3 nachkontrolliert. Der Manteltest untersucht die Korrelation zwischen den zwei Matrizen (Mantel, 1967). Um die Reproduzierbarkeit der AFLP-Methode zu überprüfen, wurden zudem Manteltests zwischen den genetischen Distanzen der Individuen der statistische Wiederholung und der Individuen des Normaldatensatz angefertigt.

2.7.7 Modellbasierte Analyse der Populationsstruktur

Die Software STRUCTURE vers. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) wurde verwendet um Populationsstrukturen auf Grundlage der Bayesianischen Clustermethode zu errechnen. Unter Heranziehung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wird versucht eine nicht panmixotische Grundgesamtheit in ihre Subpopulationen (K) zu zuweisen. Mittels des Markov Chain Monte Carlo (MCMC)-Algorithmus werden Subpopulationen erkannt und jedes Individuum mit einer Wahrscheinlichkeit (P(X|K)) einem Cluster bzw. Gruppe zugeordnet (Gligor, 2010; Nour, 2010). Es wurden 20 unabhängige Durchläufe für die vordefinierte Anzahl von Subpopulationen K= 1-15 mit einem MCMC Wert und „burn in“ Periode von 10.000 durchgeführt. Delta K wurde nach der Methode von Evanno et al. 2005 berechnet (Evanno et al., 2005). Da *C. bursa-pastoris* jedoch eine hochgradig selbstbestäubende Art ist und somit das Hardy-Weinberg Gleichgewicht nicht vollkommen auf diese Art zutrifft, wurde der Gesamtdatensatz einmal

unter haploider und einmal unter diploider Eingabe analysiert. *C. bursa-pastoris* ist zwar autotetraploid mit disomischer Vererbung, aber während der Chromosomenpaarung in der Meiose verhält sie sich wie ein Diploid. Bei Eingabe als diploide Art wird Fremdbefruchtung vorgegeben. Bei haploider Eingabe wird vollständige Selbstung zugrundegelegt (Hong et al., 2007). Es wurde das Abstammungsmodell „no admixture model“ mit korrelierter Allelhäufigkeit angewendet. Dieses vereinfachte Modell nimmt an, dass das genetische Material von jedem gegebenen Individuum von nur einer Population kommt (Falush et al., 2007). Die gewonnenen Ergebnisse wurden verglichen um herauszufinden ob es große Differenzen zwischen der Eingabeweise des Datensatzes (diploid oder haploid) gibt und anschließend wurde K geschätzt.

2.7.8 Auswertung der Sequenzdaten: Chloroplasten-DNA-Daten und AGdel-Daten

Die generierten Daten von GA3500 (insg. 22 Individuen, siehe Tabelle 12) wurden mithilfe der Software Sequence Scanner v1.0 von Applied Biosystems 2005 und BioEdit version 7.0.0., Isis Pharmaceuticals 2004, ausgewertet. Mithilfe der Software Sequence Scanner wurden die Nukleotidabfolge bei Bedarf nochmals manuell nachbearbeitet. Um die Sequenzen miteinander vergleichen zu können müssen sie passgenau zueinander gestellt werden. Ein solches Übereinander reihen wird als Alignment bezeichnet. Dazu wurden die bearbeiteten Sequenzen in BioEdit importiert und ein Alignment erstellt.

Zusätzlich wurde eine erneute PCR mit den Primern von AGdel für weitere Individuen von DE24, DE25 AT05a, AT11, CZ19 und AT12 (insg. 50 Individuen) durchgeführt und diese über das Gelbild ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 AFLP

Die Analyse der Rohdaten der drei Primerkombinationen NED-ACC, FAM-ACT und VIC-ACG mit Gene Marker lieferte 328 Banden. Der gelbe Primer NED-ACC lieferte 120 Marker, davon 72 monomorph und 48 polymorph. Der blaue Primer FAM-ACT produzierte 122 Marker, 74 monomorph und 48 polymorph. 86 Marker lieferte der grüne Primer VIC-ACG, 57 davon monomorph und 29 polymorph. Insgesamt bestand

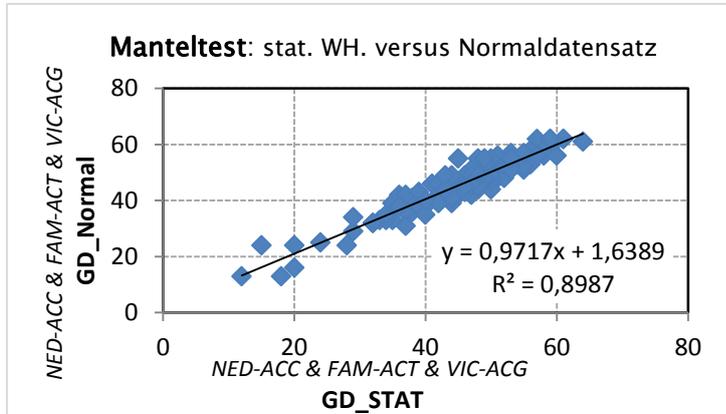


Abbildung 14: Manteltest zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der AFLP-Methode: GD des Normaldatensatzes versus GD der statistischen Wiederholung: 16 Individuen; 125 Marker

die binäre Matrize des Gesamtdatensatzes aus 125 polymorphen Banden und 203 monomorphen Loci. Diese Matrize wurde für alle weiteren Auswertungen verwendet.

Der Manteltest mit den paarweisen genetischen Distanzen (Φ_{PT}) der statistischen Wiederholung und der Individuen im Normaldatensatz ergab in Summe für alle drei verwendeten Primer eine hohe Kongruenz von fast 90% ($p < 0.001$).

3.1.1 Molekulare Diversität

Populationsspezifische Marker konnten nur für wenige Populationen nachgewiesen werden. Darunter zwei Subpopulationen von DE24: DE24-G mit einem privaten Allel und DE24-N mit acht. Die Population DE25 besitzt ein privates Allel. Das Allel kommt in allen Individuen von DE25 vor, wurde aber auch für ein einziges Individuum in AT11 detektiert. In den österreichischen Populationen weist nur AT15 einen populationsspezifischen Marker auf. In den tschechischen Populationen wurde kein privates Allel identifiziert. Auf regionaler Ebene betrachtet, teilen sich Deutschland 12, Österreich 3 und Tschechien 2 „private regionale“ Allele.

Tabelle 22: molekulare Diversität Werte

KÜRZEL Population	Private Allele Population	Private Allele Regionen	% Polymorphismus		Nei Index (H)		Shannon Index (I)		Ø Summe der Allele/ Individuum
DE24	A	0	X*	85.60	X*	0.3130 (0.1725)*	X*	0.4651 (0.2342)*	46
	C	0	X*		X*				
	G	1	53.60		0.1909		0.2875		
	J	0	52.80		0.2057		0.3025		
	N	8	48.00		0.1843		0.2733		
DE25	0-1		39.20		0.1392		0.2080	42	
AT05a	0	AT: 3	52.00	84.80	0.1978	0.2712 (0.176)	0.2934	0.4122 (0.2402)	48
AT11	0		47.20		0.1613		0.2450		49
AT11a	0		47.20		0.1865		0.2725		49
AT12	0		58.40		0.2117		0.3164		47
AT15	1		60.80		0.2274		0.3365		50
CZ08	0	CZ: 2	60.80	80.80	0.2175	0.2767 (0.1925)	0.3267	0.4127 (0.2635)	46
CZ16	0		68.00		0.2406		0.3610		45
CZ17	0		60.00		0.2410		0.3209		35
CZ19	0		54.40		0.2040		0.3024		45

X* Werte für Subpopulation A und C nicht angegeben → ↓ Individuen; *Standardabweichungen in Klammern

Der prozentuelle Anteil an polymorphen Loci variiert über alle drei Regionen nicht bedeutsam und liegt für alle drei Gebiete zwischen 80 und 86%. Den höchsten Wert erzielen insgesamt die deutschen Populationen mit 85,60% an polymorphen Loci. Bei Prüfung der einzelnen Populationen schneidet die tschechische Population CZ16 mit 68 % an polymorphen Loci am höchsten ab. Folglich besitzt CZ16 die höchste Gendiversität ($H=0.2406$) bzw. besitzt den höchsten Wert an Heterozygotie. Den niedrigsten Grad an Polymorphismus wurde in der deutschen Population DE25 gefunden: nur 39.2%. Sie besitzt auch im Vergleich zu allen anderen Populationen die geringsten Werte für den Nei- und Shannon-Index ($H=0.1392$; $I=0.2080$). Bei der Berechnung der durchschnittlichen Anzahl der Allele pro Individuum per Population besitzt die österreichische Population AT15 die meisten Allele und CZ17 die geringste Anzahl. Die Population DE25 zeigt auch im Allel-Reichtum mit durchschnittlich 42 identifizierten Banden pro Individuum einen geringen Wert. Die Werte für alle weiteren Populationen unterscheiden sich nicht gewichtig und sind in Tabelle 22 angeführt.

In Vergleich der prozentualen Anzahl von polymorphen Loci zwischen den *Spe*- und Wildtypindividuen innerhalb der Regionen ist der Prozentsatz bei den Wildtypen höher als in der *Spe*-Varietät. Der genetische Diversitätsindex von Nei sowie der Shannon-Index waren in allen Populationen der Wildtypindividuen höher als in den *Spe*-Individuen derselben Population. Ausnahme bildet die Population DE25. Zu beachten sind hier jedoch die hohen Standardabweichungen.

Tabelle 23: Vergleich prozentualer Anteil polymorpher Loci, Nei-Index und Shannon Index zwischen *Spe* und Wildtyp

Population		Region	% Polymorphismus		Nei-Index (H)		Shannon- Index (I)	
			<i>Spe</i>	<i>Wt</i>	<i>Spe</i>	<i>Wt</i>	<i>Spe</i>	<i>Wt</i>
DE24	A (2spe + 1wt)	DE24	74.40	79.20	0.2357 (0.1760)	0.2721 (0.1795)	0.3622 (0.2497)	0.4103 (0.2949)
	C (1spe + 1wt)							
	G (6spe + 4wt)							
	J (4spe + 4wt)							
	N (3spe + 2wt)							
Σ (16spe + 12w)								
DE25	(6spe + 6wt)	DE25	32	29.60	0.1298 (0.1969)	0.1133 (0.1820)	0.1893 (0.2829)	0.1679 (0.2654)
AT05a	(4spe + 4wt)	AT	72	80	0.2413 (0.1843)	0.2675 (0.1748)	0.3661 (0.2612)	0.4035 (0.2438)
AT11	(4spe + 4wt)							
AT11a	(4spe + 4wt)							
AT12	(4spe + 4wt)							
AT15	(5spe + 7wt)							
CZ08	(4spe + 4wt)	CZ	71.20	74.40	0.2562 (0.2004)	0.2702 (0.1950)	0.3805 (0.2799)	0.4012 (0.2719)
CZ16	(6spe + 6wt)							
CZ17	(4spe + 4wt)							
CZ19	(4spe + 4wt)							

*Standardabweichungen in Klammern

Die Abbildung veranschaulicht den genetischen Unterschied zwischen *Spe*- und *Wt*-Individuen anhand der prozentualen Anzahl der polymorphen Loci. In den Populationen DE24-J und AT11/AT11a sind zwischen den *Spe*-Proben und dem Wildtypen erhöhte Differenzen. Die *Spe*-Individuen sinken hier unter die 15 % Grenze.

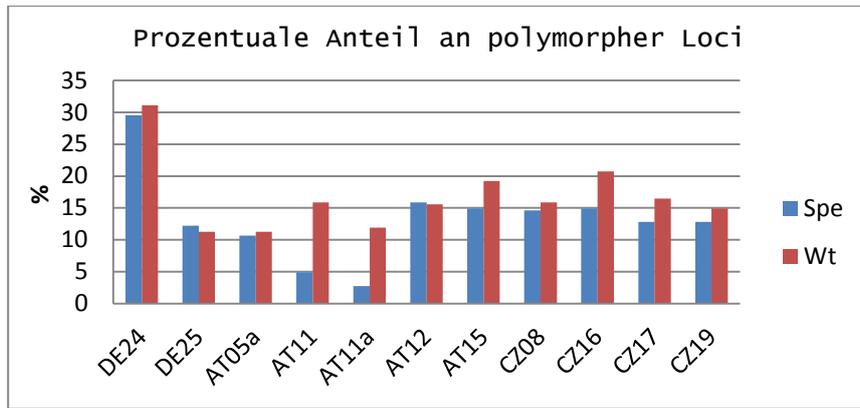


Abbildung 15: Vergleich prozentualer Anteil polymorpher Loci zwischen *Spe* und Wildtyp;

Allerdings geben die angegebenen Werte nur einen ersten Trend an. Für eine statistisch zweckmäßigere Aussage müssten eine höhere Stichprobe und die idente Anzahl an Individuen pro Population in die Berechnung einfließen.

3.1.2 Analyse der molekularen Varianz

Für die hierarchische Analyse der molekularen Varianz, kurz AMOVA, wurden die Länder nach geographischen Zonen eingeteilt, was sinnvoller erschien als die strikte territoriale Beurteilung. Deshalb wurde Deutschland in eine mittlere Zone mit DE25 (Warburg) und einer südlicheren Zone mit den Subpopulationen von DE24 (Gau-Odernheim: 5 Subpopulationen) differenziert und die österreichischen und tschechischen Populationen einer Zone (9 Populationen) zugewiesen. Die Berechnung der AMOVA (999 Permutationen) beruht auf 125 polymorphen Marker der drei Primer.

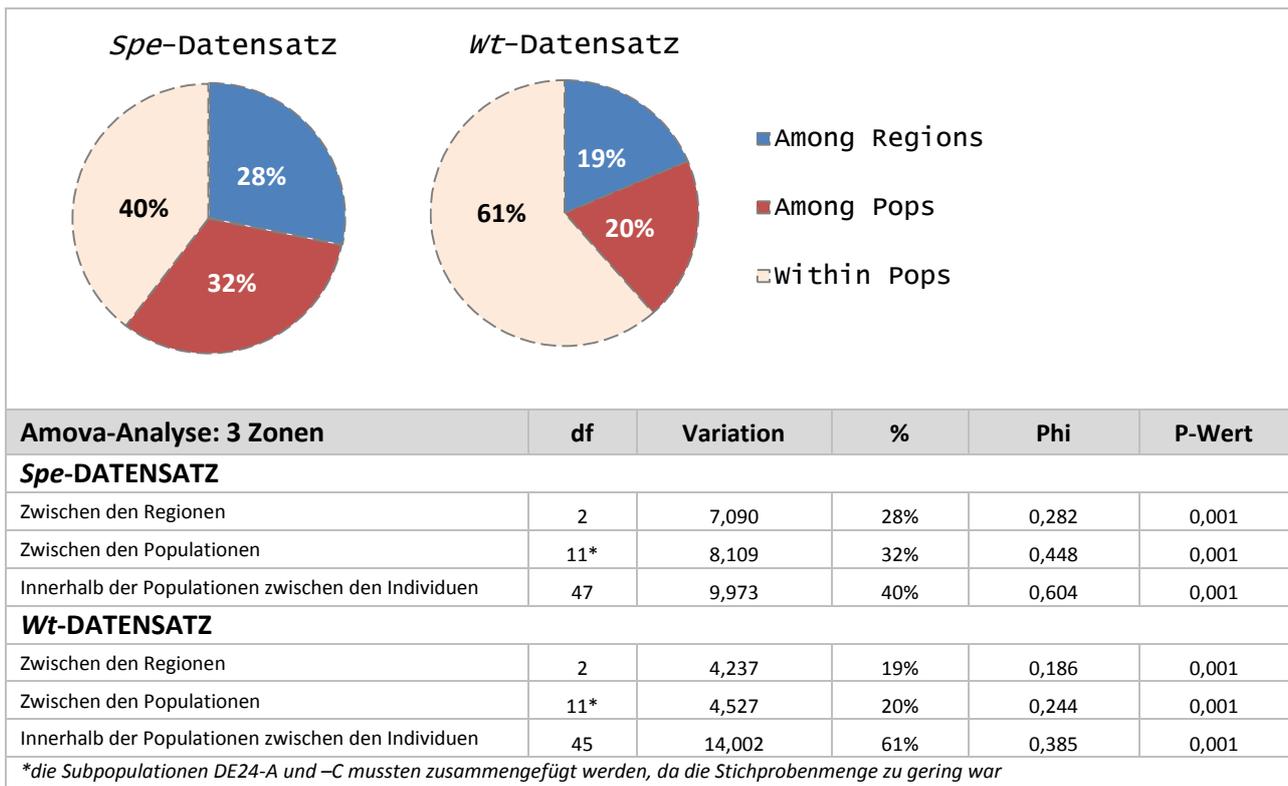
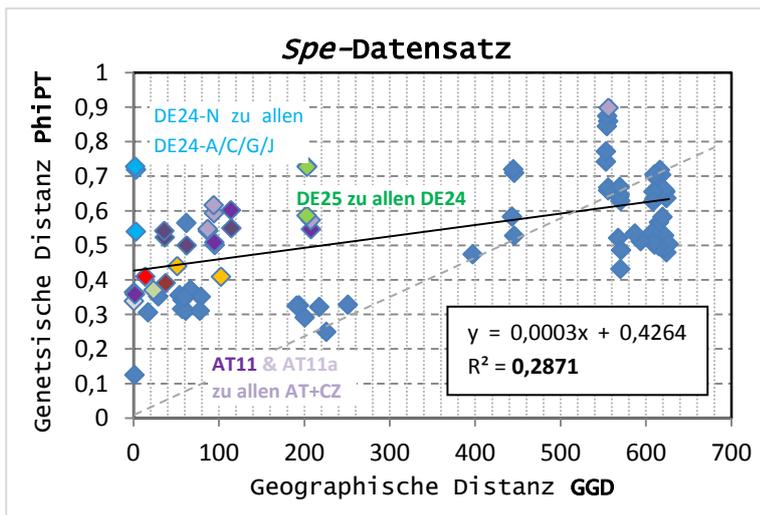


Abbildung 16: Amova-Analyse: *Spe*-Datensatz; Wildtypen-Datensatz

Die AMOVA ergab für die dekandrische Blütenvariante eine deutlich niedrige genetische Variation innerhalb der Populationen zwischen den Individuen von 40%, der Wildtyp lag mit 61% weitaus höher. Rund 32% entfallen bei der *Spe*-Varietät auf die genetischen Unterschiede zwischen den Populationen, auf den Wildtypen nur 20%. 28% der genetischen Variation werden in *Spe* durch die Unterschiede zwischen den Zonen bzw. Regionen erklärt. Im Wildtypen sind es nur 19%. Alle Werte sind hochsignifikant ($p < 0.001$).

3.1.3 Manteltest: Beziehung zwischen geographischen und genetischen Distanzen in *Spe*

Der Manteltest der dekandrischen Varietät, zeigt einen schwachen Zusammenhang zwischen durchschnittlichen geographischen und



schnittlichen geographischen und paarweise genetischen Distanzen von 29%, $r(28,71) = 0,54$; $p < 0,01$. Somit werden fast 29% der Streuung der genetischen Distanz durch die geographische Distanz erklärt.

In der Korrelation in Abbildung ist ersichtlich, dass die Population DE25 (Warburg) ausreißt. Sie besitzt zu allen anderen deutschen Populationen (DE24) keinen Zusammenhang zwischen genetischer ($\phi 0,6725$) und geographischer Distanz ($\phi 200\text{km}$). Auch gibt es innerhalb der deutschen Subpopulationen zwischen DE24-N zu

Abbildung 17: *Spe*-Manteltest geographische versus genetischer Distanz

DE24-A/C/G/J keine Beziehung ($\text{Phi}_{PT} = \phi 0,663$ und $\text{GGD} = \phi 4,4\text{km}$) zwischen den zwei Faktoren. DE24-N weist im Vergleich zu den geringen geographischen Entfernungen gesteigerte genetische Distanzen zu den anderen Subpopulationen auf. Zusätzlich besitzen die *Spe*-Individuen der Populationen AT11 und AT11a unverhältnismäßig hohe genetische Distanzen ($\text{Phi}_{PT} = \phi 0,516/0,556$ und $\text{GGD} = \phi 90\text{km}$) zu den tschechischen und anderen österreichischen *Spe*-Populationen.

Die paarweisen genetischen Distanzen der *Spe*-Varietät sind durchschnittlich höher als die der Wildtypen (nicht gezeigt). Im Anhang unter Punkt 6.3 befinden sich die Tabellen für die genetischen und geographischen Distanzen für die verschiedenen Datensätze sowie die dazugehörigen Abbildungen der Manteltests für den Gesamtdatensatz und des Wildtypendatensatzes.

3.1.4 Principal Coordinates Analysis (PCoA)-Gesamtdatensatz

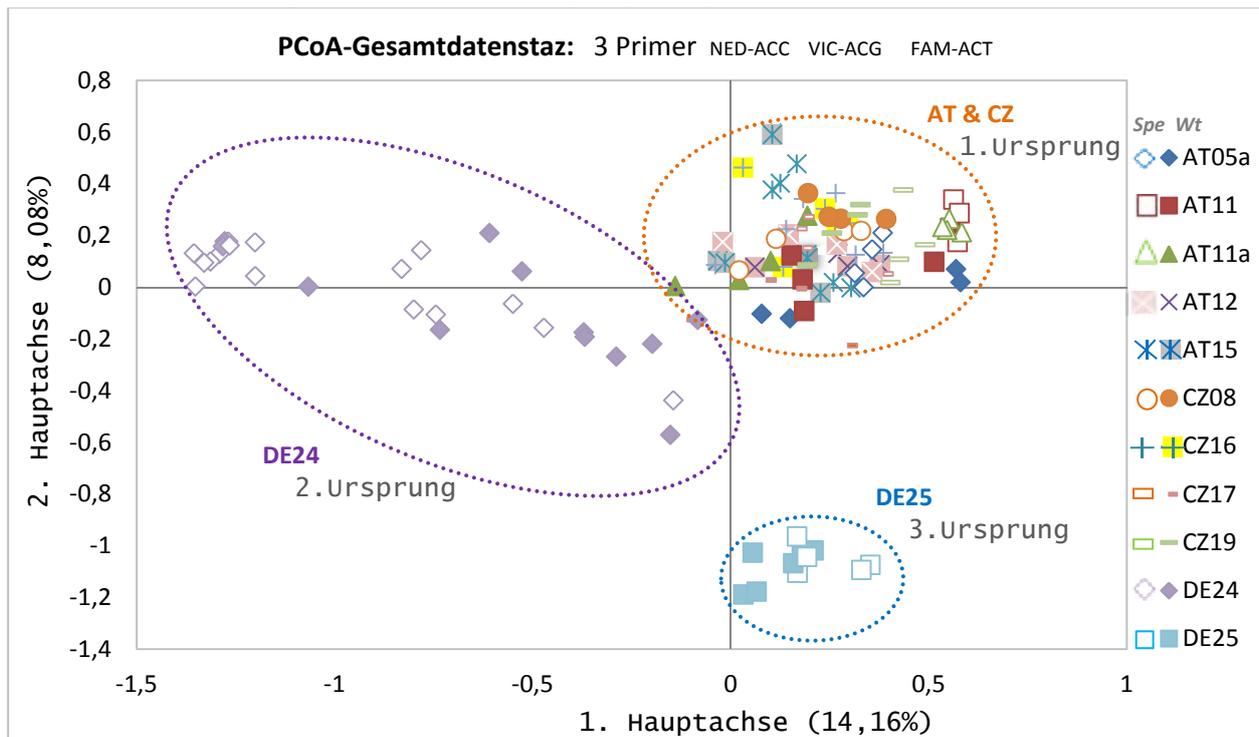


Abbildung 18: PCoA-Gesamtdatensatz: 125 polymorphe Marker ; 11 Standorte: 120 Individuen

Abbildung zeigt die PCoA aller Standorte für alle drei analysierten Primer. Die 1. Hauptachse trennt die österreichischen und tschechischen Populationen sowie die deutsche Population DE25 von den anderen deutschen Populationen (DE24). Die 2. Hauptachse trennt die österreichischen und tschechischen Populationen von der Population DE25. Die 1. Achse erklärt 14,16% der Variabilität, die 2. Achse 8,08%. Die österreichischen und tschechischen Populationen sind nicht voneinander trennbar und bilden ein gemeinsames Cluster. Das stark geklumpete Muster von DE25 unterstreicht die geringere genetische Diversität innerhalb der Population. DE24 streut sich weit im Feld und lässt auf eine hohe genetische Vielfalt schließen. Die österreichischen und tschechischen Individuen bilden einen gemeinsamen Pool und breiten sich nur mäßig aus. Die *Spe*-Phänotypen ordnen sich ihrer geographischen Region bzw. Population zu und bilden kein getrenntes Cluster. Keiner der drei verwendeten Primer konnte die österreichischen von den tschechischen Populationen abgrenzen. Der gelbe Primer NED-ACC ist hauptverantwortlich für die Abtrennung in die drei geographischen Regionen wie sie auch in Abbildung ersichtlich ist. Der grüne Primer VIC-ACG trug nur wenig zur Differenzierung zwischen den Regionen bei. Der blaue Primer FAM-ACT trennte DE24 von den restlichen Populationen ab, teilte jedoch nicht DE25 von den österreichischen und tschechischen Populationen ab.

3.1.4.1 PCoAs der Teildatensätze für *Spe*- und Wildtyp

Der Gesamtdatensatz ließ keine großgeographischen Cluster zwischen *Spe* und Wildtypen erkennen. Die *Spe*-Individuen gruppieren sich mit dem Wildtypen derselben Population, Region. Somit lassen sich innerhalb der drei möglichen Ursprungsregionen (DE24; DE25; AT&CZ) keine Differenzierung nach Phänotyp nachweisen. Dies konnte lediglich auf Populationsebene beobachtet werden. Der blaue Marker FAM-ACT führte überwiegend zu dieser Differenzierung. Die durchgeführten PCoAs aller Populationen aus allen Regionen ergaben zwar keine eindeutige Einteilung der zwei Blütentypen, jedoch stets eine Tendenz sich innerhalb einer Population eher seinem Phänotyp zuzuordnen. Alle PCoAs sind im Anhang 6.4 ersichtlich.

3.1.5 Software STRUCTURE

Durch das Programm STRUCTURE wurde die Zuordnung der einzelnen Individuen zu Subpopulationen modelliert. Dabei machte es keinen Unterschied ob der Gesamtdatensatz als diploid (Annahme Fremdbefruchtung) oder haploid (Annahme Selbstbefruchtung) in die Modellierung einfluss. In beiden Fällen wurde ein ΔK –Wert von 3 berechnet. Daraus würde folgen, dass innerhalb der 11 Populationen insgesamt drei genetische Strukturen am wahrscheinlichsten sind. In die erste genetische Struktur fallen alle österreichischen und tschechischen Populationen. Die zweite genetische Struktur formiert sich in Gau-Odernheim (DE24). Eine dritte genetische Struktur wurde für die Population DE25 analysiert.

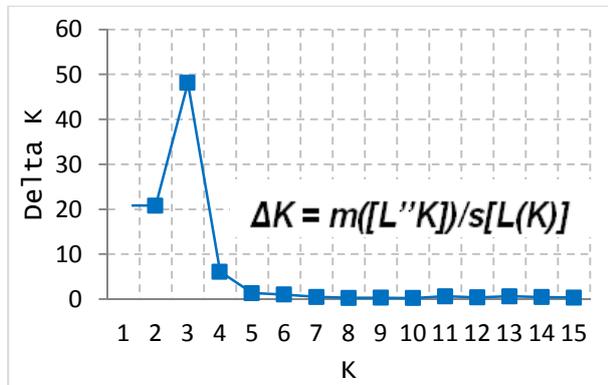


Abbildung 19: Berechnung von Delta K nach Evanno et al. 2005

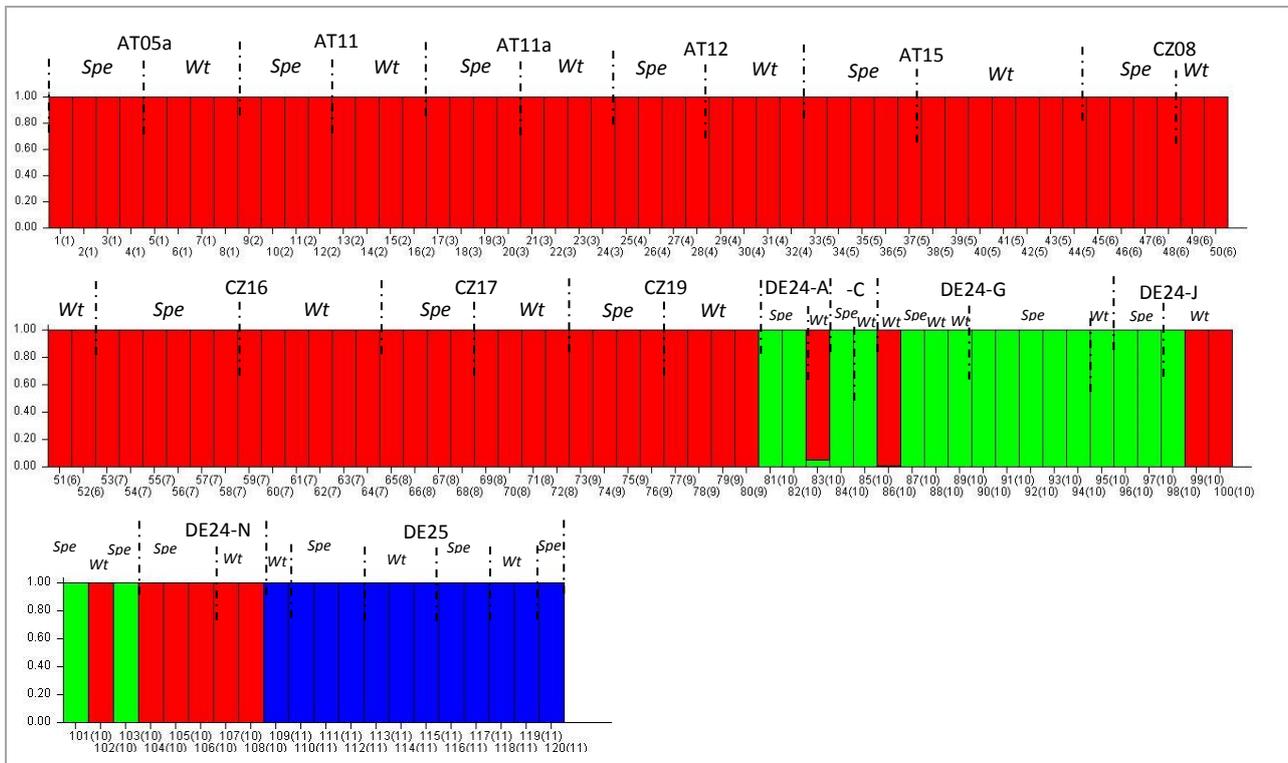


Abbildung 20: Balkendiagramm der geschätzten genetischen Cluster: K=3, no admixtur model;

Das Balkendiagramm lässt erkennen, dass einige Wildtypen von DE24 dem ersten genetischen Cluster von AT und CZ zugewiesen werden (DE24-A24wt, DE24-G10wt, DE24-J14wt, DE24-J16wt und DE24-J19-1wt). Auch alle Individuen von Subpopulation DE24-N liegen im ersten Cluster.

3.2 Sequenzierung

3.2.1 Alignments trnL und AGdel mit Gelbildvergleich

Tabelle 24: Alignment trnL-trnF und AGdel mit Gelbildvergleich

Individuum	ALIGNMENT							Gelbild Bande
	trnL				Agdel			
	Basen-Position				SUB.	SUB.	Deletion	
	31	43	215	738	38	135-138	139-160	
AT05a-12spe	C		G	T	T	CAAA	x	Spe*
AT05a-17wt	C		T	T	T	CAAA	x	Spe
AT11-02spe	C		T	T	T	CAAA	x	Spe
AT11-11wt	C		G	T	T	CAAA	x	Spe
AT15-01spe	C		G	T	T	CAAA	x	Spe
AT15-06wt	C		T	T	A	TTGT	AGTTTTGGAAAGAAAAAATAT	Wt*
AT12-03spe	C		G	T	A	TTGT	AGTTTTGGAAAGAAAAAATAT	Wt
AT12-08wt	C		T	T	A	TTGT	AGTTTTGGAAAGAAAAAATAT	Wt
CZ08-02spe	x		x	x	x	x	?	Doppel-Bande
CZ08-23wt	x		x	x	x	x	?	Doppel-Bande
CZ16-03spe	C		G	T	T	CAAA	x	Spe
CZ16-08wt	C		G	T	A	TTGT	AGTTTTGGAAAGAAAAAATAT	Wt
CZ17-03spe	C		G	T	T	CAAA	x	Spe
CZ17-06wt	C		G	T	A	TTGT	AGTTTTGGAAAGAAAAAATAT	Wt
CZ19-06spe	C		T	T	T	CAAA	x	Spe
CZ19-12wt	C		G	T	T	CAAA	x	Spe
DE24-N11-1spe	C		G	G	T	CAAA	x	Spe
DE24-G23-spe	C		T	G	T	CAAA	x	Spe
DE24-N9-1wt	C		G	T	T	CAAA	x	Spe
DE24-G20wt	C		T	T	T	CAAA	x	Spe
DE25-1 20-1wt	C		T	T	T	CAAA	x	Spe
DE25-1 21-3spe	G	T+	T	T	T	CAAA	x	Spe

*Spe= im Sinne von Deletion vorhanden; Wt= Deletion nicht vorhanden

Der intergenic spacer zwischen trnL (UAA)- Exon und trnF (GAA) Gen war für die 22 untersuchten Individuen bis auf vier Positionen homolog. Eine Neighbour-Joining Analyse lieferte keine Auflösung die zur Klärung der Forschungsfrage relevant war und daher wurden keine weiteren Analysen durchgeführt.

Im Alignment von AGdel waren nur fünf der untersuchten Proben (AT15-06wt/AT12-03spe/AT12-08wt/CZ16-08wt und CZ17-06wt) ohne die Deletion der 22 Basenpaaren in Position 139-160. Dieselben Individuen besaßen 4 Substitutionen in Position 135 bis 138 und eine weitere Substitution in Position 38, welche jedoch nicht zu 100% eindeutig war. Proben welche die Deletion nicht besaßen liefen im Gelbild etwas weiter als die Individuen mit Deletion wie in Abbildung ersichtlich ist. Bei Doppelbänden wie etwa in den tschechische Proben (CZ08-02spe und -23wt) wurde der ExoFastAp-Verdau nicht durchgeführt und eine Wiederholung des QIAquick PCR Purification Kit wurde nicht vollzogen. Diese Sequenzmotive waren somit ausständig im Alignment.

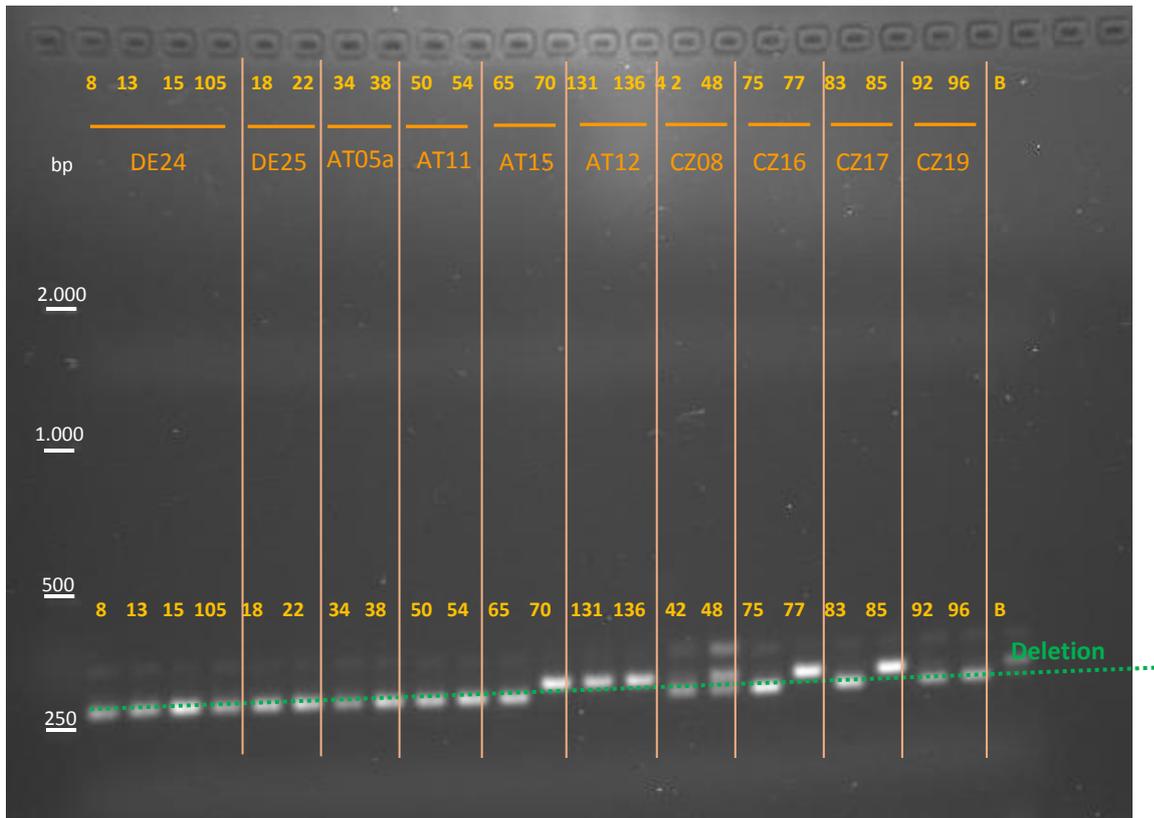


Abbildung 21: Kontrollgel: AGdel 90min 90Volt

Durch den Abgleich von Alignment und Gelbild konnte darauf geschlossen werden, dass das Vorhandensein oder die Abwesenheit der Deletion schon am Gelbild sichtbar wurde. Keine Aussage konnte über Proben getroffen werden, die eine Doppelbande im Gelbild aufzeigten. Deshalb wurden weitere Individuen wie im Methodenteil unter Punkt 2.6.5 schon erläutert, lediglich über ein Kontrollgel überprüft. Von den insg. 72 untersuchten Individuen, die Hälfte mit *Spe*-Phänotyp und die andere mit wildtypischen Phänotyp, besaßen 81% der *Spe*-Individuen die Deletion. Nur 8% der geprüften *Spe*-Proben wiesen keine Deletion auf. Bei den Wildtypen hatten 50% der untersuchten Proben keine Deletion, jedoch zeigten fast die Hälfte der analysierten Individuen (47%) die Deletion auf.

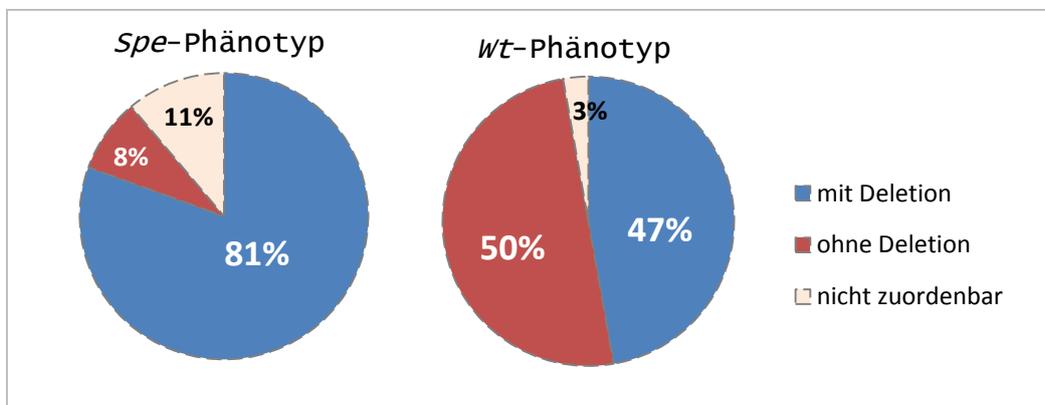


Abbildung 22: Kreisdiagramm der prozentualen Anteile an Individuen mit und ohne Deletion: insg. 72 untersuchte Individuen: 36 *Spe*-Phänotyp; 36 *Wt*-Phänotyp;

In allen untersuchten Populationen wurden Wildtypindividuen mit Deletion gefunden. Ausnahme bildete die Population CZ19. In dieser Population wurde in den untersuchten vier Wildtypen keine Deletion identifiziert.

4. Diskussion

Die folgenden Kapitel sollen Aufschluss geben ob die aufgestellten Hypothesen verifiziert oder falsifiziert werden müssen. Dabei soll geklärt werden ob es molekulare Diversitätsunterschiede zwischen *Spe* und Wildtypen und zwischen den einzelnen Populationen gibt. Weiters wird über mögliche Ursprünge und über die molekulare Ursache von *Spe* eingegangen.

Bei allen gewonnen Ergebnissen ist jedoch zu berücksichtigen dass die beprobten Populationen unterschiedlich in ihrer Größe waren und auf unterschiedlichen ökologischen Standorten vorkamen. Größere Populationen lassen eine gesteigerte Vielfalt und eine größere effektive Populationsgröße erwarten, wobei auch zahlreiche Gegenbeispiele bekannt sind (Frankham, 1996; Richter, 2008). Auskreuzungsraten basierend auf allozymalen Daten werden für *C. bursa-pastoris* auf 0% bis 12% geschätzt (Hurka und Neuffer, 1997). Der Grad an Homozygotie steigt als Funktion der Selbstungsrate und führt zur Reduktion der effektiven Populationsgröße (Ness et al., 2010). Die selbstende *C. rubella* besitzt beispielsweise verglichen mit der selbstinkompatiblen *C. grandiflora* eine 100-bis 1.500 fache Reduzierung der effektiven Populationsgröße (Foxe et al., 2009). Daraus könnte geschlossen werden, dass wie im Falle der hochgradig selbstenden *C. bursa-pastoris* mit einer geringeren Anzahl an Individuen die effektive Populationsgröße gut abgedeckt sein kann. Dies würde auch dafür sprechen, dass die durchschnittlich acht entnommenen Stichproben die Population statistisch ausreichend vertreten könnten.

4.1.1 Unterschiede der molekularen Diversität zwischen den Blütenvarianten

Unterschiede auf Populationsebene

- *Private Allele / Nei's (1973) Gendiversität (H) / Shannon Index (I, Lewontin 1972) / prozentuale Anteil polymorpher Loci / durchschnittliche Anzahl an Banden pro Individuum*

Die molekulare Variabilität ist eine bedeutende Grundlage für die Anpassungsfähigkeit auf Veränderungen der Umwelt einer Population und ist somit für den Erhalt einer Population meist von Vorteil (Pertoldi et al., 2007). Die Anzahl der privaten Allelen (=einmalig auftretende Allele) ist eine praktische Methode um erste Vermutungen zu treffen wie individuell bzw. verschieden eine Population zu anderen Populationen ist. Private Allele können zur Berechnung des Genflusses zwischen den Populationen eingesetzt werden (Kalinowski, 2004). Die Subpopulation DE24-N, die etwas entfernter von Gau-Odernheim liegt und insgesamt acht private Allele aufweist, stach als einzige Population in den Resultaten heraus. Sie befindet sich am sogenannten Kreuzberg, der bereits zur Ortsgemeinde Dolgesheim gehört. DE24-N besitzt die größte geographische Distanz zu allen anderen Subpopulationen von Gau-Odernheim. Die restlichen Populationen gehören zur Gemeinde Gau-Odernheim. Die Population G, C, und A befinden sich alle in unmittelbarer Umgebung auf dem Petersberg. Die Population J befindet sich etwas entfernter auf dem sog. Lieberg.

Jeweils ein privates Allel wurde noch für die Subpopulation DE24-G und AT15 (Poysdorf) gefunden. Der Genfluss zwischen den gesamten Populationen mit Ausnahme von der Subpopulation DE25-N ist demnach hoch. Die Exklusivität von Allelen in einer Population hängt von der Zeit und der Migrationsrate ab. Die Zahl der privaten Allele sinkt, wenn die Migrationsrate steigt (Allendorf et al., 2013). Die Wahrung der privaten Allele von Subpopulation DE24-N könnte somit ein Anzeichen sein, dass entweder von außen neues genetisches Material eingeflossen ist, sich aber die Population bislang nicht mit den anderen Populationen in Gau-Odernheim mischt.

Der prozentuale Anteil an polymorphen Loci der Populationen zwischen Deutschland, Österreich und Tschechien war nicht bedeutsam unterschiedlich, wobei Deutschland den höchsten Wert mit 85,60% erlangte. Die Analysen der genetischen Diversität nach Nei und Shannon's Informations Index zeigten insgesamt auch für die Populationen in Deutschland die höchsten Werte ($H=0.3130$; $I=0.4651$). Hauptsächlich verantwortlich sind hierfür sicherlich die Diversität der untersuchten Subpopulationen von Gau-Odernheim und dabei insbesondere die Ungleichheit von DE24-N, sowie die erhöhte Verschiedenheit von DE25 zu den Subpopulationen von DE24. Bei Betrachtung der einzelnen Populationen besitzen jedoch die tschechischen Populationen die höchsten Indices. Der berechnete Allelreichtum der Population CZ17 war mit durchschnittlich 35 identifizierten Fragmenten pro Individuum am geringsten. Die genetische Diversität fiel jedoch durchschnittlich nicht niedriger aus als bei anderen Populationen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Population sehr heterogen ist mit einer geringeren Anzahl an gefundenen Banden. Ein plausibler Grund könnte ein nicht vollständig geglückter Teilschritt während der AFLP-Methode sein, der womöglich einen verstärkten Ausfall von PCR-Fragmenten zur Folge hatte.

Auffällig ist die Population DE25 (Warburg). Sie erlangt die minimalsten Werte für den prozentualen Anteil an polymorphen Loci (39.20) sowie für den Nei und Shannon Index ($H=0.1392$; $I=0.2080$). Diese Werte weisen auf einen verminderten Genaustausch sowie einen erhöhten Grad an Homozygotie hin. Der Standort der Population DE25 befindet sich auf der Kuppe des Basaltkegels „Desenberg“, der einzige Hügel der Umgebung. Die Grundgesamtheit der Population besteht nur aus wenigen Individuen. Eine mögliche Erklärung für die geringe genetische Variabilität dieser Population könnte ein Gründereffekt oder Flaschenhalseffekt bzw. eine Kombination davon sein (Hedrick, 2011). Entweder gelangten nur einige Individuen auf den Hügel oder eine ehemals größere Population schrumpfte auf den jetzigen Bestand. Zweiteres könnte auf eine mangelnde Störung der Bodennarbe beruhen, welche *C. bursa-pastoris* braucht um zu keimen (Holzner und Glauninger, 2005). Ferner kann davon ausgegangen werden, dass die Migrationsraten zwischen den Populationen der umgebenden Ebene mit der untersuchten Population am Hügel gering sind. Quelle für neu eingebrachtes Samenmaterial könnten vor allem Wanderer bzw. Touristen sein.

Unterschiede zwischen *Spe* und *Wt*

- *Nei's (1973) Gendiversität (H) / Shannon Index (I, Lewontin 1972) / prozentuale Anteil polymorpher Loci*

Punkt a der ersten Hypothese kann angenommen werden. Zwischen *Spe* und Wildtypen gibt es geringe Unterschiede in der molekularen Diversität. Die dekandrische *C. bursa-pastoris* besitzt im Gegensatz zum wildtypischen *C. bursa-pastoris* desselben Standortes eine geringere molekulare Diversität.

Der Vergleich zwischen *Spe* und Wildtypindividuen zeigte, dass der prozentuale Anteil an polymorphen Loci stets für die Wildtypen höher als für die *Spe*-Variante war. Einzige Ausnahme bildete DE25 wobei der Unterschied jedoch gering ausfiel. Die Werte für Nei- und Shannon Index waren ebenfalls für die *Spe*-Varietät geringer als für den Wildtypen. Ähnliche Werte erhielt auch Hameister et al. (2009) für die Individuen aus Gau-Odernheim. Diese Studie berechnete für den Wildtypen einen Nei Index von 0.329 für *Spe* 0.229 und der Shannon Index lag für den Wildtypen bei 0.449 und für *Spe* bei 0.374. Die

Abbildung unterstreicht den Unterschied zwischen *Spe* und Wildtypen anhand des prozentualen Anteils an polymorphen Loci für die einzelnen Populationen graphisch. Die *Spe*-Individuen liegen entweder gleich auf oder unter denen des Wildtyps. Die großen Differenzen zwischen den *Spe*-Individuen und Wildtypen in den Populationen DE24-J, AT11 und AT11a sind wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die *Spe*-Varianten in diesen Populationen auf ein Mutterindividuum zurück gehen und deshalb unbeabsichtigt Schwesternindividuen besammelt wurden.

Die verminderten Werte für den Shannon und Nei –Index sowie der geringeren Anteil an polymorphen Fragmenten, bzw. Loci spricht für geringere Auskreuzungsraten und eine erhöhte Homozygotie in *Spe*. Diese Resultate unterstützen bereits gewonnene Ergebnisse aus anderen Studien und bekräftigen diese Tatsache auch für eine höhere Anzahl an untersuchten Populationen welche über einen größeren geographischen Raum verstreut sind. Die dekandrische Variante wird nur etwa halb so oft von potentiellen Bestäubern besucht (Ziermann et al., 2009). Auch gibt es signifikante Unterschiede im Blühzeitpunkt in *Spe*. Gewächshausversuche zeigten, dass *Spe* durchschnittlich 19 Tage später aufblüht als die wildtypische *C. bursa-pastoris* (Hameister et al., 2009). Es deutet darauf hin, dass die gefundene Differenz im Blühbeginn zwischen *Spe* und Wildtypen sowie die verminderte Attraktivität für potentielle Bestäuber in *Spe* den bereits hohen Selbstungsgrad von *C. bursa-pastoris* (88-79%) in *Spe* verstärken (Hurka et al., 1989; Hameister et al., 2009) bzw. den Genfluss zwischen den zwei Blütentypen vermindern. Das Zusammenwirken dieser Faktoren könnte eine reproduktive Isolation von *Spe* begünstigen. Trotz des unterschiedlichen Aufblühens gibt es aber Überschneidungen im Blühzeitraum (Hameister et al., 2009). Kreuzungen zwischen *Spe* und Wildtypen finden statt. Dies beweisen die im Freiland gefundenen intermediären Individuen (Hameister 2014, mündliche Mitteilung). Untersuchungen zur Fitness von *Spe* und Wildtypen zeigten keine Nachteile für *Spe* (Hameister et al., 2009). Dies spricht dafür, dass sich die kronblattlose Varietät an manchen Standorten schon seit mehr als 200 Jahren gegenüber dem sympatrischen Wildtypen behaupten kann, auch wenn das Vorkommen der wildtypischen *C. buras-pastoris* dominiert (Opiz, 1821; Trattinnick 1821 Hameister 2014, mündliche Mitteilung).

- *AMOVA / Manteltest geographische versus genetische Distanzen in Spe*

Punkt b der ersten Hypothese kann für Spe angenommen werden. Die genetische Variation innerhalb der Populationen ist geringer als die zwischen den untersuchten Populationen. Auf den Wildtypen trifft diese Aussage nicht zu. Im Allgemeinen besitzen weiter entfernte Populationen auch größere genetische Distanzen zueinander.

Die Fähigkeit zur Autogamie ermöglicht Selbstbestäuber mit nur einzelnen Individuen eine erfolgreiche Besiedlung neuer Gebiete auch über größere Distanzen. Diese neue Kolonisierung resultiert aber zumeist in einer Verringerung der genetischen Diversität durch Flaschenhalseffekte und reproduktiver Isolation gesteuert durch einen meist limitierten Genfluss. Diese Dynamiken führen zur Erhöhung der Differentiation zwischen den Populationen (Baker, 1955; Pannell und Barrett, 1998). Von selbstenden Spezies wird somit angenommen, dass sie im Vergleich zu auskreuzenden Spezies innerhalb der Population weniger genetisch divers sind und einen geringeren Wert an Heterozygotie aufzeigen und zwischen den Populationen eine erhöhte genetische Differenzierung besitzen (Charlesworth und Charlesworth, 1995). Nichts desto trotz ergab die Amova für den Wildtypen, dass der Hauptanteil der erklärten genetischen Varianz mit 61% auf die genetischen Unterschiede innerhalb der Populationen zwischen den Individuen zurückzuführen ist. Die AMOVA des *Spe*-Datensatzes weicht jedoch stark ab. Hier entfallen nur 40% der genetischen Varianz auf die Unterschiede zwischen den Individuen in den

Populationen. Diese Resultate sind auch konform mit den Ergebnissen des Nei- und Shannonindex, die stets niedrige Werte für die *Spe*-Variante zeigten.

Unter Vernachlässigung des Faktors Region bzw. Zone (nicht dargestellt), der aus historischen und biogeographischen Hintergründen schwierig war zu definieren, wird der Gegensatz noch drastischer bemerkbar. Für den Wildtypendatensatz entfallen 68% der Gesamtvariation auf die genetischen Unterschiede innerhalb der Population zwischen den Individuen und nur 32% sind zurückzuführen auf die Unterschiede zwischen den Populationen. *Spe* jedoch besitzt die höhere genetische Varianz mit 55% zwischen den Populationen und 45% sind erklärt durch die Unterschiede innerhalb der Populationen zwischen den Individuen. Für weitverbreitete selbstenden Arten geht man von einem durchschnittlichen *Gst*-Wert von 0.446 aus (Hamrick und Godt, 1996). Die ermittelten Resultate der *Spe*-Variante passen somit eher in die angenommenen Werte für selbstende Arten. Die genetische Variabilität der Wildtypen widerspricht somit der allgemeinen Annahme von geringerer molekularer Diversität bei hochgradig selbstenden Arten.

Auskreuzungswerte können bei *C. bursa-pastoris* variieren. Bei zum Beispiel sonnigen und trockenen Wetter steigen diese. Die erhöhte genetische Diversität könnte auch auf Individuen zurückzuführen sein, welche durch Umbruch der Bodenschichten die Möglichkeit zum Keimen erfuhren (Hurka, 1990). In gestörten Biotopen wie es etwa Weinbauflächen sind, nimmt die genetische Vielfalt von *C. bursa-pastoris* zu (Bosbach et al., 1982). Da *C. bursa-pastoris* schon jeher ein alter Kulturbegleiter der Menschheit ist, fand und findet sein Ausbreitungsweg unterschiedlich zur natürlichen Kolonisierung statt. Die menschenabhängige Verbreitung von Pflanzen tendiert dazu eine größere Anzahl von Ausbreitungsformen von verschiedenen Ressourcen in weniger Zeit einzuführen (Simberloff, 2009; Wilson et al., 2009). In eingeschleppten invasiven Arten wurde herausgefunden, dass die genetische Diversität zwischen Ausgangspopulationen und nativen Populationen gleich war. Keine starken Flaschenhalseffekte wurden nachgewiesen (Bossdorf et al., 2005). Die geringe genetische Variation von *Spe* zwischen den Individuen könnte auch auf einen relativ jungen Ursprung von *Spe* hindeuten. Die ältesten Funde der dekandrischen Varietät sind für Prag und Wien datiert. Auch die Werte der Nei-Indizes der österreichischen und tschechischen *Spe*-Individuen sind etwas höher als die der Deutschen. Doch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die *Spe*-Variante vor Ort immer wieder neu entsteht.

Eine Schlussfolgerung könnte sein, dass sich die Populationen von *C. bursa-pastoris* in diesem Untersuchungsgebiet ähnlich wie Metapopulationen verhalten. Bei diesem Ansatz wird angenommen, dass sich das Populationssystem in räumlich getrennte Subpopulationen gliedert, welche durch eingeschränkte Migration bzw. Genfluss miteinander in Verbindung stehen (Levins, 1969; Hanski und Simberloff, 1997). Dabei kann es vorkommen, dass Subpopulationen aussterben und sich an der selben oder neuen Stelle wieder ansiedeln. Auf unsere Arbeit übertragen, würde das heißen, dass die Metapopulationen relativ gut vernetzt sind. Die genetische Diversität innerhalb dieser Metapopulationen ist hoch und auch die Auskreuzungsraten wären zumindest im Wildtypen höher als angenommen. Die Aussterberaten sind somit neben der Migration besonders von anthropogenen Störungen und der Bodensamenbank abhängig. Eine Studie in der jährlich systematisch alle lebenden Individuen von *C. bursa-pastoris* über einen langen Zeitraum entfernt wurden, zeigte, dass selbst nach 35 Jahren noch lebensfähige Samen gefunden wurden (Baskin und Baskin, 1998).

Im Manteltest, der die genetischen Distanzen zu den geographischen Entfernungen korrelierte, wurde festgestellt, dass grundsätzlich bei steigenden geographischen Distanzen sich auch die genetischen Distanzen erhöhen, auch wenn der Zusammenhang schwach war. Bei Ausklammerung von AT11 und AT11a (Besammlungsfehler) sowie DE24-A und C (zu geringe Stichprobenanzahl) bleiben DE24-N und

DE25 als „Sonderfall“ übrig. DE24-N sowie DE25 besitzen geringere genetische Distanzen zu den österreichischen und tschechischen Populationen als wie zu den anderen deutschen Populationen, die geographisch näher liegen würden. Diese Ablösung der Subpopulation DE24-N zu allen anderen Subpopulationen von Gau-Odernheim zeichnete sich schon durch das Vorhandensein seiner acht privaten Allele ab. Der abgesonderte Standort von DE25 und die damit vermutlich verbundene genetische Verarmung führen u.a. zu einer erhöhten genetischen Distanz.

4.1.2 Entstehungsgeschichte von *Spe*

- *PCoA Gesamtdatensatz / PCoAs der Teildatensätze für Spe und Wildtypen / Ergebnisse der Software STRUCTURE*

Der Hypothese eines mehrfach unabhängigen lokalen Ursprungs von *Spe* kann zugestimmt werden. Die Ursprünge liegen aufgrund der gewonnenen Resultate vermutlich in Deutschland mit Gau-Odernheim, ein Zweiter in Tschechien-Österreich und ein dritter Ursprung könnte in der deutschen Population DE25, Warburg, begründet sein. Diese Aussage wird durch das Ergebnis der PCoA des Gesamtdatensatzes sowie der modellbasierten STRUCTURE-Analyse bekräftigt. Der *Spe*-Phänotyp ordnet sich seiner Region bzw. Zone zu und bildet kein großgeographisches *Spe*-Cluster.

Die PCoA des Gesamtdatensatzes zeigte eine klare Abtrennung von der Population DE25 (Warburg). Auch waren die deutschen Subpopulationen von Gau-Oderheim von den restlichen österreichischen und tschechischen Populationen abgrenzbar. Der dekandrische Blütentyp gruppiert sich nicht getrennt in ein eigenes Cluster, sondern ordnet sich in diesen drei Zonen ein. Die Dissertation von Hameister 2009a zeigte für die damals untersuchten deutschen und österreichischen Population in der Hauptkoordinaten-Analyse unter Heranziehung von 101 AFLP-Markern und acht Isoenzymen (Aspartataminotransferase) eine ähnliche Clusterung. Die Subpopulationen von DE24 bildeten ein eigenes Cluster, die Population DE25 formierte eine eigene Gruppe und die österreichischen *Spe*-Individuen gruppierten sich in diesem Falle zusammen mit den untersuchten russischen *Spe*- und Wildtypproben. Die drei gefunden Gruppierungen dieser Masterarbeit weisen auf drei unterschiedliche Ursprünge der *Spe*-Blütenvariante hin.

Die Population von DE24 stellt die größte Population dar und wurde daher in mehrere Subpopulationen unterteilt. Die weite Streuung der DE24-Subpopulationen und somit auch der *Spe*-Varietät könnte auch in Gau-Odernheim auf eine Mehrfachenstehung von *Spe* hindeuten. Die Masterarbeit von Niepötter 2007, welche insgesamt 15 Subpopulationen von Gau-Odernheim untersuchte, schloss aufgrund von Isoenzymanalysen jedoch darauf, dass die Mutation in Gau-Odernheim wahrscheinlich auf ein einziges Ereignis zurückzuführen ist. Die besonders gute Abtrennung der Population DE25, Warburg, erfolgt im Vergleich zu den restlichen Populationen verstärkt durch die Abwesenheit von AFLP-Fragmenten. Durch den abgesonderten Standort könnte dieses Fehlen an Fragmenten wahrscheinlicher auf die Isolation zurückzuführen sein, als auf eine wahre evolutionäre Andersartigkeit. Die Population DE25 als weitere Quelle von *Spe* ist fraglich, da die Daten auf eine mögliche Verschleppung von Individuen aus den österreichisch-tschechischen Pool hindeuten: Die paarweise genetischen Distanzen (Φ_{IPT}) von DE25 sind geringer zu den österreichischen und tschechischen als zu den deutschen Populationen von DE24. Nichts desto trotz kann DE25 als Vertreter eines dritten Ursprungs der *Spe*-Mutation nicht ausgeschlossen werden.

Die tschechischen und österreichischen Populationen schöpfen wahrscheinlich aus einem Genpool. Die untersuchten Populationen von Südmähren und Niederösterreich liegen nahe beinander mit Ausnahme

der tschechischen Population CZ19, welche aus Prag stammt. Dennoch findet sich CZ19 ohne auffallende Differenzierung im österreich-tschechischen Cluster wieder. Erklärbar wär dies durch einen vermutlich regen Austausch in der Bewirtschaftung der Weingärten. Auch in den tschechischen-österreichischen Populationen lässt sich ein Ursprung der dekandrischen *C. bursa-pastoris* vermuten.

Die schwach ausgebildeten lokalen *Spe*-Cluster auf Populationsebene formieren sich hauptsächlich, da sich *Spe* zwar seiner Population bzw. Region zuordnet sich aber aufgrund seiner geringeren genetischen Diversität von seinem sympatrisch vorkommender Wildtypus abgrenzt. Ein charakteristischer Marker den alle *Spe*-Individuen der verschiedenen Standorte aufwiesen und der den Wildtypen fehlte und umgekehrt, konnte nicht gefunden werden. Hameister et al. (2009) ermittelte mit STRUCTURE für beprobte Individuen aus Gau-Odernheim zwei genetische Strukturen welche *Spe*- von Wildtypen abgrenzte. Die mangelnde Abgrenzung in dieser Arbeit könnte auf die Auswahl der benutzten Primer oder auf die geringer Anzahl an untersuchten Individuen zurückzuführen sein.

Die Analyse des Programms STRUCTURE belegte ebenfalls, dass eine Populationsdifferenzierung am besten durch die drei genetischen Strukturen wie sie bereits die Gesamt-PCoA zeigte, erklärt wird. Nur die Subpopulation DE24-N sowie einige Wildtyp-Individuen von den Subpopulationen A, G und J wurden dem österreich-tschechischen Cluster zugewiesen.

Eine solche unabhängige Mehrfachentstehung der dekandrischen *Spe*-Varietät könnte im Kontext von paralleler Merkmalsentwicklung begriffen werden. Unter dem Phänomen von Parallelismus wird meist die unabhängige Entwicklung von ähnlichen Merkmalen in zwei oder mehr Linien verstanden, welche auf Basis von homologen Strukturen bzw. aus gemeinsamer Abstammung hervorgegangen sind (Simpson, 1961 zit. nach Takhtajan 2009). In Blütenpflanzen kommen solche parallele evolutionäre Veränderungen relativ oft vor. Diese gleichgerichteten Umbildungen passieren nicht nur in den vegetativen Organen sondern auch in der Blüte bzw. Blütenständen, Samen, Früchte, Pollenkörner und sogar in den chemischen Strukturen (Takhtajan, 2009).

Ein Beispiel dafür lieferten Yoon und Baum, 2004. Die meisten Brassicaceae haben einen deutlich ausgebildeten Blütenstand bzw. Infloreszenz. Nur wenige Taxa bilden die Blüte aus dem verlängerten Blütenstiel, der direkt aus der vegetativen Rosette erscheint (Bosch et al., 2008). Yoon und Baum (2004) schlossen anhand ihrer Resultate eine gleiche genetische Abänderung in den verschiedenen Linien zur Parallelentwicklung aus, meinten jedoch, dass gewisse Loci in den Entwicklungsprogrammen der verschiedenen Linien so positioniert sind, dass sie schnell auf die Selektion von verschiedenen Pflanzenarchitekturen reagieren können (Yoon und Baum, 2004). Auch Bosch et. al, 2008 zeigten, dass es möglich ist, dass dasselbe Gen in mehreren unabhängigen Ursprüngen für das „gleiche“ Merkmal eine Rolle spielen kann, aber der molekulare Mechanismus im Detail nicht derselbe sein muss. Dies würde auch auf einen mehrfach unabhängigen Ursprung für *Spe* sprechen. Diese Annahme wäre auch auf *Spe* übertragbar, jedoch muss hier alles innerhalb einer Art betrachtet werden. Die drei unabhängigen Ursprünge der dekandrischen Varietät wären durch den hohen Grad an Autogamie und somit des Wegfallen des Selektionsdrucks auf die anlockende Funktion der Petalen erklärbar. In Brassicaceae bildet die sporophytische Selbstinkompatibilität die Basis-bzw. Urbedingung. Durch den Übergang von der Selbstinkompatibilität zur Selbstkompatibilität wurde die Ausbildung von Petalen sowie der floralen Duftstoffe, die zur Attraktion von Bestäubern dienen, weniger wichtig (Nutt et al., 2006). Aufgrund des hohen Selbstungsgrad in *C. bursa-pastoris* wirkt die Selektion auf die Blütenkrone in allen Habitaten fast gleich stark (Hurka und Neuffer, 1997). In gestörten Habitaten welche *C. bursa-pastoris* bevorzugt vorkommt, ist die Selektion auch von geringerer Bedeutung (Bosbach et al., 1982).

4.1.3 Molekulare Ursache von *Spe*

- *Alignments AGdel mit Gelbildvergleich*

Die dritte Hypothese wurde nicht bestätigt. Die Deletion der 22 Basenpaare im Allel *CbpAGa* als einzige Quelle der Ausbildung des *Spe*-Phänotyps ist unwahrscheinlich.

Für die molekulare Ursache von *Spe* wurde in früheren Studien AGAMOUS als wahrscheinlichstes Kandidatengen identifiziert. Die Sequenzierung von AGAMOUS im Bereich der 22bp Deletion bzw. dessen Alignment hat unerwartete Ergebnisse geliefert. Fast die Hälfte der untersuchten Wildtypindividuen wiesen die Deletion auf. Dennoch besaß ein weitaus höherer Anteil der *Spe*-Individuen (81%) die Deletion. Die Ergebnisse dieser Arbeit können keinen eindeutigen Zusammenhang der Deletion mit dem *Spe*-Phänotyp belegen. Zumindest kann die Deletion als einzig verursachender Faktor des *Spe*-Phänotyps ausgeschlossen werden. Dies gilt für die Populationen aus Gau-Odernheim sowie für alle anderen untersuchten Populationen. Nicht etwa da die Deletion nicht in allen *Spe*-Individuen identifiziert wurde, sondern da so viele Wildtypen die Deletion aufwiesen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Auftreten der Deletion und dem *Spe*-Phänotyp besteht auf der Ebene, dass die *Spe*-Variante vielleicht aus einem Wildtypen mit Deletion hervorgegangen ist. Ebenso kann zwar nicht vollends ausgeschlossen werden, dass der Wildtyp mit *Spe* eingekreuzt hat, doch genetische Analysen einer Nachzucht haben gezeigt, dass der Wildtyp in Kreuzungsereignissen mit 73.3% als Pollen-Donator fungiert (Hameister, 2009a).

Die phänotypische Charakterisierung im Feld ist nicht eindeutig, deshalb können Zuordnungsfehler nicht ausgeschlossen werden. Stamina können vollends in Petalen umgewandelt sein oder auch nur erste Anzeichen für die Transformation besitzen. Die hohe Anzahl an gefundenen Wildtypen mit Deletion können jedoch nicht ausschließlich auf Bestimmungsfehler zurückgeführt werden.

Weitere Kandidatengene

Nutt et al. (2008) untersuchte die Expression von ortholog-floralen Organitätsgenen von *A.thaliana* in *Spe* und wildtypischen *C. bursa-pastoris*. Darunter fallen AGAMOUS (Klasse C), APETALA (A), APETALA3 und PISTILLATA (B). Ebenso wurden SEEDSTICK und SHATTERPROOF1/2 analysiert. SEPPELATA (E) und APETALA2 (A) wurden nicht getestet. Aufgrund der Expressionsanalysen wurden alle Gene außer AGAMOUS, SEEDSTICK und SHATTERPROOF1/2 als Verursacher für *Spe* als unwahrscheinlich erklärt. Eine anschließende Co-Segregationsanalyse der drei verbliebenen Kandidatengene (Allele) und deren Pyrosequenzierung ergaben, dass *Spe* und *CbpAGa* sehr eng beieinander liegen oder möglicherweise gleiche Loci sind. Für am wahrscheinlichsten nahm man eine Veränderung in einer Transkriptionsfaktorbindestelle an, welche sich in nicht codierenden Regionen der DNA bzw. in Promotern befinden. Da außer den Petalen keine anderen Blütenorgane von der Mutation betroffen sind, wurde von einem negativen Transkriptionsfaktor ausgegangen. Durch eine Veränderung der Basenabfolge wäre es ihm nicht möglich zu binden und dies könnte zu einer ektopischen Expression von AGAMOUS im 2. Wirtel führen. Sequenzvergleiche zwischen *CbpAGa* Allelen von *Spe*-Mutterpflanzen zeigten insgesamt 16 Polymorphismen, alle aufwärts liegend von der codierenden Region im ersten und zweiten Intron. Die größte Sequenzdifferenz zwischen Wildtyp- und *Spe*-*CbpAGa* Allel lag in der Deletion von 22 Basenpaaren im zweiten Intron (Ziermann, 2010).

Schon damals wurde bemängelt, dass MADS-Domäne Proteine eigentlich an GARG-Boxen binden und solche DNA-Sequenzelemente wurden in den lokalisierten polymorphen Abschnitten von *CbpAGa* nicht entdeckt. Ferner wurde aufgeworfen, dass für das untersuchte *Spe*-Individuum von Warburg diese

Deletion nicht identifiziert wurde. Nur das Individuum aus Gau-Odernheim wies die Deletion auf. Daraus wurde geschlossen, dass sollte die Deletion in *CbpAGa* Ursache des *Spe*-Phänotyps sein, müsste das Individuum aus Warburg ein anderes Allel besitzen, die diese fehlende Deletion substituiert. In Folge wären beide *Spe*-Individuen bzw. Mutationen unabhängig voneinander entstanden (Nutt et al., 2008; Ziermann, 2010).

Wellmer et al. (2004) verglichen Expressionsmuster der Infloreszenz von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten (*apetala1*, *apetala2*, *apetala3*, *pistillata*, und *agamous*) mit denen des Wildtypen. Dabei griffen sie auf DNA-Microarrays zurück (Oligonukleotide und Blüten-spezifische cDNA basierende Microarrays). Für Sepalen und Petalen identifizierten sie nur 21 Gene, die spezifisch in diesem Gewebe exprimiert werden. Im Gegensatz dazu identifizierten sie 1.162 putative Stamina-spezifische Gene und 260 putative Karpell-spezifische Gene. Somit wurde die überwiegende Mehrheit der Transkripte in den Karpellen und Stamina gefunden und nur wenige spezifische Gene für das Perianth. Dies hängt damit wahrscheinlich zusammen, dass die Formation der reproduktiven Organe in den späteren Phasen der Blütenentwicklung passiert und sie aus einer höheren Anzahl von verschiedene Gewebetypen und Zelltypen zusammengesetzt sind als etwa die Petalen und Sepalen (Wellmer et al., 2004). Vielen von diesen lokal eingeschränkten Blüten-Loci fehlt eine CA₂G-Box für die MADS-Proteinbindung. Dies deutet darauf hin, dass sie womöglich indirekt über die floral-homöotischen Genprodukte reguliert werden (Wellmer et al., 2004; Krizek und Fletcher, 2005).

Ein weiteres Beispiel der als Schlüsselregulator in der Entwicklung der Petalen identifiziert wurde, ist das Gen UFO (*UNUSUAL FLORAL ORGANS*), das für ein F-Box Protein kodiert (Krizek und Fletcher, 2005). Durfee et al. 2003 isolierten vier schwache *ufo*-Allele welche spezifisch die Entwicklung der Organe des zweiten Wirtels blockierten: keine Ausbildung der Petalen bzw. Umbildung zu stamenoiden Petalen oder Filamenten. Es wurde angenommen, dass der UFO-abhängige Signalweg den Hemmungseffekten eines AG-abhängigen Signalwegs entgegenwirkt (ektopische Expression AG → Organogenese des zweiten Wirtels)(Durfee et al., 2003).

Eine weitere natürlich auftretende Blütenmutante wurde für *Linaria vulgaris* („*peloric mutant*“) beschrieben. Statt einer normalerweise bilateralen Blütensymmetrie bildet sie eine Radiale aus, deshalb produziert sie zygomorphe anstatt aktinomorpher Blüten. Ihr molekularer Hintergrund geht auf eine Epimutation im Orthologen des Gens *CYCLOIDEA* (*CYC*) zurück, welches für dorsoventrale Blüten kodiert (Cubas et al., 1999). Epimutationen werden bestimmt durch die DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und RNA-Moleküle des Zellkerns (RNAi=RNA Interferenz auf Chromatin-Ebene), welche hauptsächlich den Zugang zur DNA für die Transkription festlegen bzw. beeinflussen (Krauß, 2014). Diese epigenetischen Strukturen sind über Generationen vererbbar und bieten eine Alternative zur genetischen Mutation und können als Angriffspunkt der Selektion dienen (Zilberman und Henikoff, 2005). Solche Epiallele sind aber nicht immer so stabil als die primäre DNA-Sequenz (Becker et al., 2011). Bei der *Linaria*-Mutante wird angenommen, dass sie sich ungeschlechtlich fortpflanzt und die Population wahrscheinlich aus einem Klon entspringt (Theissen, 2000 zit. nach Ziermann, 2010).

Durch die Aufspürung von so genannten miRNAs (microRNAs) wurde ein neuer Weg der post-transkriptionalen Genregulierung auch in der Blütenentwicklung erkannt. Diese miRNAs kontrollieren u.a. mehrere Blüten-exprimierte Gene (Krizek und Fletcher, 2005). Aukerman & Sakai (2001) und Chen (2003) erforschten die Einflussnahme von *Arabidopsis* miRNA, miRNA172, auf die Entwicklung der floralen Organe. Ein Beispiel hierfür ist die Repression von AG durch AP2. AP2 wird im ganzen

Blütengewebe exprimiert, dennoch unterdrückt AP2 die Expression von AG in den zwei äußeren Wirteln (Krizek und Fletcher, 2005). miR172 reguliert durch post-transkriptioneller Repression [Basenpaarung mit mRNA von AP2] und mRNA-Spaltung eine Subfamilie von AP2 Transkriptionsfaktoren-Gene (Aukermann und Sakai, 2003; Chen, 2004) . Die Ausdehnung der Expression der Domäne von miR172 vom 3. und 4. Wirtel versus 2. Wirtel kann somit zu einer Inhibition der Synthese von AP2 führen und somit zu einer ektopischen Expression von AG im 2. Wirtel befähigen. Die Mutantanalysen in *A. thaliana* führten jedoch auch zu Veränderungen in den Sepalen und waren nicht nur auf die Petalen beschränkt (Nutt et al., 2006).

Diese hier genannten Beispiele sind bislang die wahrscheinlichsten Kandidaten, die die molekulare Grundlage des *Spe*-Phänotyps erklären könnten.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Masterarbeit war die Untersuchung der genetischen Diversität zwischen der wildtypisch und der sympatrisch vorkommenden dekandrischen *C. bursa-pastoris*. Ebenso wurde versucht mögliche Ursprünge bzw. ein möglicher Ursprung, der *Spe*-Varietät der elf verschiedenen Populationen von Deutschland, Österreich und Tschechien zu identifizieren. Die vermutete molekulare Grundlage des *Spe*-Phänotyps im Allel *CbpAGa* mit der Deletion von 22 Basenpaare wurde analysiert.

C. bursa-pastoris ist eine der am weitest verbreitetsten und erfolgreichsten einjährigen Unkräuter weltweit (Hurka et al., 2003). Die landwirtschaftliche Tätigkeit des Menschen, welche meist eine Störung der Vegetation zur Folge hat, begünstigt die Ausbreitung der Art. *C. bursa-pastoris* brachte durch eine hohe phänotypische Plastizität viele gut angepasste unterschiedliche Ökotypen hervor (Hurka und Neuffer, 1997). Durch die Verschiedenartigkeit in Blattform, Größe und Behaarung wurden manche in der Vergangenheit fälschlicherweise sogar als eigene Arten deklariert (Almquist, 1907; Shull, 1929). Eine besondere phänotypische Neuerung bildet dabei die homöotische *Spe*-Varietät in der die vier weißen Blütenblätter in Staubblätter umgewandelt sind. Gefunden und beschrieben wurde sie bereits vor 200 Jahren.

Im Zuge dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die genetische Diversität der dekandrischen Blütenvariante geringer ist als die der wildtypischen *C. bursa-pastoris*. Der *Spe*-Phänotyp ordnet sich seiner geographischen Abstammung und nicht seiner Blütenerscheinung zu. Mindestens zwei Ursprünge wurden identifiziert. Eine Herkunft rührt aus den deutschen Populationen von Gau-Odernheim und eine Zweite liegt in den tschechischen und österreichischen Populationen. Ebenso wurde eine vermutlich dritte Herkunft für die deutsche Population in Warburg gefunden, die jedoch fraglich ist.

Die Deletion im Allel *CbpAGa* als einzige Grundlage des *Spe*-Phänotyps wurde für die untersuchten Populationen nicht bestätigt. Da die Deletion auch im Wildtypen gefunden wurde ist eine mögliche Erklärung dass *Spe* aus einer Mutterpflanze mit Deletion hervorgegangen ist.

Eine endgültige Aussage, ob das Blütenorganidentitätsgen *CbpAGa* bzw. dessen Mutation in der *cis*-regulatorischen Region verantwortlich für den *Spe*-Phänotyp ist, könnte nur dann getroffen werden, wenn die Einbringung des Locus *CbpAGa* durch Klonieren und Transformation in den Wildtypen den gleichen Phänotyp erzeugt wie in *Spe* (Ziermann, 2010).

Der Genfluss zwischen *Spe* und Wildtypen sind beschränkt. Die Auskreuzungsraten sind vermutlich für *Spe* geringer als die des Wildtypen. Goldberg et al. (2010) untersuchte die Familie der Nachtschattengewächse und fand heraus, dass selbstinkompatible Arten schneller neue Arten hervorbrachten als Selbstkompatible. Die kurzfristigen Vorteile von potentiell selbstkompatiblen Individuen wurden ausgeglichen durch eine starke Artenselektion, welche auskreuzende Arten favorisierte. Allogame Arten waren immer wieder Quelle von Selbstkompatiblen. Diese besaßen jedoch höhere Extinktionsraten als Diversifizierungsraten. Bevor es zu einer erneuten Artbildung kam, starben die meisten aus (Goldberg et al., 2010; Krauß, 2014). Die hochgradig selbstende *C. bursa-pastoris* schöpft vor allem durch die Polyploidisierung eine erhöhte molekulare Diversität. Der Tetraploidisierung in *C. bursa-pastoris* folgte wahrscheinlich die Verschiebung zur disomischen Vererbung, welche zu einer fixierten Heterozygotie führte. Dies steigerte somit die intraspezifische genetische Diversität. Dadurch konnten bzw. könnten Inzuchtdepressionen vermieden werden auch wenn Auskreuzungsraten selten sind. Dies könnte auch ein Grund sein, weshalb *C. bursa-pastoris* weiter verbreitet ist und mehr angepasste Ökotypen hervorbringt als *C. rubella* (Hurka et al., 1989; Hintz et al., 2006).

Ob die *Spe*-Varietät in den Anfängen einer Abgrenzung zum Wildtypen steht ist offen. Bisherige Erkenntnisse sprechen nicht dafür, denn es gab bislang keinen nachweisbaren Selektionsvorteil für *Spe*. Die nächste Herausforderung wird sein, zumindest für einen dieser drei angenommenen Ursprünge den genetischen Hintergrund aufzudecken. Damit könnte eine mögliche genetische Parallelmutation mit gleicher oder unterschiedlicher Abänderung der genetischen Information, welche zum selben Phänotyp führen, bewiesen werden.

Quellenverzeichnis

- Aksoy A., Hale W. H., Dixon J. M. (1998): *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medikus (Thlapsi bursa-pastoris L., Bursa bursa-pastoris (L.) Shull, Bursa pastoris (L.)Weber). *Journal of Ecology* 86:171-186.
- Aksoy A., Hale W. H. G., Dixon J. M. (1999): Towards a simplified taxonomy of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. (Brassicaceae). *Watsonia* 22:243-250.
- Allendorf F. W., Luikart G. H., Aitken S. N. (2013): *Conservation and the Genetics of Populations*: John Wiley & Sons.
- Almquist E. (1907): Studien über die *Capsella bursa pastoris* (L.). *Acta Horti Bergiani* 4:1–92.
- Aukermann M. J., Sakai H. (2003): Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15:2730-2741.
- Alphey L. (1998): *DNA-Sequenzierung*. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Baker H. G. (1955): Self-compatibility and establishment after "long distance" dispersal. *Evolution* 9:347–348.
- Baskin C., Baskin J. (1998): *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Becker A., Theissen G. (2003): The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 29:464-489.
- Becker B., Hagmann J., Müller J., Koenig D., Stegle O., Borgwardt K., Weigel D. (2011): Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* 480:245-251.
- Bosbach K., Hurka H., Haase R. (1982): The soil seed bank of *Capsella bursa-pastoris* (Cruciferae): its influence on population variability. *Flora* 172:47-56.
- Bosch J. A., Heo K., Sliwinski M. K., Baum D. A. (2008): An exploration of LEAFY expression in independent evolutionary origins of rosette flowering in Brassicaceae. *Am J Bot* 95:286-293.
- Bossdorf O., Auge H., Lafuma L., Rogers W. E., Siemann E., Prati D. (2005): Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144:1-11.
- Carroll S. B. (2008): Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell* 134:25-36.
- Causier B., Schwarz-Sommer Z., Davies B. (2010): Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol* 21:73-79.
- Charlesworth D., Charlesworth B. (1995): Quantitative genetics in plants : the effect of the breeding system on genetic-variability. *Evolution* 49:911-920.
- Chen X. (2004): A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303.
- Classen-Linke I., Beier H., M. (2001): *Die Bedeutung von Homöobox-Genen in der Reproduktion*. Universitätsklinikum der RWTH Aachen:Reproduktionsbiologie 17:163-169.
- Coen E. S., Meyerowitz E. M. (1991): The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31-37.
- Colombo L., Franken J., Koetje E., Van Went J., Dons H. J., Angenent G. C., Van Tunen A. J. (1995): The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *Plant Cell* 7:1859-1868.
- Couvreur T. L., Franzke A., Al-Shehbaz I. A., Bakker F. T., Koch M. A., Mummenhoff K. (2009): Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). *Mol Biol Evol* 27:55-71.
- Cubas P., Vincent C., Coen E. (1999): An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401:157-161.
- Darwin C. (1876): *The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom*. London: John Murray.
- De Bodt S., Raes J., Van De Peer Y., Theissen G. (2003): And then there were many: MADS goes genomic. *Trends Plant Sci* 8:475-483.
- Durfee T., Roe J. L., Sessions R. A., Inouye C., Serikawa K., Feldmann K. A., Weigel D., Zambryski P. C. (2003): The F-box-containing protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8571-8576.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. (2007): Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7:574-578.
- Foxe J. P., Slotte T., Stahl E. A., Neuffer B., Hurka H., Wright S. I. (2009): Recent speciation associated with the evolution of selfing in *Capsella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5241-5245.
- Frankham R. (1996): Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology* 10:1500–1508.
- Gerdo A. (2006): *Molekularbiologische Analyse der genetischen Diversität des Melitaea athalia/ celadussa-Komplexes (Lepidoptera: Nymphalidae) unter Anwendung der ISSR-PCR auf Art-, Unterart-und Populationsebene*. Fakultät für Biologie. Doktorarbeit:179.
- Gligor M. (2010): *Muster und Prozesse in einer Microcebus-Hybridzone in Südostmadagaskar*. Diss. Johannes Gutenberg-Universität.:195.

-
- Goldberg E. E., Kohn J. R., Lande R., Robertson K. A., Smith S. A., Igc B. (2010): Species selection maintains self-incompatibility. *Science* 330:493-495.
- Goodwillie C., Sargent R. D., Eckert C. G., Elle E., Geber M. A., Johnston M. O., Kalisz S., Moeller D. A., Ree R. H., Vallejo-Marin M., Winn A. A. (2010): Correlated evolution of mating system and floral display traits in flowering plants and its implications for the distribution of mating system variation. *New Phytol* 185:311-321.
- Gort G. (2010): On some surprising statistical properties of a DNA fingerprinting technique called AFLP. Wageningen: University Wageningen.
- Haberer G., Wang Y., Mayer K. F. X. (2011): The non-coding Landscape of the Genome of *Arabidopsis thaliana*. In: *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*--Schmidt R, I. B, eds. u.a. New York: Springer. 67-122.
- Hameister S. (2009a): Ecological and molecular characterisation of a naturally occurring floral homeotic variant of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. Diss. Universität Osnabrück.
- Hameister S., Neuffer B., Bleeker W. (2009): Genetic differentiation and reproductive isolation of a naturally occurring floral homeotic mutant within a wild-type population of *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae). *Mol Ecol* 18:2659-2667.
- Hameister S., Nutt P., Theißen G., Neuffer B. (2013): Mapping a floral trait in Shepherds purse – 'Stamenoid petals' in natural populations of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. *Flora* 208:641-647.
- Hamrick J. L., Godt J. W. (1996): Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B.* 351:291-1298.
- Hanski I., Simberloff D. (1997): The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. In: *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution.* San Diego: Academic Press. 5-26.
- Hedrick P. W. (2011): *Genetics of Populations United States of America*: Jones & Bartlett Publishers.
- Hintz M., Bartholmes C., Nutt P., Ziermann J., Hameister S., Neuffer B., Theissen G. (2006): Catching a 'hopeful monster': shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris*) as a model system to study the evolution of flower development. *J Exp Bot* 57:3531-3542.
- Holm L. R. G. (1979): *A Geographical atlas of world weeds*: Wiley.
- Holzner W., Glauning J. (2005): *Ackerunkräuter. Bestimmung, Biologie, Landwirtschaftliche Bedeutung.* Graz: Leopold Stocker Verlag.
- Hong G., Williamson S., Bustamante C. D. (2007): A Markov Chain Monte Carlo Approach for Joint Inference of Population Structure and Inbreeding Rates From Multilocus Genotype Data. *Genetics* 176:1635-1651.
- Hughes T. R. (2011): *A Handbook of Transcription Factors.* Berlin [u.a.]: Springer.
- Hurka H. (1990): Differentiation and adaptation in the Genus *Capsella* (Brassicaceae) In: *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*--Kawano S, ed.: Elsevier Science.
- Hurka H., Bleeker W., Neuffer B. (2003): Evolutionary Processes Associated with Biological Invasions in the Brassicaceae. *Biological Invasions* 5:281-292.
- Hurka H., Freudner S., Brown A. H. D., Plantholt U. (1989): Aspartat aminotransferase isozymes in the genus *Capsella* (Brassicaceae). In: *Biological Approaches and Evolutionary ends in Plants*--Kawano S, ed. London: Academic Press. 19-32.
- Hurka H., Friesen N., German D. A., Franzke A., Neuffer B. (2012): 'Missing link' species *Capsella orientalis* and *Capsella thracica* elucidate evolution of model plant genus *Capsella* (Brassicaceae). *Mol Ecol* 21:1223-1238.
- Hurka H., Neuffer B. (1997): Evolutionary processes in the genus *Capsella* (Brassicaceae). *Plant Syst Evol* 206:295-316.
- Immink R. G., Kaufmann K., Angenent G. C. (2010): The 'ABC' of MADS domain protein behaviour and interactions. *Semin Cell Dev Biol* 21:87-93.
- Janning W., Knust E. (2004): *Genetik.* Stuttgart [u.a.] : Thieme.
- Jochen G. (2010): *Genetik.* Berlin [u.a.]: Springer.
- Kalinowski S. T. (2004): Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet* 5:539-543.
- Kaufmann K., Melzer R., Theissen G. (2005): MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347:183-198.
- Kay Q. O. N. (1994): Biological Flora of the British Isles: *Tripleurospermum inodorum* (L.) Schultz Bip. *Journal of Ecology* 82:681-697.
- Krauß V. (2014): *Gene, Zufall, Selektion.* Berlin-Heidelberg: Springer.
- Krizek B. A., Fletcher J. C. (2005): Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* 6:688-698.
- Levin D. A. (2006): Flowering phenology in relation to adaptive radiation. *Syst Bot* 31:239-246.
- Levins R. (1969): Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 15:237-240.
- Linde M., Diel S., Neuffer B. (2001): Flowering ecotypes of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. (Brassicaceae) analysed by a cosegregation of phenotypic characters (QTL) and molecular markers. *Ann Bot-London* 87:91-99.
- Link Schultze-Motel W. H. (1986): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa.* Berlin u. Hambur: Verlag Paul Parey.

-
- Lysak M. A. U. K. M., A. (2011): Phylogeny, Genome, and Karyotype Evolution of Crucifers (Brassicaceae). In: Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models --Schmidt RuBI, ed. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer Verlag.
- Magali S. (2003): Factors affecting the genotypic and genetic diversity of the dioecious clonal plant *Cirsium arvense* at the metapopulation level. Biologie. Diss. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mantel N. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. 27:209-220.
- Mayr E. (1963): Animal species and evolution. Cambridge, Mass: Belknap Press of Harvard University Press.
- Meudt H. M., Clarke A. C. (2007): Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. Trends in Plant Science 12:106-117.
- Mülhardt C. (2013): Molekularbiologie/Genomics. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Murbeck S. V. (1918): Über staminale Pseudapetalie und deren Bedeutung für die Frage nach der Herkunft der Blütenkrone. Lunds Universitets Arsskrift N.F. Avd 2, Bd. 14, Nr. 25, .
- Nei M., Li W. H. (1979): Mathematical-Model for Studying Genetic-Variation in Terms of Restriction Endonucleases. P Natl Acad Sci USA 76:5269-5273.
- Ness R. W., Wright S. I., Barrett S. C. (2010): Mating-system variation, demographic history and patterns of nucleotide diversity in the tristylous plant *Eichhornia paniculata*. Genetics 184:381-392.
- Neuffer B., Hurka H. (1999): Colonization history and introduction dynamics of *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae) in North America: isozymes and quantitative traits. Mol Ecol 8:1667-1681.
- Neuffer B., Paetsch M. (2013): Flower morphology and pollen germination in the genus *Capsella* (Brassicaceae). Flora 208:626-640.
- Niepötter C. (2007): Genetische und phänotypische Charakterisierung von dekandrischen Wildpopulationen (Spe-Mutanten) des Hirtentäschelkrautes *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. (Brassicaceae). Masterarbeit. Universität Osnabrück.
- Nour A. (2010): Analyse der genetischen Diversität in einem sich verjüngenden Eichenbestand. Diplomarbeit. Albert-Ludwigs-Universität.
- Nutt P., Ziermann J., Hintz M., Neuffer B., Theissen G. (2006): *Capsella* as a model system to study the evolutionary relevance of floral homeotic mutants. Plant Syst Evol 259:217-235.
- Nutt P., Ziermann J., Theissen G. (2008) unveröffentlicht: Ectopic expression and co-segregation of an AGAMOUS orthologue in Stamenoid petals, a natural homeotic floral variant of *Capsella bursa-pastoris*.
- Opiz P. (1821): *Capsella apetala* Opiz. Eine neue merkwürdige Pflanze. Flora 4:436-443.
- Ornduff R. (1969): Reproductive biology in relation to systematics. Taxon 18:121-133.
- Pagel M. E. I. C. (2002): Encyclopedia of evolution. Oxford [u.a.]: Oxford University Press, Inc.
- Pannell J. R., Barrett S. C. H. (1998): Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. Evolution 52:657-668.
- Partzsch M., Cremer J., Zimmermann G., Goltz H. (2006): Acker-und Gartenunkräuter. Ein Bestimmungsbuch ; [mit Bestimmungsschlüssel für: Samen und Früchte, Keimpflanzen, blühende Pflanzen]. Bergen: Agrimedia.
- Peakall R. O. D., Smouse P. E. (2012): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28:2537-2539.
- Pertoldi C., Bijlsma R., Loeschcke V. (2007): Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. Biodivers Conserv 16:4147-4163.
- Phillips N. R. (2009): Expert Systems for High Throughput Analysis of Single Source Samples: A Comparison of GeneMarker® HID v1.71 and GeneMapper® ID v3.2 and Validation of GeneMapper® ID v3.2. Diss. University of North Texas.
- Pingoud A., Urbanke C. (1997): Arbeitsmethoden der Biochemie. Berlin-New York: Walter de Gruyter & Co.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959.
- Pua E., Davey M., R. (2009): Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives. Berlin [u.a.]: Springer.
- Rammé S. (2010): Mutationssuche im α -Spectrin-Gen bei Patienten mit einer autosomal-dominanten Ataxie. Doktorarbeit. Universität zu Lübeck.
- Richards A. (1986): Plant breeding systems. London: George Allen & Unwin.
- Richter C. (2008): Evolution isolierter Teilpopulationen der Laubholz-Säbelschrecke *Barbitistes serricauda* (FABRICIUS 1798). Göttingen: Universitätsverlag Göttingen.
- Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007): Plant speciation. Science 317:910-914.
- Saedler H., Becker A., Winter K. U., Kirchner C., Theissen G. (2001): MADS-box genes are involved in floral development and evolution. Acta Biochim Pol 48:351-358.
- Schmidt R. (2011): Evaluation of GeneMapper®ID-X and GeneMarker® HID for use at the NYC OCME. Diss. Marshall University.
- Schwarzsommer Z., Huiser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H. (1990): Genetic-Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum-Majus*. Science 250:931-936.
- Shull G. H. (1929): Species hybridizations among old and new species of shepherd's purse. New York: Ithaca.
- Sicard A., Lenhard M. (2011): The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. Ann Bot-London 107:1433-1443.

- Simberloff D. (2009): The role of propagule pressure in biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40:81–102.
- Simpson G. G. (1961): *Principles of animal taxonomy*. New York: Columbia, University Press.
- Slotte T., Hazzouri K. M., Agren J. A., Koenig D., Maumus F., Guo Y. L., Steige K., Platts A. E., Escobar J. S., Newman L. K., Wang W., Mandakova T., Vello E., Smith L. M., Henz S. R., Steffen J., Takuno S., Brandvain Y., Coop G., Andolfatto P., Hu T. T., Blanchette M., Clark R. M., Quesneville H., Nordborg M., Gaut B. S., Lysak M. A., Jenkins J., Grimwood J., Chapman J., Prochnik S., Shu S. Q., Rokhsar D., Schmutz J., Weigel D., Wright S. I. (2013): The *Capsella rubella* genome and the genomic consequences of rapid mating system evolution. *Nat Genet* 45:831-U165.
- Takhtajan A. (2009): *Flowering Plants*. St.Petersburg: Springer.
- Tang C. L., Toomajian C., Sherman-Broyles S., Plagnol V., Guo Y. L., Hu T. T., Clark R. M., Nasrallah J. B., Weigel D., Nordborg M. (2007): The evolution of selfing in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 317:1070-1072.
- Theissen G. (2000): Evolutionary developmental genetics of floral symmetry: the revealing power of Linnaeus' monstrous flower. *Bioessays* 22:209-213.
- Theissen G. (2001): Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4:75-85.
- Theissen G. (2006): The proper place of hopeful monsters in evolutionary biology. *Theory Biosci* 124:349-369.
- Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., Kim J. T., Munster T., Winter K. U., Saedler H. (2000): A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol* 42:115-149.
- Theissen G., Melzer R. (2007): Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Ann Bot* 100:603-619.
- Theissen G., Saedler H. (2001): Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409:469-471.
- Trattinnick L. (1821): *Botanische Bemerkungen*. Flora. 723.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Et Al. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407-4414.
- Wang Y. Q., Melzer R., Theissen G. (2011): A double-flowered variety of lesser periwinkle (*Vinca minor* fl. pl.) that has persisted in the wild for more than 160 years. *Ann Bot* 107:1445-1452.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. (2005): *Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Wellmer F., Riechmann J. L., Alves-Ferreira M., Meyerowitz E. M. (2004): Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* 16:1314-1326.
- Williamson M. (1997): *Biological invasions*. London: Chapman & Hall.
- Wilson J. R., Dormontt E. E., Prentis P. J., Lowe A. J., Richardson D. M. (2009): Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends Ecol Evol* 24:136-144.
- Wray G. A., Hahn M. W., Abouheif E., Balhoff J. P., Pizer M., Rockman M. V., Romano L. A. (2003): The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20:1377-1419.
- Yeh F. C., Yang R.-C., Boyle, Timothy B. J., Ye Z.-H., Mao J., X. (1997) unveröffentlicht: POPGENE 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta.
- Yoon H.-S., Baum D. A. (2004): Transgenic study of parallelism in plant morphological evolution. *P Natl Acad Sci USA* 101:6524-6529.
- Ziermann J. (2010): Molekulargenetische und bestäubungsbiologische Untersuchungen der natürlich bestandsbildenden floralen homöotischen Spe -Variante des Hirtentäschels (*Capsella bursa-pastoris*) Diss. Friedrich-Schiller-Universität.
- Ziermann J., Ritz M. S., Hameister S., Abel C., Hoffmann M. H., Neuffer B., Theissen G. (2009): Floral visitation and reproductive traits of Stamenoid petals, a naturally occurring floral homeotic variant of *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae). *Planta* 230:1239-1249.
- Zilberman D., Henikoff S. (2005): Epigenetic inheritance in *Arabidopsis*: selective silence. *Current Opinion in Genetics & Development* 15:557–562.

Verwendete MANUALS

- Applied_Biosystems. (2005): GeneScan-600 Liz Size Standard--AB, ed.
- Applied_Biosystems. (2012): DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis: LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION.
- Ge_Healthcare. Sephadex G-50 Fine (2014).
- Life Technologies (2013): Hi-Di™ Formamide.
- Thermoscientific. (2009): User Manual-NanoDrop 2000/2000c Spectrometer Wilimington: Thermo Fisher Scientific.
- Thermoscientific. (2013): FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase.
- Qiagen. (2006): DNeasy Plant Handbook.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der MADS-BOX am Beispiel von APETALA 3	4
Abbildung 2: ABC(E)-Blütenmodell.....	5
Abbildung 3: schematische Darstellung eines MADS Domäne Protein-Dimer am Beispiel von SEPPELLATA 3.....	6
Abbildung 4: Hypothetische 3D Struktur eines MADS-Domäne Protein-Quartetts	6
Abbildung 5: <i>Spe</i> -Phänotyp: ektopische Expression der Genklasse-C.....	6
Abbildung 6: Übersicht zu geografischen Distanzen zwischen den untersuchten Populationen	10
Abbildung 7: Lage der Probenstandorte in Deutschland, Österreich und Tschechien	10
Abbildung 8: Aktivität der Restriktionsenzyme EcoRI (>) & MseI (>).....	13
Abbildung 9: Ligation der Adaptoren	13
Abbildung 10: Agarosegel der Restriktion und Ligation	13
Abbildung 11: Preamplifikation.....	14
Abbildung 12: Gelbild der präselektiven Amplifikation.....	14
Abbildung 13: Selektive Amplifikation.....	15
Abbildung 14: Manteltest zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der AFLP-Methode:	24
Abbildung 15: Vergleich prozentualer Anteil polymorpher Loci zwischen <i>Spe</i> und Wildtyp.....	26
Abbildung 16: Amova - Analyse: <i>Spe</i> -Datensatz; <i>Wt</i> -Datensatz	26
Abbildung 17: <i>Spe</i> -Manteltest geographische versus genetischer Distanz	27
Abbildung 18: PCoA-Gesamtdatensatz.....	28
Abbildung 19: Berechnung von Delta K.....	29
Abbildung 20: Balkendiagramm der geschätzten genetischen Cluster: K=3	29
Abbildung 21: Kontrollgel: AGdel	31
Abbildung 22: Kreisdiagramm der prozentualen Anteile an Individuen mit und ohne Deletion.....	31

ANHANG:

Abbildung 23: Manteltest: Gesamtdatensatz; geographische versus genetischer Distanz	11
Abbildung 24: Manteltest: <i>Wt</i> -Datensatz; geographische versus genetischer Distanz	11
Abbildung 25: PCoAs DE: <i>Spe</i> - <i>Wt</i>	12
Abbildung 26: PCoAs CZ: <i>Spe</i> - <i>Wt</i>	12
Abbildung 27: PCoAs AT: <i>Spe</i> - <i>Wt</i>	13

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Genklassen und ihrer Protein-Bindungen	5
Tabelle 2: Übersicht über die untersuchten Individuen aus Deutschland, Tschechien und Österreich	10
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix zur Restriktion und Ligation	12
Tabelle 4: Sequenz der Adaptorpaare EcoRI und MseI	13
Tabelle 5: Reagenzien der Präselektiven Amplifikation.....	14
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der präselektiven Amplifikation	14
Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix zur selektiven Amplifikation	15
Tabelle 8 Reaktionsbedingungen der selektiven Amplifikation.....	15
Tabelle 9: Übersicht der EcoRI und MseI Primerkombinationen.....	15

Tabelle 10: Parameter für die AFLP-Läufe	16
Tabelle 11: statistische Wiederholung	17
Tabelle 12: Auswahl der Individuen für die Sequenzierung	17
Tabelle 13: Basensequenz der Primer trnL und CbpAGa	18
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die PCR	18
Tabelle 15: Cyler-Programm für die PCR mit Primerpaar trnL-E - trnL-F	18
Tabelle 16: Cyler-Programm für die PCR mit Primerpaar AGdel	18
Tabelle 17: Mastermix für die Sequenzreaktion.....	19
Tabelle 18: Reaktionsbedingungen der Sequenzreaktion	19
Tabelle 19: Laufparameter der Sequenzierungen	20
Tabelle 20: Genmapper Parameter	20
Tabelle 21: Parameter GeneMarker	21
Tabelle 22: molekulare Diversität Werte.....	24
Tabelle 23: Vergleich prozentualer Anteil polymorpher Loci, Nei-Index und Shannon Index zwischen <i>Spe</i> und Wildtyp	25
Tabelle 24: Alignment trnL-trnF und AGdel mit Gelbildvergleich.....	30

ANHANG:

Tabelle 25: Gesamtdatensatz: Geographische versus Genetischer Distanz	10
Tabelle 26: <i>Spe</i> -Datensatz: Geographische versus Genetischer Distanz	10
Tabelle 27: <i>Wt</i> -Datensatz: Geographische versus Genetischer Distanz	11
Tabelle 28: Zuordnungswahrscheinlichkeiten: K=3 „no admixture model“	14
Tabelle 29: Auswertung der Gelbilder von AGdel	16

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAT	Aspartataminotransferase
AG	AGAMOUS
AGdel	AGAMOUS Deletion
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
AP2	APETALA 2
AT	Österreich
Cbp	<i>Capsella bursa-pastoris</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CZ	Tschechien
ddNTPs	2',3'-Didesoxynukleotide
DE	Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
ECORI	Restriktionsendonuklease-Enzym isoliert aus Escherichia coli
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat; Ethylendiamintetraessigsäure
FAM 6	Carboxyfluorescein (6-FAM)
FastAP	basische Alkaline-Phosphatase
G	Guanin
GenAlEx	Genetic Analysis in Excel
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MADS	MINICHROMOSOME MAINTENANCE; AGAMOUS; DEFICIENS; SERUM RESPONSE FACTOR
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NED	Farbstoff, keine Angaben, Patent von ABI
Ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rcf	Relative Centrifugal Force
RFU	Relative Fluorescent Units
RNA	Ribonucleic acid

RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehung pro Minute
SEP	SEPELLATA
SHP1	SHATTERPROOF 1
SHP2	SHATTERPROOF 2
SNP	single nucleotide polymorphisms
<i>Spe</i>	<i>Stamenoid petals</i>
STK	SEED STICK
T	Thymin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T4-Ligase	DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGANS
UV	ultraviolett
VIC	Farbstoff, keine Angaben, Patent von ABI
<i>Wt</i>	<i>Wildtyp</i>

6.2 Probenverwaltung

Insgesamt: 139 Zeilen		11 Populationen: 3 Länder: DE CZ AT		haben für Pilotversuche geordnet											
104 Ind.*16 stat. WH*16 Dismissed, +3 WH welche selekt. n. geklappt		such Sequenzort		bitte ignorieren											
Staadort	Capella bursa pastoris	Entnahme	Koordinaten	Meereshöh.	lfd Nr.	sdviduumbezeichnung	Probenname	Wert wenn öfters g			Nano Drop Werte Karin_16.01.2013				
DE24	Gau-Ödernheim-PopA/C/G/J/N/P Irömburg	01.05.2005	N49°47'26.92E08°11'46.3		1	1949-spe/16	DE24-A16spe	274,3							
					2	1949-wt/24	DE24-A24wt	270,325							
					3	1951-spe/24	DE24-C24spe	136							
					4	1951-wt/4	DE24-C4wt	166,3							
					5	1955-spe/5-2	DE24-G5-2spe	409,6							
					6	1955-spe/25	DE24-G25spe	139,7							
					7	1955-wt/6-2	DE24-G6-2wt	414,1							
					8	1955-wt/20	DE24-G20wt	286,7							
					9	1957-spe/8-1	DE24-J8-1spe	257,5							
					10	1957-spe/10-1	DE24-J10-1spe	326,2							
					11	1957-wt/13-1	DE24-J13-1wt	162,5							
					12	1957-wt/13-1	DE24-J13-1wt	185,5							
					13	1961-spe/11-1	DE24-M11-1spe	168,5							
					14	1961-spe/15-1	DE24-M15-1spe	386,1							
					15	1961-wt/3-1	DE24-M3-1wt	933,35							
					16	1961-wt/21-1	DE24-M21-1wt	303,5							
DE25	Warburg - Desenberg rural	07.06.2005	N51°30'02.0"E09°11'58.7		17	1965-1-wt/20	DE25-1_4-1wt	163,1							
					18	1965-1-wt/20	DE25-1_20-1wt	286,1							
					19	1965-1-wt/26-5	DE25-1_26-5wt	164,6							
					20	1965-2-wt/32	DE25-2_3-1wt	160,4							
					21	1965-1-spe/32	DE25-1_2-1spe	182,5							
					22	1965-1-spe/21-3	DE25-1_21-3spe	276,2							
					23	1965-2-spe/37	DE25-2_8-2spe	343,2							
					24	1965-2-spe/33	DE25-2_10-2spe	200,05							
AT03	VIE 14., Hadersdorf-Bñf urban/Grünfläche	12.05.2010	N48°12'33.11" / E16°15'19.2"	221m	25	AT03-01spe	AT03-01spe	831							
					26	AT03-02spe	AT03-02spe	787,4							
					27	AT03-03spe	AT03-03spe	436,4							
					28	AT03-05spe	AT03-05spe	1325,7							
					29	AT03-01wt	AT03-03wt	1414,8							
					30	AT03-02wt	AT03-10wt	1015,8							
					31	AT03-03wt	AT03-11wt	324,8							
					32	AT03-04wt	AT03-12wt	1148,3							
					AT05a	VIE 18., Linnepplatz, Feistmantelgasse urban/Grünfläche	07.05.2012	N48°14'10.23" / E16°20'13.11"	231m	33	AT05a-01spe	AT05a-11spe	142		144,4
										34	AT05a-02spe	AT05a-12spe	192,3		215,1
35	AT05a-03spe	AT05a-13spe	147,3							175,5					
36	AT05a-04spe	AT05a-14spe	235,8							260					
37	AT05a-01wt	AT05a-16wt	278,3							302,3					
38	AT05a-02wt	AT05a-17wt	360							450,4					
39	AT05a-03wt	AT05a-18wt	177,3							212					
40	AT05a-04wt	AT05a-19wt	343,3							360,1					
CZ08	Mikulov, CZ Irömburg	03.06.2011	N48°48'11.33" / E16°39'05.23"	243m	41	CZ08-01spe	CZ08-01spe	522,3							
					42	CZ08-02spe	CZ08-02spe	375							
					43	CZ08-05spe	CZ08-05spe	534,7							
					44	CZ08-06spe	CZ08-06spe	343,1							
					45	CZ08-01wt	CZ08-12wt	675,5							
					46	CZ08-02wt	CZ08-13wt	706,1							
					47	CZ08-11wt	CZ08-22wt	313,4							
					48	CZ08-12wt	CZ08-23wt	1053							

AT11	NÖ, Wachau, Unterloiben weiter oben Irwinberg	04.05.2012	N 48°23'27.5" / E15°31'55.9"	N.A.	49	AT11-01spe	AT11-01spe	511,7	
					50	AT11-02spe	AT11-02spe	318,9	
					51	AT11-03spe	AT11-03spe	230,9	
					52	AT11-04spe	AT11-04spe	340,1	
					53	AT11-01wt	AT11-10wt	331,9	
					54	AT11-02wt	AT11-11wt	378,1	
					55	AT11-03wt	AT11-12wt	400,3	
AT11a	NÖ, Wachau, Unterloiben weiter oben Irwinberg	04.05.2012	N 48°23'29.5" / E15°32'14.3"		56	AT11-04wt	AT11-13wt	155,55	
					57	AT11a-01spe	AT11a-15spe	198,6	
					58	AT11a-02spe	AT11a-16spe	310,8	
					59	AT11a-03spe	AT11a-17spe	272,3	
					60	AT11a-04spe	AT11a-18spe	325,2	
					61	AT11a-01wt	AT11a-19wt	442	
					62	AT11a-02wt	AT11a-20wt	244,1	
AT15	NÖ, Pöytsdorf (001); Irwinberg	02.05.2013	N 48°40'51.6" / E16°37'52.6"	262 m	63	AT11a-03wt	AT11a-21wt	164,2	
					64	AT11a-04wt	AT11a-22wt	323,3	
					65	AT15-01spe	AT15-01spe	422,4	
					66	AT15-02spe	AT15-02spe	635,9	
					67	AT15-03spe	AT15-03spe	209,5	
					68	AT15-04spe	AT15-04spe	438,1	
					69	AT15-01wt	AT15-05wt	306,4	
CZ16	CZ; Bz Südmähren; Novs Ves (002) bei Pohorelice urban/Paripolste	02.05.2013	N 48°56'12.0" / E16°31'42.2"	172 m	70	AT15-02wt	AT15-06wt	383	
					71	AT15-04wt	AT15-08wt	224,05	
					72	AT15-05wt	AT15-09wt	243,2	
					73	CZ16-01spe	CZ16-01spe	226,4	
					74	CZ16-02spe	CZ16-02spe	311,2	
					75	CZ16-03spe	CZ16-03spe	281,2	
					76	CZ16-04spe	CZ16-04spe	373,3	
CZ17	CZ; Bz Südmähren; Brno (003) Süd-Einfahrtstr. urban/Paripolste	02.05.2013	N 49°08'24.1" / E16°36'12.6"	205m	77	CZ16-01wt	CZ16-08wt	274,4	
					78	CZ16-02wt	CZ16-09wt	153,7	
					79	CZ16-03wt	CZ16-10wt	180,4	
					80	CZ16-04wt	CZ16-11wt	245,6	
					81	CZ17-01spe	CZ17-01spe	237	
					82	CZ17-02_IIspe	CZ17-02_IIspe	318,7	
					83	CZ17-03spe	CZ17-03spe	410,7	
CZ19	CZ; Mittelböhmen; Prag 7.bz (006) Grünfläche urban/Grünfläche	03.05.2013	N50 06 37.3 / E14 24 47.4	155m	84	CZ17-04_IIspe	CZ17-04_IIspe	795,4	
					85	CZ17-01wt	CZ17-06wt	293,4	
					86	CZ17-03_IIwt	CZ17-08_IIwt	308,2	
					87	CZ17-04wt	CZ17-09wt	313,2	
					88	CZ17-05wt	CZ17-10wt	452,3	
					89	CZ19-01_IIspe	CZ19-01_IIspe	536,3	
					90	CZ19-03spe	CZ19-03spe	276,9	
AT04	VIE 14., Hadersdorf-Ludon	14.05.2010	N 48°12'46.4" / E16°13'23.2"	236m	91	CZ19-04spe	CZ19-04spe	340,3	
					92	CZ19-06spe	CZ19-06spe	178,3	
					93	CZ19-01_IIwt	CZ19-07_IIwt	385,6	
					94	CZ19-02wt	CZ19-08wt	177,9	
					95	CZ19-03wt	CZ19-09wt	322,5	
					96	CZ19-06_IIwt	CZ19-12_IIwt	319,1	
					97	AT04-01spe	AT04-01spe	245,2	
AT04	VIE 14., Hadersdorf-Ludon	14.05.2010	N 48°12'46.4" / E16°13'23.2"	236m	98	AT04-02spe	AT04-02spe	702,9	
					99	AT04-03spe	AT04-03spe	636	649,8
					100	AT04-04spe	AT04-04spe	1027,2	1033,7
					101	AT04-01wt	AT04-07wt	712,4	
					102	AT04-02wt	AT04-08wt	156,3	
					103	AT04-03wt	AT04-09wt	281	
					104	AT04-04wt	AT04-10wt	236	228,3

Dismissed schlechte DNA Qualität

DE24				105		DE24-G23-2spe	134,3	
				106		DE24-G18-2spe	95	
				107		DE24-G22wt	131,5	
				108		DE24-G10wt	133,6	
				109		DE24-J18spe	151,5	147,7
				110		DE24-J03spe	211,4	
				111		DE24-J14wt	134,1	
				112		DE24-J16wt	156,5	
DE24	Gau-Odernheim- PopAICIGIJNIP			113	1	DE24-A16spe	274,3	
				114	5	DE24-G5-2spe	409,6	
				115	6	DE24-G25spe	133,7	
				116	13	DE24-N11-1spe	168,5	
DE25	Warburg - Desenberg			117	17	DE25-1_4-1wt	163,1	
				118	20	DE25-2_3-1wt	160,4	
				119	21	DE25-1_2-1spe	182,5	
				120	24	DE25-2_10-2spe	200,05	
AT15	NÖ; Pöysdorf (001);			121	65	AT15-01spe	422,4	
				122	69	AT15-05wt	306,4	
				123	71	AT15-08wt	224,05	
				124	72	AT15-09wt	248,2	
CZ16	CZ; Bz Südmähren; Nova Ves (002) bei Pohorelice			125	73	CZ16-01spe	226,4	
				126	75	CZ16-03spe	281,2	
				127	78	CZ16-09wt	153,7	
				128	80	CZ16-11wt	246,6	
AT05a C208				36	AT05a-04spe	AT05a-14spe		
				37	AT05a-01wt	AT05a-16wt		
				42	C208-02spe	CZ08-02spe		
AT12	NÖ; Weinviertel, Eqqenburg; Fehlaube Feldweg v. Acker		<i>NA8 36,26,4 / E15 31 11,2</i>	129	AT12-01spe	AT12-01spe	394,7	425
				130	AT12-02spe	AT12-02spe	341,4	315,1
				131	AT12-03spe	AT12-03spe	477,7	611,5
				132	AT12-04spe	AT12-04spe	341,4	463,5
				133	AT12-05wt	AT12-05wt	338,4	373,8
				134	AT12-06wt	AT12-06wt	333,4	436,8
				135	AT12-07wt	AT12-07wt	514,9	539,7
				136	AT12-08wt	AT12-08wt	331,8	366,6

Id Nr.	PCR			Kontrollgel				EXO-FastAp-Verdae	EXO-FastAp-Verdae	Gel (für Extraktion) + KIT	SEQ-Reaktion			Läufe	Extraction-Kit	Extraction-Kit	Extraction-Kit
	trnl-E-trn-F / AGdel	AGdel	AGdel	trnl	AGdel	AGdel	AGdel	trnl	AGdel	AGdel [nur eine Bande]	trnl-E	tra-F	AGdel fwd	trnl-E	tra-F	AGdel fwd	AGdel fwd
1			26.05.2014														
2			26.05.2014														
3			26.05.2014														
4			26.05.2014														
5			26.05.2014														
6			26.05.2014														
7			26.05.2014														
8	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
9			26.05.2014														
10			26.05.2014														
11			26.05.2014														
12			26.05.2014														
13	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
14			26.05.2014														
15	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
16			26.05.2014														
17			26.05.2014														
18			26.05.2014														
19	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
20			26.05.2014														
21	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
22			26.05.2014														
23			26.05.2014														
24			26.05.2014														
25																	
26																	
27																	
28																	
29																	
30																	
31																	
32																	
33			26.05.2014														
34	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
35			26.05.2014														
36			26.05.2014														
37			26.05.2014														
38	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014	23.05.2014	16.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
39			26.05.2014														
40			26.05.2014														
41			26.05.2014														
42	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	Mischbande				16.05.2014	25.05.2014	25.05.2014	21.05.2014	26.05.2014	26.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
43																	
44																	
45																	
46																	
47																	
48	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande zerschusch	Mischbande											

49	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014															
50			26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
51			26.05.2014															
52			26.05.2014															
53			26.05.2014															
54	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
55			26.05.2014															
56			26.05.2014															
57																		
58																		
59																		
60																		
61																		
62																		
63																		
64																		
65	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
66																		
67																		
68																		
69																		
70	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
71																		
72																		
73																		
74																		
75	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014				21.05.2014	26.05.2014	26.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
76																		
77	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
78																		
79																		
80																		
81																		
82																		
83	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
84																		
85	13.05.2014	22.05.2014		1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
86																		
87																		
88																		
89			26.05.2014															
90			26.05.2014															
91			26.05.2014															
92	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar		22.05.2014	23.05.2014	16.05.2014								
93			26.05.2014															
94			26.05.2014															
95			26.05.2014															
96	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	23.05.2014		16.05.2014								
97																		
98																		
99																		
100																		
101																		
102																		
103																		
104																		

105	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	15.05.2014		23.05.2014	16.05.2014			21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	21.05.2014	26.05.2014	
106			26.05.2014																	
107			26.05.2014																	
108			26.05.2014																	
109			26.05.2014																	
110			26.05.2014																	
111			26.05.2014																	
112			26.05.2014																	
113																				
114																				
115																				
116																				
117																				
118																				
119																				
120																				
121																				
122																				
123																				
124																				
125																				
126																				
127																				
128																				
129																				
130			26.05.2014																	
131	15.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	22.05.2014		23.05.2014				25.05.2014	25.05.2014	21.05.2014	26.05.2014	26.05.2014	21.05.2014	26.05.2014
132			26.05.2014																	
133			26.05.2014																	
134			26.05.2014																	
135			26.05.2014																	
136	13.05.2014	22.05.2014	26.05.2014	1Bande gutrichtbar	1Bande rchuech	1Bande gutrichtbar	1Bande gutrichtbar	22.05.2014		23.05.2014				25.05.2014	25.05.2014	21.05.2014	26.05.2014	26.05.2014	21.05.2014	26.05.2014

6.3 Genetische versus Geographische Distanz

Die mittleren Abstände in km zwischen jeder Population sind oberhalb der Diagonalen in grau hinterlegt, ablesbar. Die Angaben für die paarweisen genetischen Distanzen sind unterhalb der Diagonalen angeführt (Φ_{iPT}). Die Signifikanzwerte der genetischen Distanzen für den Gesamtdatensatz, welche eine p-Wert > 0.005 aufwiesen (Werte nicht angegeben), sind unterstrichen. Der Wildtypdatensatz und des *Spe*-Datensatzes besitzt eine geringere statistischen Absicherung: Die genetischen Distanzen mit p-Wert > 0.05 wurden unterstrichen.

Gesamtdatensatz

Tabelle 25: Gesamtdatensatz: Geographische versus Genetischer Distanz

Geographische Distanz (km)															
	DE25	DE24-N	DE24-J	DE24-G	DE24-C*	DE24-A*	CZ19	CZ17	CZ16	CZ08	AT15	AT12	AT11a	AT11	AT05a
AT05a	626,88	615,39	616,61	617,97	617,79	618,04	251,04	102,37	79,13	67,12	53,97	57,50	61,95	62,07	
AT11	569,64	553,41	554,62	555,99	555,80	556,05	207,74	114,47	95,05	94,21	87,12	36,46	0,53		0,20
AT11a	569,55	553,50	554,72	556,08	555,90	556,15	207,41	113,95	94,56	93,76	86,70	35,95		<u>0,07</u>	<u>0,15</u>
AT12	571,16	567,62	568,91	570,23	570,05	570,31	193,85	78,06	59,42	61,29	57,33		0,22	0,28	0,23
AT15	615,50	621,59	622,93	624,21	624,04	624,31	225,89	51,08	29,41	13,66		0,21	0,23	0,30	0,24
CZ08	609,38	619,74	621,10	622,36	622,20	622,47	217,48	37,62	17,36		0,25	0,21	0,25	0,33	0,22
CZ16	593,89	607,68	609,07	610,31	610,15	610,42	200,85	23,27		<u>0,10</u>	0,23	0,20	0,18	0,25	0,16
CZ17	587,17	608,71	610,14	611,35	611,20	611,48	191,13		0,16	0,23	0,31	0,18	0,25	0,28	0,24
CZ19	397,51	443,29	444,90	445,89	445,78	446,09		0,15	0,14	0,20	0,22	0,16	0,19	0,25	0,16
DE24-A*	<u>203,04</u>	<u>2,80</u>	1,49	0,40	0,33		<u>0,44</u>	<u>0,37</u>	<u>0,34</u>	<u>0,41</u>	<u>0,40</u>	<u>0,41</u>	<u>0,43</u>	<u>0,51</u>	<u>0,45</u>
DE24-C*	<u>202,79</u>	<u>2,50</u>	1,34	0,26		<u>0,00</u>	<u>0,49</u>	<u>0,43</u>	<u>0,40</u>	<u>0,48</u>	<u>0,42</u>	<u>0,48</u>	<u>0,48</u>	<u>0,56</u>	<u>0,49</u>
DE24-G	<u>202,64</u>	<u>2,63</u>	1,60		<u>0,17</u>	<u>0,14</u>	0,43	0,39	0,37	0,42	0,40	0,38	0,44	0,50	0,43
DE24-J	<u>203,31</u>	<u>1,82</u>		0,15	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	0,40	0,35	0,34	0,39	0,38	0,38	0,39	0,44	0,40
DE24-N	<u>201,84</u>		0,40	0,44	<u>0,48</u>	<u>0,45</u>	0,44	0,46	0,40	0,44	0,42	0,42	0,45	<u>0,52</u>	0,45
DE25		0,55	0,52	0,55	<u>0,64</u>	<u>0,60</u>	0,45	0,42	0,43	0,47	0,47	0,45	0,46	0,50	0,42
*DE24-A/C genetische Distanz n. hoch signifikant zu anderen Pop. da ↓ Individuen							Genetische Distanz (Φ_{iPT} -Wert)								

Spe-Datensatz

Tabelle 26: *Spe*-Datensatz: Geographische versus Genetischer Distanz

Geographische Distanz (km)														
	DE25	DE24-N	DE24-J	DE24-G	DE24-A-C	CZ19	CZ17	CZ16	CZ08	AT15	AT12	AT11a	AT11	AT05a
AT05a	626,88	615,39	616,61	617,97	618,04	251,04	102,37	79,13	67,12	53,97	57,50	61,95	<u>62,07</u>	
AT11	569,64	553,41	554,62	555,99	556,05	207,74	114,47	95,05	94,21	87,12	36,46	0,53		0,50
AT11a	569,55	553,50	554,72	556,08	556,15	207,41	113,95	94,56	93,76	86,70	35,95		0,36	0,57
AT12	571,16	567,62	568,91	570,23	570,31	193,85	78,06	59,42	61,29	57,33		0,54	0,52	0,34
AT15	615,50	621,59	622,93	624,21	624,31	225,89	51,08	29,41	13,66		0,32	0,55	0,54	0,36
CZ08	609,38	619,74	621,10	622,36	622,47	217,48	37,62	17,36		0,41	0,31	0,62	0,59	<u>0,37</u>
CZ16	593,89	607,68	609,07	610,31	610,42	200,85	23,27		0,31	0,35	0,35	0,51	0,50	0,35
CZ17	587,17	608,71	610,14	611,35	611,48	191,13		0,37	0,39	0,44	0,31	0,60	0,55	0,41
CZ19	397,51	443,29	444,90	445,89	446,09		0,33	0,29	0,32	0,25	0,33	0,57	0,55	0,33
DE24-A-C	<u>203,04</u>	<u>2,80</u>	1,49	0,40		0,71	0,70	0,64	0,66	0,64	0,63	0,90	0,86	0,70
DE24-G	<u>202,64</u>	<u>2,63</u>	1,60		<u>0,34</u>	0,53	0,51	0,50	0,49	0,48	0,43	0,67	0,66	0,53
DE24-J	<u>203,31</u>	<u>1,82</u>		0,36	<u>0,12</u>	0,72	0,71	0,66	0,66	0,66	0,64	0,87	0,85	0,72
DE24-N	<u>201,84</u>		0,73	0,54	<u>0,72</u>	0,58	0,63	0,54	0,58	0,53	0,52	0,77	0,74	0,57
DE25		0,64	0,73	0,59	0,73	0,47	0,53	0,51	0,51	0,50	0,49	0,67	0,65	0,50
*DE24-A/C zusammengefasst [p>0.05 Werte unter strichen]						Genetische Distanz (Φ_{iPT} -Wert)								

Wt-Datensatz

Tabelle 27: Wt-Datensatz: Geographische versus Genetischer Distanz

Geographische Distanz (km)														
	DE25	DE24-N	DE24-J	DE24-G	DE24-A-C	CZ19	CZ17	CZ16	CZ08	AT15	AT12	AT11a	AT11	AT05a
AT05a	626,88	615,39	616,61	617,97	618,04	251,04	102,37	79,13	67,12	53,97	57,50	61,95	62,07	
AT11	569,64	553,41	554,62	555,99	556,05	207,74	114,47	95,05	94,21	87,12	36,46	0,53		0,19
AT11a	569,55	553,50	554,72	556,08	556,15	207,41	113,95	94,56	93,76	86,70	35,95		0,21	0,36
AT12	571,16	567,62	568,91	570,23	570,31	193,85	78,06	59,42	61,29	57,33		0,26	0,15	0,28
AT15	615,50	621,59	622,93	624,21	624,31	225,89	51,08	29,41	13,66		0,25	0,32	0,22	0,31
CZ08	609,38	619,74	621,10	622,36	622,47	217,48	37,62	17,36		0,24	0,21	0,34	0,21	0,30
CZ16	593,89	607,68	609,07	610,31	610,42	200,85	23,27		0,12	0,29	0,22	0,30	0,20	0,26
CZ17	587,17	608,71	610,14	611,35	611,48	191,13		0,18	0,26	0,34	0,17	0,37	0,25	0,34
CZ19	397,51	443,29	444,90	445,89	446,09		0,21	0,20	0,26	0,33	0,14	0,32	0,18	0,27
DE24-A-C	203,04	2,80	1,49	0,40		0,40	0,30	0,25	0,40	0,39	0,37	0,42	0,31	0,48
DE24-G	202,64	2,63	1,60		0,00	0,36	0,30	0,31	0,37	0,37	0,31	0,41	0,32	0,41
DE24-J	203,31	1,82		0,08	0,05	0,28	0,24	0,24	0,30	0,31	0,25	0,31	0,19	0,34
DE24-N	201,84		0,12	0,20	0,19	0,30	0,31	0,29	0,30	0,34	0,27	0,35	0,25	0,37
DE25		0,43	0,43	0,51	0,56	0,53	0,42	0,48	0,53	0,52	0,49	0,56	0,44	0,49

*DE24-A/C zusammengefasst [p>0.05 Werte unter strichen]

Genetische Distanz (PhiPT -wert)

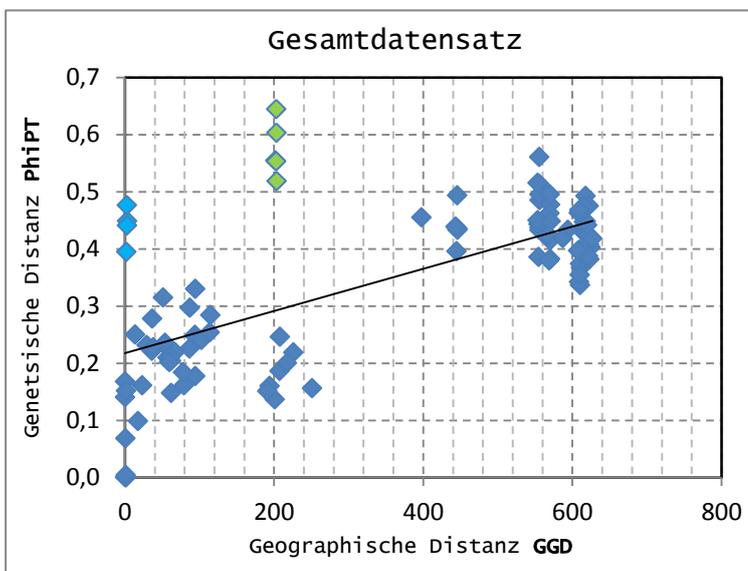


Abbildung 23: Manteltest: Gesamtdatensatz; geographische versus genetischer Distanz

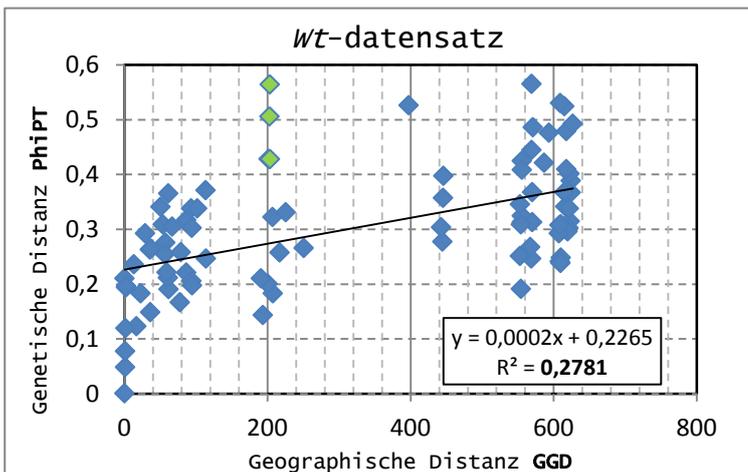


Abbildung 24: Manteltest: Wt-Datensatz; geographische versus genetischer Distanz

6.4 PCoAs

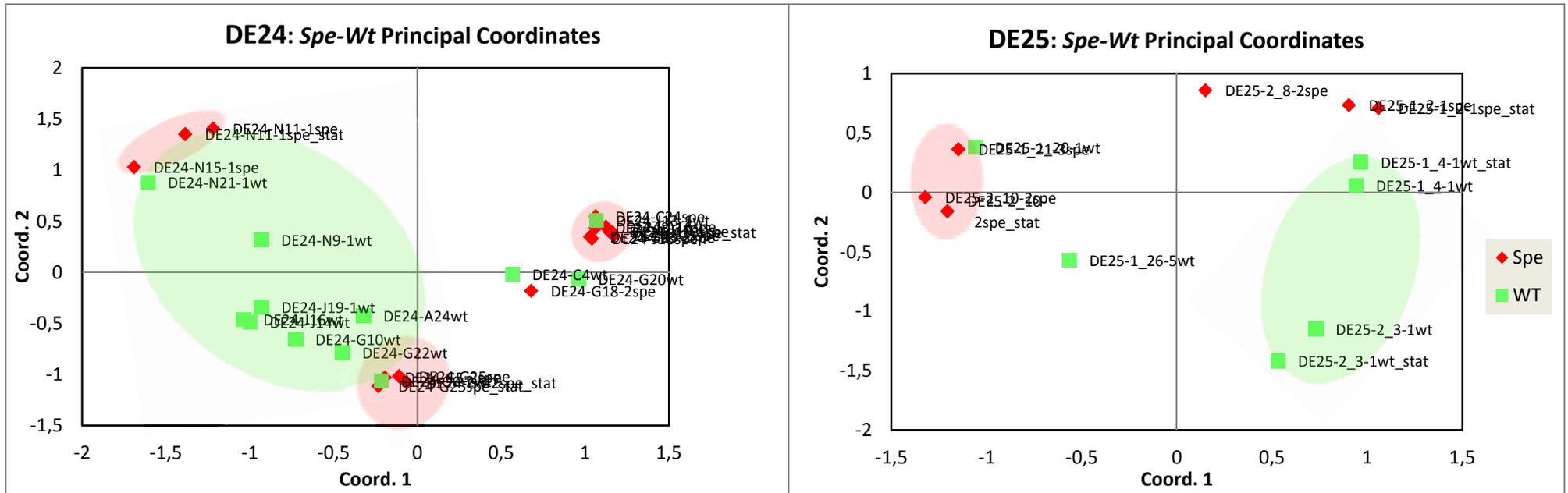


Abbildung 25: PCoAs DE: Spe - Wt

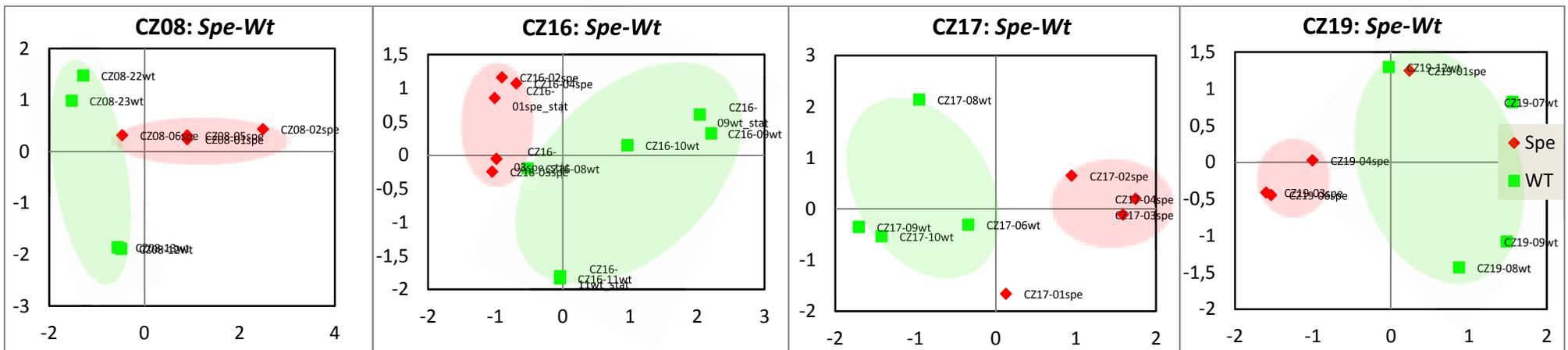


Abbildung 26: PCoAs CZ: Spe - Wt

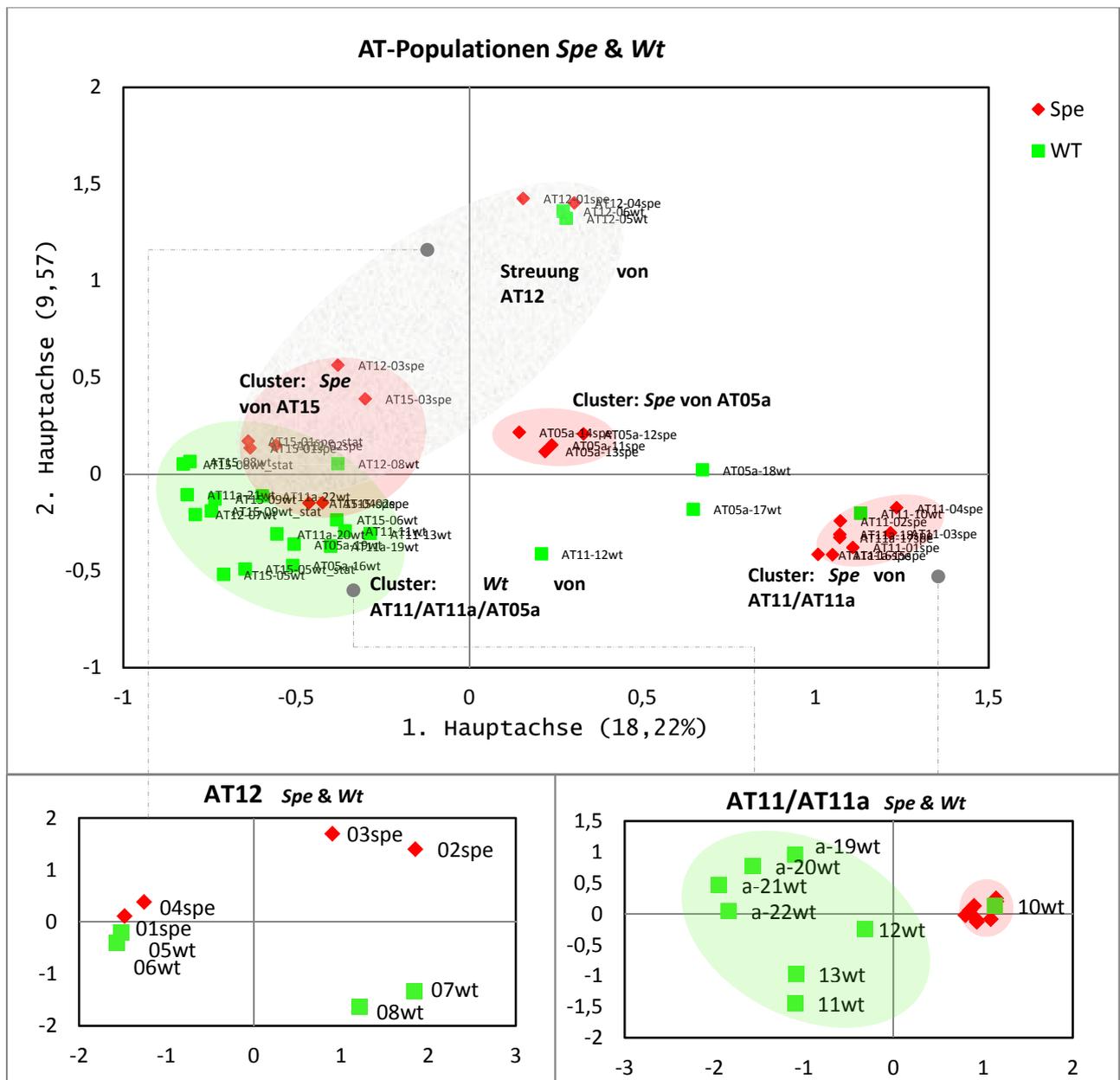


Abbildung 27: PCoAs AT: *Spe* - *Wt*

6.5 STRUCTURE

Tabelle 28: Zuordnungswahrscheinlichkeiten: K=3 „no admixture model“

Nr.	Individuen	Population	Cluster=1	Cluster=2	Cluster=3
1	AT05a-11spe	1	1.000	0.000	0.000
2	AT05a-12spe	1	1.000	0.000	0.000
3	AT05a-13spe	1	1.000	0.000	0.000
4	AT05a-14spe	1	1.000	0.000	0.000
5	AT05a-16wt	1	1.000	0.000	0.000
6	AT05a-17wt	1	1.000	0.000	0.000
7	AT05a-18wt	1	1.000	0.000	0.000
8	AT05a-19wt	1	1.000	0.000	0.000
9	AT11-01spe	2	1.000	0.000	0.000
10	AT11-02spe	2	1.000	0.000	0.000
11	AT11-03spe	2	1.000	0.000	0.000
12	AT11-04spe	2	1.000	0.000	0.000
13	AT11-10wt	2	1.000	0.000	0.000
14	AT11-11wt	2	1.000	0.000	0.000
15	AT11-12wt	2	1.000	0.000	0.000
16	AT11-13wt	2	1.000	0.000	0.000
17	AT11a-15spe	3	1.000	0.000	0.000
18	AT11a-16spe	3	1.000	0.000	0.000
19	AT11a-17spe	3	1.000	0.000	0.000
20	AT11a-18spe	3	1.000	0.000	0.000
21	AT11a-19wt	3	1.000	0.000	0.000
22	AT11a-20wt	3	1.000	0.000	0.000
23	AT11a-21wt	3	1.000	0.000	0.000
24	AT11a-22wt	3	1.000	0.000	0.000
25	AT12-01spe	4	1.000	0.000	0.000
26	AT12-02spe	4	1.000	0.000	0.000
27	AT12-03spe	4	1.000	0.000	0.000
28	AT12-04spe	4	1.000	0.000	0.000
29	AT12-05wt	4	1.000	0.000	0.000
30	AT12-06wt	4	1.000	0.000	0.000
31	AT12-07wt	4	1.000	0.000	0.000
32	AT12-08wt	4	1.000	0.000	0.000
33	AT15-01spe	5	1.000	0.000	0.000
34	AT15-01spe_	5	1.000	0.000	0.000
35	AT15-02spe	5	1.000	0.000	0.000
36	AT15-03spe	5	1.000	0.000	0.000
37	AT15-04spe	5	1.000	0.000	0.000
38	AT15-05wt	5	1.000	0.000	0.000
39	AT15-05wt_s	5	1.000	0.000	0.000
40	AT15-06wt	5	1.000	0.000	0.000
41	AT15-08wt	5	1.000	0.000	0.000
42	AT15-08wt_s	5	1.000	0.000	0.000
43	AT15-09wt	5	1.000	0.000	0.000
44	AT15-09wt_s	5	1.000	0.000	0.000
45	CZ08-01spe	6	1.000	0.000	0.000
46	CZ08-02spe	6	1.000	0.000	0.000
47	CZ08-05spe	6	1.000	0.000	0.000
48	CZ08-06spe	6	1.000	0.000	0.000
49	CZ08-12wt	6	1.000	0.000	0.000
50	CZ08-13wt	6	1.000	0.000	0.000
51	CZ08-22wt	6	1.000	0.000	0.000
52	CZ08-23wt	6	1.000	0.000	0.000
53	CZ16-01spe	7	1.000	0.000	0.000
54	CZ16-01spe_	7	1.000	0.000	0.000
55	CZ16-02spe	7	1.000	0.000	0.000
56	CZ16-03spe	7	1.000	0.000	0.000
57	CZ16-03spe_	7	1.000	0.000	0.000
58	CZ16-04spe	7	1.000	0.000	0.000
59	CZ16-08wt	7	1.000	0.000	0.000

60	CZ16-09wt	7	1.000	0.000	0.000
61	CZ16-09wt_s	7	1.000	0.000	0.000
62	CZ16-10wt	7	1.000	0.000	0.000
63	CZ16-11wt	7	1.000	0.000	0.000
64	CZ16-11wt_s	7	1.000	0.000	0.000
65	CZ17-01spe	8	1.000	0.000	0.000
66	CZ17-02spe	8	1.000	0.000	0.000
67	CZ17-03spe	8	1.000	0.000	0.000
68	CZ17-04spe	8	1.000	0.000	0.000
69	CZ17-06wt	8	1.000	0.000	0.000
70	CZ17-08wt	8	1.000	0.000	0.000
71	CZ17-09wt	8	1.000	0.000	0.000
72	CZ17-10wt	8	1.000	0.000	0.000
73	CZ19-01spe	9	1.000	0.000	0.000
74	CZ19-03spe	9	1.000	0.000	0.000
75	CZ19-04spe	9	1.000	0.000	0.000
76	CZ19-06spe	9	1.000	0.000	0.000
77	CZ19-07wt	9	1.000	0.000	0.000
78	CZ19-08wt	9	1.000	0.000	0.000
79	CZ19-09wt	9	1.000	0.000	0.000
80	CZ19-12wt	9	1.000	0.000	0.000
81	DE24-A16spe	10	0.000	1.000	0.000
82	DE24-A16spe	10	0.000	1.000	0.000
83	DE24-A24wt	10	0.946	0.054	0.000
84	DE24-C24spe	10	0.000	1.000	0.000
85	DE24-C4wt	10	0.000	1.000	0.000
86	DE24-G10wt	10	0.992	0.008	0.000
87	DE24-G18-2s	10	0.000	1.000	0.000
88	DE24-G20wt	10	0.000	1.000	0.000
89	DE24-G22wt	10	0.000	1.000	0.000
90	DE24-G23-2s	10	0.000	1.000	0.000
91	DE24-G25spe	10	0.000	1.000	0.000
92	DE24-G25spe	10	0.000	1.000	0.000
93	DE24-G5-2sp	10	0.000	1.000	0.000
94	DE24-G5-2sp	10	0.000	1.000	0.000
95	DE24-G6-2wt	10	0.000	1.000	0.000
96	DE24-J03spe	10	0.000	1.000	0.000
97	DE24-J10-1s	10	0.000	1.000	0.000
98	DE24-J13-1w	10	0.000	1.000	0.000
99	DE24-J14wt	10	1.000	0.000	0.000
100	DE24-J16wt	10	1.000	0.000	0.000
101	DE24-J18spe	10	0.000	1.000	0.000
102	DE24-J19-1w	10	1.000	0.000	0.000
103	DE24-J8-1sp	10	0.000	1.000	0.000
104	DE24-N11-1s	10	1.000	0.000	0.000
105	DE24-N11-1s	10	1.000	0.000	0.000
106	DE24-N15-1s	10	1.000	0.000	0.000
107	DE24-N21-1w	10	1.000	0.000	0.000
108	DE24-N9-1wt	10	1.000	0.000	0.000
109	DE25-1_20-1	11	0.000	0.000	1.000
110	DE25-1_21-3	11	0.000	0.000	1.000
111	DE25-1_2-1s	11	0.000	0.000	1.000
112	DE25-1_2-1s	11	0.000	0.000	1.000
113	DE25-1_26-5	11	0.000	0.000	1.000
114	DE25-1_4-1w	11	0.000	0.000	1.000
115	DE25-1_4-1w	11	0.000	0.000	1.000
116	DE25-2_10-2	11	0.000	0.000	1.000
117	DE25-2_10-2	11	0.000	0.000	1.000
118	DE25-2_3-1w	11	0.000	0.000	1.000
119	DE25-2_3-1w	11	0.000	0.000	1.000
120	DE25-2_8-2s	11	0.000	0.000	1.000

6.6 Sequenzierung

Tabelle 29: Auswertung der Gelbilder von AGdel

Individuum	Gelbild	Individuum	Gelbild	Individuum	Gelbild	Individuum	Gelbild
DE24-A16spe	Deletion	DE24-J8-1spe	Deletion	DE24-G23-2spe	Deletion	AT05a-11spe	Deletion
DE24-A24wt	Deletion	DE24-J10-1spe	Deletion	DE24-G18-2spe	Deletion	AT05a-12spe	Deletion
DE24-C24spe	Deletion	DE24-J13-1wt	Deletion	DE24-G22wt	Deletion	AT05a-13spe	Deletion
DE24-C4wt	Deletion	DE24-J19-1wt	k. Deletion	DE24-G10wt	Deletion	AT05a-14spe	Deletion
DE24-G5-2spe	Deletion	DE24-N11-1spe	Deletion	DE24-J18spe	Deletion	AT05a-16wt	k. Deletion
DE24-G25spe	Deletion	DE24-N15-1spe	Deletion	DE24-J03spe	Deletion	AT05a-17wt	Deletion
DE24-G6-2wt	Deletion	DE24-N9-1wt	Deletion	DE24-J14wt	k. Deletion	AT05a-18wt	Deletion
DE24-G20wt	Deletion	DE24-N21-1wt	k. Deletion	DE24-J16wt	Deletion	AT05a-19wt	k. Deletion
Individuum	Gelbild	Individuum	Gelbild	Individuum	Gelbild	Individuum	Gelbild
AT11-01spe	Deletion	CZ19-01spe	Deletion	AT12-01spe	Deletion	DE25-1_4-1wt	k. Deletion
AT11-02spe	Deletion	CZ19-03spe	Deletion	AT12-02spe	Doppelbande	DE25-1_20-1wt	Deletion
AT11-03spe	Deletion	CZ19-04spe	k. Deletion	AT12-03spe	k. Deletion	DE25-1_26-5wt	Deletion
AT11-04spe	Deletion	CZ19-06spe	k. Deletion	AT12-04spe	Deletion	DE25-2_3-1wt	Deletion
AT11-10wt	k. Deletion	CZ19-07wt	k. Deletion	AT12-05wt	Deletion	DE25-1_2-1spe	Doppelbande
AT11-11wt	Deletion	CZ19-08wt	k. Deletion	AT12-06wt	Deletion	DE25-1_21-3spe	Deletion
AT11-12wt	k. Deletion	CZ19-09wt	k. Deletion	AT12-07wt	k. Deletion	DE25-2_8-2spe	n. geklappt
AT11-13wt	k. Deletion	CZ19-12wt	k. Deletion	AT12-08wt	k. Deletion	DE25-2_10-2spe	Deletion

