

**Nicole Heinrichsmeier**

**Phylogenetische Untersuchungen an Arten der Gräser-Gattung  
*Aira* L. anhand karyologischer und molekularbiologischer  
Methoden sowie *In situ*-Hybridisierungen.**

**2005**

**Biologie**

**Phylogenetische Untersuchungen an Arten der Gräser-Gattung  
*Aira L.* anhand karyologischer und molekularbiologischer  
Methoden sowie *In situ*-Hybridisierungen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**Vorgelegt von  
Nicole Heinrichsmeier  
aus Beckum**

**- 2005 -**

---

<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. A. Steinbüchel</b>
<b>Erster Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. F. Albers</b>
<b>Zweiter Gutachter:</b>	<b>Priv. Doz. Dr. K. B. Tenberge</b>
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	<b>.....25.10.2005.....</b>
<b>Tag der Promotion:</b>	<b>.....28.10.2005.....</b>

*Mit Botanik gibst du dich ab*

*„Mit Botanik gibst du dich ab? mit Optik? Was tust du?*

*Ist es nicht schöner Gewinn, rühren ein zärtliches Herz?“*

*Ach, die zärtlichen Herzen! Ein Pfuscher vermag sie zu rühren;*

*Sei es mein einziges Glück, dich zu berühren, Natur!*

*(J.W. Goethe)*



<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>5</b>
2.1.1	Pflanzenmaterial	5
2.1.2	Primer für die PCR	9
2.1.3	Primer für die Sequenzierung	9
2.1.4	DNA-Sequenzen aus der Genbank	10
2.1.5	Primer für die RAPD-Analysen	11
2.1.6	Chemikalien, Enzyme, Fluorochrome, Antikörper und „Kits“	11
2.1.7	Puffer und Lösungen	12
2.1.7.1	Karyologie	12
2.1.7.2	DNA-Sequenzierung und RAPD-Analysen	13
2.1.7.3	Genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung	14
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
2.2.1	Morphologie	16
2.2.2	Karyologie und Verbreitung	17
2.2.2.1	Darstellung der Chromosomen	17
2.2.2.1.1	Keimung	17
2.2.2.1.2	Vorbereitung	17
2.2.2.1.3	Karmin-Färbung nach SNOW (1963)	18
2.2.2.2	Auswertung	18
2.2.2.3	DAPI	21
2.2.2.4	Verbreitung	22
2.2.3	Molekulargenetik	22
2.2.3.1	DNA-Sequenzierung	22
2.2.3.1.1	Extraktion der pflanzlichen Gesamt-DNA	22
2.2.3.1.2	Gelelektrophorese zur DNA-Kontrolle	23
2.2.3.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
2.2.3.1.4	Reinigung der PCR-Produkte	24
2.2.3.1.5	Sequenzierung	25
2.2.3.1.6	Auswertung der Sequenzen	26
2.2.3.2	Phylogenetische Analysen	27
2.2.3.2.1	Alignierung der Sequenzen	27
2.2.3.2.2	Kladistische Methoden	28
2.2.3.3	RAPD-Untersuchungen	30
2.2.3.3.1	RAPD-PCR	30
2.2.3.3.2	DNA-Gelelektrophorese	31
2.2.3.3.3	Daten-Analyse	32
2.2.4	Genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung (GISH)	33
2.2.4.1	Anzucht, Ernte und Vorbereitung der Keimlinge	35
2.2.4.2	Enzymbehandlung der Keimlinge	35
2.2.4.3	Blattmaterial für Genom-Sonden und Blocking-DNA	36
2.2.4.3.1	Markierung der Sonden-DNA	38
2.2.4.3.2	Blocking-DNA	40
2.2.4.4	Hybridisierung und Detektion	40
2.2.4.5	Auswertung der Präparate	41

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Morphologie</b>	<b>42</b>
3.1.1	Überblick über die Arten	42
3.1.1.1	<i>Aira elegantissima</i> Schur.	45
3.1.1.2	<i>Aira tenorei</i> Guss.	46
3.1.1.3	<i>Aira cupaniana</i> Guss.	47
3.1.1.4	<i>Aira praecox</i> L.	48
3.1.1.5	<i>Aira caryophyllea</i> L.	49
3.1.1.6	<i>Aira multiculmis</i> Dum.	50
3.1.2	Morphologische Merkmalsmatrix	51
<b>3.2</b>	<b>Karyologie und Verbreitung</b>	<b>54</b>
3.2.1	Karyotyp-Analysen	55
3.2.1.1	<i>Aira elegantissima</i> Schur.	55
3.2.1.2	<i>Aira cupaniana</i> Guss.	58
3.2.1.3	<i>Aira tenorei</i> Guss.	61
3.2.1.4	<i>Aira praecox</i> L.	64
3.2.1.5	<i>Aira caryophyllea</i> L.	68
3.2.1.6	<i>Aira multiculmis</i> Dum.	71
3.2.1.7	<i>Aira provincialis</i> Jordan	74
3.2.2	Karyotyp-Vergleich	75
3.2.3	DAPI-Anwendung	79
3.2.4	Verbreitung der Arten	79
<b>3.3</b>	<b>Molekulargenetik</b>	<b>88</b>
3.3.1	DNA-Sequenzierungen	88
3.3.1.1	Chloroplastengenom – <i>trnL-F</i> Region	89
3.3.1.2	Kerngenom – ITS-Region	93
3.3.2	RAPD-Untersuchungen	100
3.3.2.1	Primer-Auswahl	101
3.3.2.2	RAPD-Gele	102
3.3.2.3	Phylogenetische Auswertung	103
3.3.2.4	RAPD-Analysen bei <i>A. caryophyllea</i> und <i>A. multiculmis</i>	110
3.3.2.4.1	<i>A. caryophyllea</i>	111
3.3.2.4.2	<i>A. multiculmis</i>	113
<b>3.4</b>	<b>Genomische <i>in situ</i>-Hybridisierung</b>	<b>118</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>123</b>
<b>4.1</b>	<b>Morphologie</b>	<b>123</b>
4.1.1	Arten-Überblick	123
4.1.2	Morphologische Merkmalsmatrix	130
<b>4.2</b>	<b>Karyologie und Verbreitung</b>	<b>131</b>
4.2.1	Karyologie	131
4.2.2	Verbreitung	142

<b>4.3</b>	<b>Molekulargenetik</b>	<b>146</b>
4.3.1	DNA-Sequenzierungen	146
4.3.2	RAPD-Analysen	150
<b>4.4</b>	<b>Genomische <i>in situ</i>-Hybridisierung</b>	<b>153</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>159</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>161</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>175</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>175</b>
<b>7.2</b>	<b>Protokoll für die Genomische <i>in situ</i>-Hybridisierung</b>	<b>177</b>
7.2.1	Chromosomen-Präparation, Waschschrte u. Enzymbehandlungen	177
7.2.2	DNA-Vorbereitung	178
7.2.2.1	Blocking-DNA	178
7.2.2.2	Markierung und Überprüfung der Sonden-DNA	180
7.2.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung	181
7.2.4	Detektion	182
<b>7.3</b>	<b>Alignment von Arten der Gattung <i>Aira</i></b>	<b>184</b>
7.3.1	Alignment der <i>trnL</i> -F Region	184
7.3.2	Alignment der ITS-Region	187
<b>7.4</b>	<b>RAPD-Analysen</b>	<b>192</b>
7.4.1	Amplifikationsprofile	192
7.4.2	Auswertung der RAPD-Amplifikationsprofile	197

## 1. Einleitung

Die Gräser (Poaceae) bilden mit über 10 000 Arten und 760 Gattungen eine der größten Familien unter den Blütenpflanzen. Sie sind kosmopolitisch und stellen mit rund 20% den Hauptbestandteil der die Erde bedeckenden Vegetation dar. Weiterhin erreichen die Poaceae mit ca. 80% den höchsten Polyploidiegrad aller Angiospermen-Familien (RAMSEY & SCHEMSKE 1998).

Nach dem Aufkommen der Cytologie und Genetik als Untersuchungsmethoden wurde kaum eine Pflanzengruppe so intensiv bearbeitet wie die Poaceae. Das hat nach STEBBINS (1956) drei Gründe:

- 1) Gräser sind äußerst wichtig als Viehfutter.
- 2) Getreidearten, ebenso wie der Zucker, gehören zum täglichen Nahrungsbedarf.
- 3) Bambus ist in vielen Teilen der Welt ein sehr nützliches Baumaterial.

Dennoch wird die Systematik der Gräser ständig komplettiert und zeigt keine befriedigende, vollständige Übersicht. Dies kann durch eine Einheitlichkeit der Gräser in ihren vegetativen Teilen erklärt werden. Ein Wiedererkennen stützt sich nahezu ausschließlich auf den Bau der Ährchen.

Neue Trends in Form von hauptsächlich molekularen Daten und analytischen Methoden sind von immer größer werdendem Interesse. Wurden früher Untersuchungen in der Pflanzensystematik und -evolution anhand experimenteller Kreuzungen zwischen den Arten durchgeführt, kamen später chemische Studien und molekulare Daten hinzu, die kladistisch analysiert wurden (CRAWFORD *et al.* 2005).

Biosystematische Daten in Kombination mit Beobachtungen zur Ökologie, Morphologie und geographischer Verbreitung haben erste Hypothesen über die Evolution der Pflanzen wie auch die der bearbeiteten Gattung *Aira* geliefert. Diese Gattung aus der Familie der Poaceae gehört zu der Tribus *Aveneae* und dort zu der Subtribus *Airinae*, zusammen mit den Gattungen *Airopsis*, *Antinoria*, *Avenella*, *Corynephorus*, *Periballia* und *Vahlodea*. Die Einteilung basiert auf morphologischen, anatomischen, karyologischen, palynologischen und cytogenetischen Untersuchungen von ALBERS & BUTZIN (1977). Demgegenüber finden sich

in der zweiten Subtribus *Aristaveninae* der Tribes *Aveneae* die Gattungen *Deschampsia* und *Aristavena*.

Früher sind insbesondere blütenmorphologische Details in der Gattung *Aira* für die herkömmliche Bestimmung nach rein morphologisch-anatomischen Merkmalen von großer Wichtigkeit gewesen, da sich die Arten vegetativ kaum unterscheiden lassen. Das Verhältnis der Länge der Ährchenachse zu den Ährchenlängen, die Form und Länge der Spelzen sowie die Antherenlänge fungierten als wesentliche Bestimmungsmerkmale (STEINERT 1988).

Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass in der Gruppe der annuellen *Airinae*-Arten die Ausbildung der Gesamtblütenstände art- oder gattungsspezifisch sein kann.

Auch karyologische Untersuchungen (z.B. ALBERS 1973, 1978a-c, 1980; ALBERS & BUTZIN 1977) haben zur bestehenden Einteilung der Arten in die drei Sektionen *Trichodaera*, *Euaera* (*Aira*) und *Pycnaera* geführt, da der Karyotyp von großer Wichtigkeit für die intragenerische Abgrenzung der Arten untereinander ist.

So war zu Beginn der biosystematischen Studien die Bestimmung der Chromosomenzahl ein integrierter Teil in der Pflanzensystematik (CRAWFORD *et al.* 2005), da man Aussagen für taxonomische Zwecke machen und Gruppen anhand von speziellen chromosomalen Markern abgrenzen konnte. Jede Art ist in der Regel durch eine bestimmte Chromosomenzahl charakterisiert, wodurch die Chromosomenbasiszahlen von großer evolutiver Bedeutung und taxonomischem Wert sind.

Auch die Charakterisierung der fünf Unterfamilien der Poaceae erfolgte durch ihre unterschiedlichen Basiszahlen. Ähnliche Chromosomenzahlen bzw. Chromosomenbasiszahlen deuten auf eine nahe Verwandtschaft hin. Die Chromosomenzahlen sind jedoch nicht als konstant anzusehen, da unterschiedliche Chromosomenzahlen innerhalb einer Spezies durchaus vorkommen können (SPIES 2004).

Mittlerweile liegt der Blickpunkt der Karyotyp-Studien eher darin, ihre Veränderungen innerhalb der Evolutionsgeschichte einer Gruppe, so auch in der Gattung *Aira*, zu entschlüsseln. Die Chromosomen-Evolutionsstudien stellen dabei nach wie vor ein wirksames Gerüst innerhalb der phylogenetischen Analyse dar (CRAWFORD *et al.* 2005).

Zahlreiche molekulare Untersuchungen haben in den letzten Jahren eine Fülle von Sequenz-Daten geliefert, die zur Erzeugung von Phylogenien und die Berechnung von genetischen Divergenzen verwendet wurden.

Bisher veröffentlichte phylogenetische Ergebnisse innerhalb der Poaceae basieren sowohl auf morphologischen als auch molekularen Daten verschiedenster Arten. Molekulare Marker werden als zusätzliches Hilfsmittel für die Taxonomie, Phylogenie, Ökologie und Genetik eingesetzt, um verwandtschaftliche Beziehungen von Arten oder Gattungen bei den Gräsern zu studieren (HSIAO *et al.* 1999).

Für systematische Zwecke ist die ringförmige Chloroplasten-DNA (cpDNA) von primärer Bedeutung, da das mit Abstand kleinste Genom der pflanzlichen Zelle eine relativ einheitliche Größe hat, unabhängig von der Kern-DNA ist und bei den Angiospermen nur maternal vererbt wird (TOULOU MENIDOU 2001).

Die Bereiche der Kern-DNA, die zu systematischen Zwecken herangezogen werden, sind insbesondere Gene, die für ribosomale RNA kodieren. Speziell die ITS-Regionen haben sich für vergleichende Studien als geeignet herausgestellt (TOULOU MENIDOU 2001). BALDWIN *et al.* (1995) haben die ITS-Region insgesamt für phylogenetische Untersuchungen auf Familien-, Gattungs- und Sektionsebene für geeignet eingestuft. Innerhalb der Gräser haben HSIAO *et al.* (1999) phylogenetische Verwandtschaften basierend auf Sequenzen der ITS-Region der Kern-DNA aufzeigen können.

Viele dieser Studien konzentrieren sich auf die Zuordnung der basalen Unterfamilien der Gräsern und ihre Beziehungen zu den verbleibenden Taxa (MALAN 2002). Innerhalb der Familie der Poaceae sind bisher nur wenige Taxa wie z.B. die Arten der Gattung *Zea*, der Tribus *Triticeae* und weitere Mitglieder der Unterfamilie Pooideae anhand molekularer Marker untersucht worden (GREBENSTEIN *et al.* 1998). Dennoch ist die Monophylie dieser aus fünf Unterfamilien bestehenden Familie niemals in Frage gestellt worden.

Mit Hilfe dieser Studie soll ein Versuch unternommen werden, durch morphologische und karyologische Untersuchungen sowie durch die Anwendung von molekularen DNA-Fingerprint-Markern, die Systematik in der Gattung *Aira* anhand ausgewählter wichtiger Arten zu analysieren. Die Bearbeitung der Arten durch vielfältige Methoden, unter anderem die Anwendung verschiedener Typen molekularer Marker (ITS-Region, Chloroplasten-

Region, RAPDs), soll zu einer besseren Auflösung der phylogenetischen Beziehungen in der Gattung *Aira* beitragen.

Das Vorkommen von diploiden und tetraploiden Arten innerhalb der Gattung *Aira* weist sie als Polyploidie-Komplex aus. Dieser repräsentiert das häufigste Modell von morphologischen Variationen innerhalb der Gräser, wobei ein solcher Komplex gewöhnlich aus zwei oder mehr diploiden Arten oder Subspezies und/oder ihrer Hybride besteht (MALAN 2002). Diese Tatsache wirft die Frage nach den phylogenetischen Beziehungen der Arten untereinander auf, wobei auf die Entstehung der tetraploiden Vertreter durch Allo- bzw. Autopolyploide ein besonderes Augenmerk gelegt wird. Da bei den tetraploiden Arten der Gattung *Aira* bisweilen Unkenntnis über die beteiligten parentalen Genome herrscht, soll durch den Einsatz der Genomischen *in situ*-Hybridisierung eine Charakterisierung von Genomen und Chromosomen in Hybrid-Polyploiden, Hybrid-Pflanzen oder allopolyploiden Arten ermöglicht werden (RAINA & RANI 2001), so dass Rückschlüsse auf die parentalen Genom-Komponenten gezogen werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Untersuchungsobjekte waren hauptsächlich die Gattung *Aira* (Poaceae) sowie einige Vertreter aus der nah verwandten Gattung *Deschampsia*. Diese Gattung wurde im Hinblick auf die molekulargenetischen Untersuchungen als Außengruppe verwendet, da sie mit der Gattung *Aira* eng verwandt ist. Das verwendete Material wurde im Botanischen Garten Münster kultiviert, wobei die Samen aus verschiedenen Botanischen Gärten oder aus eigenen Aufsammlungen von Prof. Albers, Manfred Steinert (Frankreich-Material) und Thomas Muer (Frankreich-Material mit 86-20-154- Nummern) stammen. Das Nummernsystem von 1 – 102 entspricht dem eigenen Aussaatprotokoll, das auf neuem Samenmaterial, aber auch auf altem, noch in der Arbeitsgruppe existierenden Material beruht. Es wurde während der Aussaat fortlaufend mit einer Nummer von 1 bis 102 versehen. Bei den fehlenden Nummern (9, 20, 25, 47, 56, 64, 67, 70, 71, 74, 75, 80-93, 100) handelt es sich um Arten, die nicht zur Keimung gekommen sind und verworfen wurden.

Eine Auflistung des vollständigen Materials ist der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Verwendetes Material

Pflanzenart	Akzessionsnummer	Fundort	Herbar	Eigene Nummer
<i>Aira caryophyllea</i>	305	Italien, BG Firenze, Loc. Raccolta, Montescali (FI), 3.6.1998	MSUN	18
<i>Aira caryophyllea</i>	Keine Angabe	Frankreich, 1km nördlich von Ambon an der D 140, am Rand von Fahrspur in einer Heidefläche	MSUN	40
<i>Aira caryophyllea</i>	1933	Deutschland, BG Berlin-Dahlem	MSUN	76
<i>Aira caryophyllea</i>	855	Deutschland, Braunschweig	MSUN	96
<i>Aira caryophyllea</i>	370	Italien, BG Firenze, Loc. Raccolta	MSUN	97
<i>Aira caryophyllea</i>	906	Italien, BG Palermo, Adiacenze di Ucria, Messina	MSUN	98
<i>Aira cupaniana</i>	86-20-114-10a	Frankreich	MSUN	30
<i>Aira cupaniana</i>	86-20-114-10b	Frankreich	MSUN	31



Aira cupaniana	89-13-019-20 (Topf 5b)	Keine Angabe	MSUN	39
Aira cupaniana	89-13-017-20 (Topf 5)	Keine Angabe	MSUN	53
Aira cupaniana	89-13-018-20 (Topf 5a)	Keine Angabe	MSUN	54
Aira cupaniana	2040	Belgien, Liège	MSUN	68
Aira cupaniana	309	Keine Angabe	MSUN	69
Aira cupaniana	Al 4180	Griechenland, Naxos, Kinidaros	MSUN	101
Aira cupaniana	Al 4179	Portugal, Algarve, 8km W Silves / 2km SW Lagos	MSUN	102
Aira elegantissima	648	Frankreich, Jardin Botanique de la ville Lyon	MSUN	2
Aira elegantissima	Keine Angabe	Italien, BG Siena, Civitella Marittima (Grosseto)	MSUN	4
Aira elegantissima	Keine Angabe	Keine Angabe	MSUN	6
Aira elegantissima	Keine Angabe	Italien, BG Genova	MSUN	7
Aira elegantissima	Keine Angabe	Keine Angabe	MSUN	10
Aira elegantissima	89-13-011-20	Keine Angabe	MSUN	11
Aira elegantissima	86-20-152-14a	Frankreich	MSUN	26
Aira elegantissima	86-20-152-14b	Frankreich	MSUN	32
Aira elegantissima	86-20-154-14a	Frankreich, Var, Massif des Maures, 3km östl. des Col de Fourche, Richtung la Garde- Freinet	MSUN	33
Aira elegantissima	86-20-154-14b	Frankreich, Var, Massif des Maures, 3km östl. des Col de Fourche, Richtung la Garde- Freinet	MSUN	43
Aira elegantissima	86-20-154-14c	Frankreich, Var, Massif des Maures, 3km östl. des Col des Fourche, Richtung la Garde-Freinet	MSUN	60
Aira elegantissima	Keine Angabe	Keine Angabe	MSUN	72
Aira elegantissima	1987	Italien, Siena	MSUN	73
Aira elegantissima	901 oder 907	Italien, BG Palermo, Lago Fanaco, Castronoro di Sicilia, Palermo	MSUN	99
Aira multiculmis	Keine Angabe	Portugal, Coimbra	MSUN	3
Aira multiculmis	350	Frankreich, BG Nantes, Le Thoueil 'Le Marchais clair', Maine et Loire	MSUN	12
Aira multiculmis	351	Frankreich, BG Nantes, Belle-Ile en Mèr, Pointe Cardinal Morbihau	MSUN	13

<i>Aira multiculmis</i>	349	Frankreich, BG Nantes, Ancenis `Les Fourcins`, Loire-Atlantique	MSUN	14
<i>Aira praecox</i>	Al 2645	Frankreich, Rocquaine Bay	MSUN	1
<i>Aira praecox</i>	353	Frankreich, BG Nantes, St. Jacques de Thouar, Cascade de Pommier, Serres (Deux)	MSUN	15
<i>Aira praecox</i>	352	Frankreich, BG Nantes, Ancenis `Les Fourcins`, Loire-Atlantique	MSUN	16
<i>Aira praecox</i>	354	Frankreich, BG Nantes, Mouilleron en Pareds, Colline des Moulins, Vendée	MSUN	17
<i>Aira praecox</i>	117	Dänemark, BG Aarhus, DMK, E, Jütland, Farnaes, 56°27'N 10°58'E	MSUN	19
<i>Aira praecox</i>	Liège 1985 (+1943)	Belgien, Waterscheid, Prov. De Limbourg	MSUN	77
<i>Aira praecox</i>	Liège 1985 (+1942)	Belgien, Lanklaar, Prov. De Limbourg,	MSUN	78
<i>Aira praecox</i>	1372	Deutschland, Mila-See/Kr. Beeskow 99, Humboldt-Uni Berlin	MSUN	79
<i>Aira praecox</i>	857	Deutschland, Münster, Hammer Str., Bahndamm	MSUN	94
<i>Aira praecox</i>	856	Deutschland, Dülmen, Sandgebiet	MSUN	95
<i>Aira provincialis</i>	2223	Keine Angabe	MSUN	5
<i>Aira provincialis</i>	86-20-031-10	Frankreich, Massif des Maures	MSUN	8
<i>Aira provincialis</i>	86-20-023-14	Frankreich	MSUN	27
<i>Aira provincialis</i>	86-20-025-14	Frankreich	MSUN	28
<i>Aira tenorei</i>	86-20-254-14	Frankreich, Massif des Maures, 5km südl. Carnoules	MSUN	59
<i>Aira tenorei</i>	86-20-251-10	Frankreich	MSUN	62
<i>Aira tenorei</i>	86-20-011-10a	Frankreich	MSUN	63
<i>Aira tenorei</i>	86-20-011-10b	Frankreich	MSUN	65
<b>Arten der Outgroup:</b>				
<i>Deschampsia cespitosa</i>	930	Island, HB Akureyri, Grassland 50-60m	MSUN	21
<i>Deschampsia cespitosa</i> v. <i>arctica</i>	781	Island, HB Akureyri	MSUN	22
<i>Deschampsia cespitosa</i> ssp. <i>cespitosa</i> f. <i>aurea</i>	780	Island, HB Akureyri	MSUN	23
<i>Deschampsia cespitosa</i> ssp. <i>cespitosa</i>	779	Island, HB Akureyri	MSUN	24

<b>Nicht identifizierbare Arten:</b>				
Aira spec. 3.1a	Keine Angabe	Griechenland		29
Aira spec. 1a	Keine Angabe	Griechenland		34
Aira spec. 2a	Keine Angabe	Griechenland		35
Aira 18-1a	Keine Angabe	Frankreich, Cap de Cateret, an einem Felshang		36
Aira spec. 3.0a	Keine Angabe	Griechenland		37
Aira 19-1	Keine Angabe	Frankreich, Flamanville, bei den Semaphoren		38
Aira Mi 23	Keine Angabe	Keine Angabe		41
Aira 3-2	Keine Angabe	Frankreich, Ortsausgang Guer an der D 773, Hang an der Steinbruch-Zufahrt		42
Aira 18-1b	Keine Angabe	Keine Angabe		44
Aira 21-1	Keine Angabe	Frankreich, Flamanville, Richtung Heauville, Straßenrand		45, 61
Aira 10-1	Keine Angabe	Frankreich, an der D 30, 200 m vor der Abzweigung nach Loc Equiner, Grünstreifen vor einem Eichenwald		46
Aira spec. 3.1b	Keine Angabe	Griechenland		48
Aira spec. 3.0b	Keine Angabe	Griechenland		49
Aira spec. 1b	Keine Angabe	Griechenland		50
Aira spec. 2b	Keine Angabe	Griechenland		51
Aira spec. 3.2	Keine Angabe	Griechenland		52
Aira 30-1	Keine Angabe	Frankreich, La Guenorais, Straßenböschung		55
Aira spec. 3.3	Keine Angabe	Griechenland		57
Aira 16-1	Keine Angabe	Frankreich, Le Croix Helleau (Josselin), am Rand eines Erbsenfeldes		58
Aira spec. 2210	Keine Angabe	Keine Angabe		66

### 2.1.2 Primer für die PCR

#### *trnL-F* Region:

Die Primer wurden von MWG-Biotech synthetisiert. Die Sequenzen der Primer Ttc und Ttf entsprechen den „universellen“ Primern, die für die meisten Angiospermen-Arten in den Regionen zwischen *trnL* (UAA) 5'Exons und *trnF* (GAA) eingesetzt werden können (TABERLET *et al.* 1991).

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>T<sub>A</sub> (°C)</u>
Ttc	5' – CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG – 3'	55°C
Ttf	5' – ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG – 3'	55°C

#### ITS-Region:

Die ITS-Regionen wurden mit den Primern 17SE und 26SE (WHITE *et al.* 1990) amplifiziert.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>T<sub>A</sub> (°C)</u>
17SE	5' – ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG – 3'	55°C
26SE	5' – TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C – 3'	55°C

### 2.1.3 Primer für die Sequenzierung

#### *trnL-F* Region:

Die für die Sequenzierung eingesetzten Primer sind ebenfalls die Primer Ttc und Ttf (5' Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoff IRD 800), die bereits für die PCR-Reaktion verwendet wurden.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>T<sub>A</sub> (°C)</u>
Ttc	5' – CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG – 3'	62°C
Ttf	5' – ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG – 3'	58°C

**ITS-Region:**

Für die Sequenzierung der ITS-Regionen wurden die Primer 5.811 und 5.812 sowie 5.8SF und 5.8RF nach WHITE *et al.* (1990) eingesetzt, sowie die beiden zusätzlichen Primer FIB und TAS, deren Sequenzen anhand bekannter Basenabfolgen bestimmt wurden.

Folgende Primer ( 5' Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoff IRD 800) wurden verwendet:

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>T<sub>A</sub> (°C)</u>
TAS	5' – CCG GCG ACT CGC GAG AAG TCC – 3'	67°C
FIB	5' – AAT GGC TTC GGG CGC AAC TTG – 3'	58°C
5.812	5' – GCC TGG GCG TCA CGC – 3'	58°C
5.811	5' – GTT GCC GAG AGT CGT – 3'	53°C
5.8SF	5' – ACG ACT CTC GGC AAC – 3'	53°C
5.8RF	5' – GCG TGA CGC CCA GGC – 3'	62°C

**2.1.4 DNA-Sequenzen aus der Genbank**

Folgende DNA-Sequenzen wurden aus den Gen-Banken NCBI bzw. EBI mit den angegebenen Gen-Bank Akzessionsnummern verwendet:

*Deschampsia cespitosa* (NCBI GenBank Akzessionsnummer L36513)

*Miscanthus sinensis* (EMBL MSI 426565)

*Poa pratensis* (NCBI GenBank Akzessionsnummer AY061956)

### 2.1.5 Primer für die RAPD-Analysen

Für die RAPD-Untersuchungen wurden die Primer y01 bis y20 aus dem Random Primer Kit Y der Firma Roth verwendet. Die Basensequenzen der Primer sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: RAPD-Primer

Primer	Basensequenz
Y 01	5' - GTG GCA TCT C '3
Y 02	5' - CAT CGC CGC A '3
Y 03	5' - ACA GCC TGC T '3
Y 04	5' - GGC TGC AAT G '3
Y 05	5' - GGC TGC GAC A '3
Y 06	5' - AAG GCT CAC C '3
Y 07	5' - AGA GCC GTC A '3
Y 08	5' - AGG CAG AGC A '3
Y 09	5' - AGC AGC GCA C '3
Y 10	5' - GAA ACG TGG G '3

Primer	Basensequenz
Y 11	5' - AGA CGA TGG G '3
Y 12	5' - AAG CCT GCG A '3
Y 13	5' - GGG TCT CGG T '3
Y 14	5' - GGT CGA TCT G '3
Y 15	5' - AGT CGC CCT T '3
Y 16	5' - GGG CCA ATG T '3
Y 17	5' - GAC GTG GTG A '3
Y 18	5' - GTG GAG TCA G '3
Y 19	5' - TGA GGG TCC C '3
Y 20	5' - AGC CGT GGA A '3

### 2.1.6 Chemikalien, Enzyme, Fluorochrome, Antikörper und „Kits“

Soweit es nicht anders erwähnt wird, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysenqualität und Biochemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet.

Agarose	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (2mg/ml)	Molecular Probes
Anti-Digoxigenin (100µg)	Roche, Penzberg
Biotin-Nick Translation Mix	Roche, Penzberg
Biotinylated Anti-Avidin D (0,5mg) produced in goat	Linaris, Wertheim
Biotherm-DNA-Polymerase und -Puffer	GeneCraft
Blockierungsreagenz (50g)	Roche, Penzberg
Cellulase “ onozuka r-10 “	Serva
Chloroform	Merck
Dextransulfat Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
DIG-Nick Translation Mix	Roche, Penzberg

DNA-Marker 100bp-Leiter von 100 bp bis 5Kbp	Diagonal
DNase I (100mg)	Roche, Penzberg
Formamid reinst. zur Analyse	Merck
Formamid deionisiert	Roth, Karlsruhe
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	MBI, Fermentas
Glycerin 87%	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Lambda DNA / <i>Hind</i> III Marker, 2	MBI, Fermentas
Paraformaldehyd	Merck
Pectinase von <i>Aspergillus niger</i>	Sigma oder Serva
Pectolyase y23	Sigma
Proteinase K (50µg/ml)	Roth, Karlsruhe
QIAquick™ PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden
Red-Taq™ -DNA-Polymerase	Sigma
RNase, DNase-free (500µg/ml)	Roche, Penzberg
Texas Red Avidin D (5mg)	Linaris, Wertheim
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle Sequencing kit	Amersham Pharmacia
tRNA aus <i>E. coli</i> (10mg/ml)	Roche, Penzberg
Tween-20	Merck
VECTASHIELD Hard-Set Mounting (10ml) Medium with DAPI	Vector Laboratories

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die verschiedenen Methoden verwendet:

#### 2.1.7.1 Karyologie

Carnoy'sches Fixierungsgemisch	Ethanol (96%) : Eisessig (100 %) im Verhältnis 3:1
Carmin-Färbung:	4g Karmin in 15ml H <sub>2</sub> O
	1ml HCl (konz.)
	95ml Ethanol (85%ig)

Essigsäure 45%ig

DAPI:	0,5µg DAPI pro 1 ml McIlvaine-Puffer
8-Hydroxychinolin-Lösung	0,002M
McIlvaine-Puffer (pH 7,0):	823,5ml Phosphatlösung (35,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /l) 176,5 ml Zitronensäurelösung (21,008g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O/l)

### 2.1.7.2 DNA-Sequenzierung und RAPD-Analysen

CTAB-Puffer (pH 8,0):	100mM Tris-HCl 1.4M NaCl 20mM EDTA 2% PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone, m.w. 40000) 2% CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)
Mercaptoethanol:	0,3% vor jeder Extraktion frisch dem CTAB-Puffer zugeben
Wasch-Puffer:	10mM Ammoniumacetat-Puffer 76% Ethanol
Resuspensionspuffer:	10mM Ammoniumacetat-Puffer 0.25mM EDTA
TE-Puffer (pH 8,0):	10mM Tris-HCl 1mM EDTA
Ammonium-Acetat-Puffer:	7.5M Ammoniumacetat
Puffer PB und PE	PCR Purification Kit
50 x Saltfree-Puffer (pH 8,0):	2M Tris 50mM EDTA 60ml/l Essigsäure (konz)
20 x TAE-Puffer (pH 8,3):	800mM Tris 40mM EDTA 400mM Na-Acetat
Blaumarker I:	60g/l Saccharose 0,75g/l EDTA 25mg/l Bromphenolblau



**2.1.7.3 Genomische *in situ*-Hybridisierung:**

20 x SSC:	3M NaCl 0.3M Natriumcitrat
10 x PBS (pH 7,5):	1.3M NaCl 70mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 30mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Paraformaldehyd (pH 7,5):	4% Paraformaldehyd in 2 x PBS
Proteinase-Puffer:	20mM Tris-HCl (pH 7,5) 2mM CaCl <sub>2</sub>
Tris-HCl (pH 7,5)	1M Tris mit HCl auf pH 7,5 einstellen
EDTA (pH 8,0):	0.5M EDTA
Natrium-Acetat (pH 5,2):	3M NaAc
Calciumchlorid:	1M CaCl <sub>2</sub>
Maleinsäure-Puffer (pH 7,5):	100mM Maleinsäure 150mM NaCl
10 x Blockierungslösung:	10% (w/v) Blockierungsreagenz in Maleinsäure-Puffer
Hybridisierungsmix/DS20%	4 x SSC 20% Dextransulfat
Lösung A / SF 50-Puffer:	2 x SSC 50% Formamid (pH 7,5)
Lösung B:	2x SSC bis 0,1 x SSC
Lösung C / Lösung 4T:	4 x SSC (pH 7,0) 0,05% (v/v) Tween-20
Blocking-Lösung BB:	3% BSA 0,1 % Tween-20 4 x SSC
TN-Puffer:	100mM Tris-HCl (pH 7,5) 150mM NaCl
TNT-Puffer:	100mM Tris-HCl (pH 7,5) 150mM NaCl 0,5ml Tween-20

---

TNB-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,5% Blocking reagent
Deionisiertes Formamid:	100%iges Formamid
Farblösung DAPI:	1µg DAPI pro ml Vectashield
5 x TBE-Puffer (pH 7,5):	89mM Tris 89mM Borsäure 2mM EDTA (0.5M; pH 8,0)
Gel-Ladepuffer 1:	0,5 x TBE 50% (v/v) Glycerin
Gel-Ladepuffer 2:	0,5 x TBE 50% (v/v) Glycerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
10 x DNase-Reaktionspuffer:	200mM Tris-HCl (pH 8,4) 20mM MgCl <sub>2</sub> 500mM KCl

## **2.2 Methoden**

Für die Untersuchung der Gattung *Aira* wurden verschiedene Methoden eingesetzt. So wurden die Arten z.T. morphologisch untersucht (Kapitel 2.2.1), um anhand einiger Charaktere eine Merkmalsmatrix erstellen zu können.

Weiterhin wurden die Arten der Gattung karyologisch (Kapitel 2.2.2) untersucht, um eine Zuordnung und einen Vergleich der Arten anhand ihres Karyotyps und Idiogrammes vornehmen zu können.

Molekulargenetische Analysen (Kapitel 2.2.3) sollten dazu beitragen, anhand der Divergenzen in der DNA mehr über die Verwandtschaftsverhältnisse der Arten zu erfahren. Dazu wurden Chloroplasten- und Kerngenom sequenziert, die Daten phylogenetisch ausgewertet und zusätzlich RAPD-Analysen durchgeführt.

Die Genomische *in situ*-Hybridisierung (Kapitel 2.2.4), als weitere verwendete Methode, eignete sich für die Erforschung der Genom-Homologie zwischen polyploiden Arten und ihren diploiden Ausgangsarten.

### **2.2.1 Morphologie**

Die Arten der Gattung *Aira* wurden morphologisch und z.T. anatomisch anhand von Lebendmaterial und Herbarbelegen untersucht. Grundsätzlich gilt, dass die verwendeten Merkmale eine gewisse Komplexität aufweisen sollten, damit mögliche Konvergenzen im Verlauf der Analyse erkannt werden können. Als morphologische Merkmale wurden das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Struktur innerhalb eines Taxons gewertet.

Nach Erstellen einer Merkmalsmatrix wurde mit Hilfe eines Außengruppenvergleichs mit der Art *Poa pratensis* eine kladistische Analyse durchgeführt. In dieser darf die Zahl der Merkmale nicht tiefer liegen als die Zahl der in die Untersuchung einbezogenen Taxa (RIEPEL 1999). So wurden 13 verfügbare morphologische Charaktere für die Analyse innerhalb der 12 zu untersuchenden Arten verwendet. Die phylogenetische Analyse erfolgte unter der Verwendung der Beta Version 4.0b10 von PAUP (SWOFFORD 2002). Innerhalb der *Maximum Parsimony* (MP)-Analyse wurden die *Branch and Bound*-Suchkriterien gewählt, da sich diese Analyse bei einer kleineren Taxa-Anzahl anbietet. Alle Charaktere wurden gleich gewichtet, d.h. in dieser Grundeinstellung zählt eine Veränderung in jedem dieser Merkmale immer als ein Schritt.

Die erhaltenen *Most parsimonious trees* (kurz: MPTs) wurden zu einem „50% Majority Rule Consensus Tree“ zusammengefasst, dessen Verlässlichkeit mit Hilfe einer *Bootstrap*-Analyse nach FELSENSTEIN (1985) überprüft wurde.

## **2.2.2 Karyologie und Verbreitung**

### **2.2.2.1 Darstellung der Chromosomen**

#### **2.2.2.1.1 Keimung**

Die karyologischen Untersuchungen fanden an Chromosomen des Wurzelspitzenmeristems von Keimlingen statt. Die Karyopsen wurden zur Keimung in Plastik-Petrischalen auf feuchtem Filterpapier ausgelegt und in einer feuchten Glas-Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Von Art zu Art verschieden erfolgte eine Keimung der Karyopsen nach 5-10, manchmal auch erst nach 14 Tagen. Die Keimlinge wurden geerntet, wenn sie eine ungefähre Größe von 1-2 cm erreicht hatten. Die Ernte erfolgte stets morgens in einem Zeitraum zwischen 8-10 Uhr, da aufgrund von Erfahrungswerten zu diesem Zeitpunkt die Mitosehäufigkeit am größten ist.

#### **2.2.2.1.2 Vorbereitung**

Das Wurzelspitzen-Material der geernteten Keimlinge wurde für ca. 4 Stunden bei 4°C im Kühlschrank in 8-Hydroxychinolin-Lösung (0,002M) eingelegt. Die Behandlung mit Hydroxychinolin unterbricht die mitotische Zellteilung der Zellen des Wurzelspitzenmeristems in der Metaphase und führt zu einer Anhäufung an Metaphase-Stadien. Normalerweise kann diese Vorbehandlung bei Raumtemperatur stattfinden. Da aber z.T. eine Verklumpung der Chromosomen auftrat, wurde dieser Schritt bei 4°C im Kühlschrank durchgeführt. Dies bewirkte eine Verbesserung der erhaltenen Präparate. Nach der Vorbehandlung wurde das Material bei 4°C für etwa 20-24h in ein Carnoysches Fixierungsgemisch überführt, welches aus Ethanol (96%) und Eisessig (100 %) im Verhältnis 3:1 besteht. Das Fixiermittel wurde mit 96%igem Ethanol ausgewaschen, da zurückbleibende Spuren für die anschließende Färbung von Nachteil sind, und das Material bis zur Färbung in 70%igen Ethanol aufbewahrt.

### 2.2.2.1.3 Karmin-Färbung nach SNOW (1963)

Die Färbung erfolgte mit einer abgewandelten Karmin-Färbung nach SNOW (1963). Hierfür läßt man 4g Karmin in 15ml H<sub>2</sub>O und 1ml HCl (konz.) 10 min. lang kochen. Nach dem Erkalten werden 95ml Ethanol (85%ig) hinzu gegeben und die Lösung filtriert.

Für die Durchführung der Färbung wurde das vorbereitete, fixierte Material für 24h in der Färbelösung im Wärmeschrank bei 60°C belassen. Nach der Färbung wurde die Karmin-Lösung entfernt und die Wurzelspitzen in 45%iger Essigsäure gespült. Einzelne Wurzelspitzen wurden auf einem Objektträger unter dem Binokular vom Rest der Keimwurzel getrennt, da das Material der Wurzelhaube und das an das Meristem angrenzende Differenzierungsgewebe für die Bestimmung unbrauchbar waren. Durch die Färbung war das Wurzelspitzenmeristem anhand des stark verdunkelten Endes gut zu erkennen.

Die so gewonnenen Wurzelspitzen wurden mit einem Tropfen Essigsäure (45%ig, CH<sub>3</sub>COOH) versetzt, mit einem Deckglas bedeckt und für eine Erhitzung kurz durch eine Bunsenbrennerflamme gefächert. Anschließend wurde mit einem Filztuch vorsichtig, aber stark gequetscht. Das erhaltene Präparat wurde unter dem Lichtmikroskop untersucht und bei einer 100-fachen Vergrößerung sowie einer 2-fachen Verstärkung gezeichnet.

### 2.2.2.2 Auswertung

Für die Untersuchung der Chromosomenmorphologie einer Art wurden in der Regel 10-25 gut gespreitete Metaphase-Platten mit einem Wild MPS 45 Fotoautomaten und einer Wild MPS 51 S Kamera unter Verwendung von Agfa Ortho 25 Professional Filmen fotografiert und mit einem Leitz Orthoplan unter Zuhilfenahme eines Zeichenspiegels gezeichnet.

Geht die Auswertung über das Feststellen der Chromosomenzahl hinaus, kann bei optimalen Metaphase-Platten der Karyotyp der Pflanze und ihr Idiogramm dargestellt werden.

Der Karyotyp stellt das lichtmikroskopische Erscheinungsbild der Chromosomen eines Genoms dar, d.h. die morphologischen Eigenschaften wie Anzahl, Größe, Kinetochorlage und SAT-Zonen, etc. sind erkennbar. Der Karyotyp ist somit das numerische und strukturelle Charakteristikum eines Individuums und kann für eine Art sehr charakteristisch sein. Er läßt sich fotografisch und zeichnerisch (mittels Zeichenspiegel) darstellen.

Für die Auswertung wurden die gezeichneten Chromosomen mit einem Lineal ausgemessen, die jeweiligen Chromosomenlängen in vorbereitete Listen eingetragen und in entsprechende  $\mu\text{m}$ -Längen umgerechnet sowie die Centromerposition (**cp**) bestimmt.

Daraufhin erfolgte die Zuordnung der homologen Chromosomen.

Die für die Analysen wichtigen Chromosomenlängen und -indices wurden tabellarisch erfaßt.

Folgende Daten mußten ermittelt werden:

1. Die Länge **t** jedes Chromosoms in  $\mu\text{m}$ , sowie die Längen **s** (Länge kurzer Arm) und **l** (Länge langer Arm) in  $\mu\text{m}$ .
2. Die Centromerposition **cp**, errechnet durch die Division des längeren Chromosomenarms **l** durch die Chromosomengesamtlänge **t**:  
$$\text{Centromerposition cp} = l / t \text{ (Werte immer zwischen 0,5 und 1)}$$
3. Die Gesamtlänge des Genoms **2n** in  $\mu\text{m}$ .
4. Die durchschnittliche Chromosomenlänge in  $\mu\text{m}$ .
5. Der Index der Karyotipsymmetrie, errechnet durch die Addition der Centromerpositionen **cp**, deren Mittelwert mit 100 multipliziert wird (ALBERS 1980b).

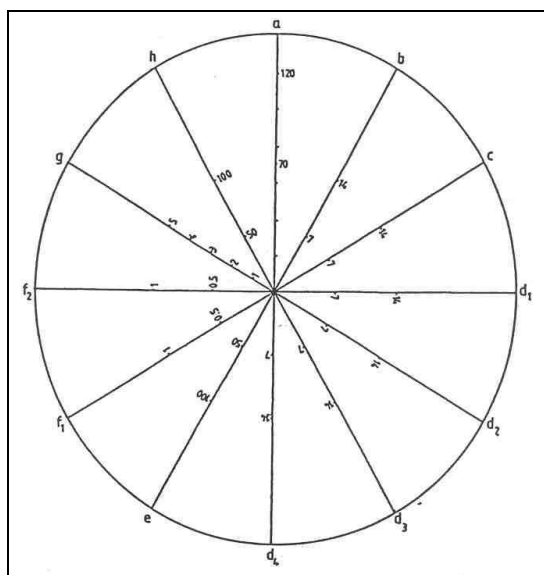
Für die Idiogramme wurden die homologen Chromosomenpaare zu einem Wert vereinigt (nach Mittelwertberechnung und Standardabweichung), und zusätzlich wurden folgende Werte vom jetzt haploiden Chromosomensatz ermittelt:

6. Die relativen Längen der Chromosomen, errechnet aus dem Prozentanteil des einzelnen Chromosoms von der Gesamtlänge des haploiden Satzes ( $n = 100\%$ ).
7. Der Satelliten-Index, errechnet aus dem Verhältnis des äußeren zum inneren Chromosomenabschnittes des jeweiligen Chromosomenarms.
8. Der Index der sekundären Einschnürung, der wie der Satelliten-Index berechnet wird.
9. Der Größengradient-Index, errechnet aus der Länge des kleinsten Chromosoms dividiert durch die Länge des größten Chromosoms, mit 100 multipliziert (WETSCHING 1983).

Für die Erstellung der Idiogramme wurde das folgende Prinzip gewählt:

Die Chromosomen werden insgesamt der Größe nach hintereinandergestellt, wobei der längere Chromosomenarm jeweils nach unten gerichtet ist und die Centromerpositionen auf einer Linie liegen. Zuerst kommen dabei die metacentrischen Chromosomen, dann erst die asymmetrischeren Chromosomen mit submedianer, subterminaler oder terminaler Centromerposition. Die Chromosomen, die Satelliten bzw. sekundäre Einschnürungen tragen, werden ihrer Größe und Centromerposition nach eingereiht, wobei die Satelliten und sekundären Einschnürungen jeweils nach oben gerichtet sind.

Die Darstellung der Karyotypen mit Hilfe von Karyopolygonen (Abb. 2.1), in denen die jeweils ermittelten Daten auf einer Kreisfläche angeordnet werden, ermöglicht einen schnellen Vergleich der Karyotypen (SAUER & HEUBL 1984).



- a = Länge des Chromosomensatzes (2n) in  $\mu\text{m}$
- b = Anzahl der Chromosomen (2n)
- c = Anzahl der nicht Sat.-Chromosomen
- d<sub>1</sub> = Anzahl der metacentrischen Chromosomen
- d<sub>2</sub> = Anzahl der submetacentrischen Chromosomen
- d<sub>3</sub> = Anzahl der subtelocentrischen Chromosomen
- d<sub>4</sub> = Anzahl der telocentrischen Chromosomen
- e = Index der Karyosymmetrie
- f<sub>1</sub> = Mittlere Größe des Satelliten in  $\mu\text{m}$
- f<sub>2</sub> = Satelliten-Index
- g = durchschnittliche Chromosomengröße in  $\mu\text{m}$
- h = Größengradient-Index

Abb. 2.1: Darstellung eines Karyopolygons (entnommen aus STEINERT 1988)

Die Bestimmung der Centromerpositionen sowie die Benennung der Chromosomen erfolgte nach dem dargestellten Schema (Abb. 2.2) von LEVAN *et al.* (1964).

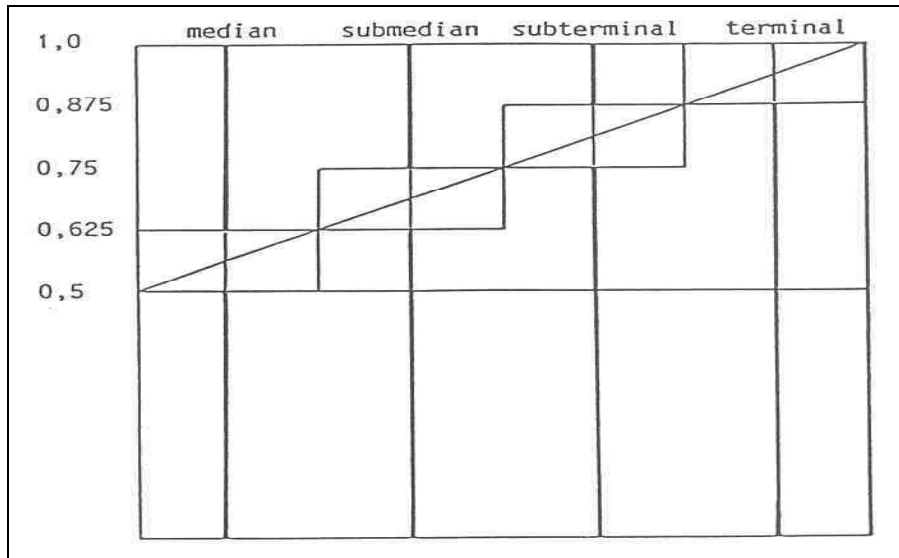


Abb. 2.2: Schema zur Centromerpositionenbestimmung nach LEVAN *et al.* (1964)

Basierend auf diesem Schema werden entsprechend der jeweiligen Centromerposition metacentrische (Centromerposition cp zwischen 0,5 und 0,625), submetacentrische (cp zwischen 0,625 und 0,75), subtelocentrische (cp zwischen 0,75 und 0,875) sowie telocentrische (cp zwischen 0,875 und 1,0) Chromosomen unterschieden, wobei die Centromerposition dementsprechend als median, submedian, subterminal bzw. terminal beschrieben wird.

### 2.2.2.3 DAPI

Neben der Karmin-Färbung nach SNOW (1963) wurde versuchsweise auch eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) zur Visualisierung der Kerne angewendet, um eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von Chromosomen zu erreichen.

Die Wurzelspitzen wurden wiederum morgens zwischen 8-10 Uhr geerntet und 4 Stunden in 8-Hydroxychinolinlösung aufbewahrt. Anschließend folgte eine Fixierung in einem Ethanol-Eisessig-Gemisch (Verhältnis 3:1) für mindestens 15 min., wodurch Membranen und Zellwände für den Farbstoff durchlässig gemacht werden. Darauf folgte ein Waschschriff von 15 min. in McIlvaine-Puffer (pH 7,0) zur Entfernung des Fixierungsgemisches. Die Färbung der Kerne erfolgte für 15 min. in einer DAPI-Lösung bei 30°C unter leichtem Schütteln,



gefolgt von einem erneuten 7-minütigen Bad in McIlvaine-Puffer zum Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs (BÜTTNER 1999).

Das Quetschen der Wurzelspitzen erfolgte wahlweise in McIlvaine-Puffer oder 45%iger Essigsäure. Zur längeren Aufbewahrung wurden die angefertigten Präparate mit Glycerin-Gelatine eingeschlossen.

#### **2.2.2.4 Verbreitung**

Die Informationen bezüglich der Verbreitung der Arten der Gattung *Aira* stammen aus den Arbeiten von ALBERS (1980b) und STEINERT (1988). Bereits vorhandene Karten, die das Verbreitungsgebiet einzelner Karyotypen oder aber auch der einzelnen Arten zeigen, wurden neu bearbeitet und zum Teil modifiziert. So können aus den entnommenen Daten zur Verbreitung, in Kombination mit den Informationen aus den karyologischen Untersuchungen, Hinweise über die Entwicklung der Karyotypen gezogen werden, die zum Verständnis des Verwandtschaftskomplexes beitragen.

### **2.2.3 Molekulargenetische Untersuchungen**

#### **2.2.3.1 DNA-Sequenzierung**

##### **2.2.3.1.1 Extraktion der pflanzlichen Gesamt-DNA**

Beginnend mit der DNA-Extraktion nach einem modifizierten CTAB-Protokoll von DOYLE & DOYLE (1987) wurde eine Isolierung der DNA aus der Pflanzenzelle erreicht.

Für jede Pflanze wurde 0,5-1,0 g Blattmaterial geerntet, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu einem feinem Pulver zermörsert. Jede Probe wurde in 5ml erwärmten CTAB-Puffer aufgenommen, welcher mit 0,3% Mercaptoethanol versetzt ist. Das Gemisch wurde für 30 min. in einem 60°C warmen Wasserbad inkubiert, wobei es alle 5 min. über einen Vortex geschüttelt wurde. Nach der Zugabe von 5ml Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) wurde die Probe zuerst sanft vermischt und anschließend bei 4000 U/min für 2 min. zur Verbesserung der Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in 1ml-Portionen abgezogen und die darin enthaltenen Nukleinsäuren wurden durch die Zugabe von 2/3 Volumen eiskaltem Isopropanol über Nacht zur Fällung gebracht. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 8000 U/min für 10 min. wurde der Überstand verworfen und das Pellet in

1ml Wasch-Puffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 15 000 U/min für 10 min., um das Pellet niederzuwirbeln. Dieses wurde nach der Lufttrocknung in 90µl Resuspensionspuffer aufgenommen, um es wieder in Lösung zu bringen. Weiterhin wurden zur Verdünnung 2 Volumenteile destilliertes Wasser und 1½ Volumen Ammonium-Acetat-Puffer zugefügt sowie für eine 20minütige Fällung 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol. Durch eine Zentrifugation bei 15 000 U/min für 10 min. wurde die DNA gefällt, der Überstand verworfen und das luftgetrocknete Pellet in 50-100µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

### **2.2.3.1.2 Gelelektrophorese zur DNA-Kontrolle**

Nach der Extraktion wurde mittels einer Gelelektrophorese nach Vorschrift von SAMBROOK *et al.* (1989) auf einem Agarose-Gel die DNA-Konzentration und die Qualität der DNA bestimmt. Bei dieser Gelelektrophorese durchwandern die Fragmente oder DNA-Teilstücke ein elektrisches Feld, wobei die kürzeren Fragmente rascher und weiter durch das Gel laufen als längere, und somit eine Auftrennung nach der Größe erfolgt. Diese Auftrennung der DNA erfolgte in 1-1,5%igen Agarose-Gelen mit Saltfree-Puffer.

Eine zu Vergleichszwecken mitlaufende Kontrollsubstanz (Lambda DNA / *Hind* III Marker, 2) gestattet unmittelbare Aussagen über die Kettenlängen der Proben. Nach dem Ende des Gellaufs wurde das Gel zum Anfärben der DNA-Banden für 5 - 15 min. in einem Ethidiumbromid-Färbe-Bad inkubiert, wodurch es zur Interkalierung des Ethidiumbromid in die DNA kommt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid, welches unter UV-Licht fluoresziert, wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Zur weiteren Dokumentation wurden die Gele fotografiert. Man kann durch diese Gele Aussagen über die Konzentration der DNA machen und abschätzen, wieviel DNA-Menge für die folgenden Schritte der PCR verwendet werden müssen.

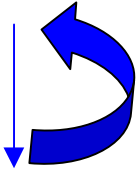
### **2.2.3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR/polymerase chain reaction)**

Die PCR (Polymerase Chain Reaction, dt.: Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Technik zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte und besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation.

Der Ansatz für eine PCR setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen, wobei jeweils auch die entsprechenden Mengenangaben angegeben sind:

10-50ng	genomische DNA
je 50ng	Primer 1 und 2
je 2mM	dNTPs (G,A,T,C)
1x	Reaktionspuffer
0,1 U	Taq-DNA Polymerase (Biotherm) oder Red-Taq-Polymerase (Sigma)
H <sub>2</sub> O	ad 50µl

Der allgemeiner Reaktionszyklus für das PCR-Programm PCR 53 sieht folgendermaßen aus:

1.	T= 95°C	2:15min	
2.	T= 95°C	1:00min	
3.	T= 53°C	1:00min	
4.	T= 72°C	2:00min	
5.	T= 72°C	5:00min	

bei 18°C halten bis zur weiteren Verarbeitung

Die Amplifikation und damit der Erfolg wurde mittels einer Gelelektrophorese in einem 1-2 % igen Agarose-Gel überprüft.

Dafür wurden 10µl PCR-Flüssigkeit in Kombination mit 5µl Gel-Ladepuffer<sup>1</sup> neben einem Größenstandard (Lambda DNA / *Hind* III Marker, <sup>2</sup>) aufgetragen, welches ca. 90 min. bei 100 Volt läuft. Das Gel wurde in einem Ethidiumbromid-Färbebad angefärbt und durch einen UV-Transilluminator ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) fotografiert.

#### 2.2.3.1.4 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte nach dem QIAquick PCR Purification Kit Protocol von QIAGEN. Dieses Protokoll ist bestimmt für die Reinigung von einzel- oder doppelsträngigen PCR-Produkten. Ein Volumen PCR-Reaktion wurde mit 5 Volumen des Puffers PB in einer QIAquick Spin-Säule vermischt, diese wurde in ein 2ml-Sammelröhrchen

gesetzt und 1 min. bei 15 000 U/min zentrifugiert, um die DNA zu binden. Für einen sich anschließenden Waschschriff wurde der Durchfluss verworfen und es wurden 750µl des Puffers PE hinzugefügt. Es wurde für 1 min. bei 15 000 U/min zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und es wurde erneut für 1 min. bei 15 000 U/min zentrifugiert. Die QIAquick Spin-Säule wurde in ein sauberes 1,5ml Tube gesetzt. Um die DNA zu erhalten, wurden 30µl steriles H<sub>2</sub>O in die Mitte der QIAquick-Säule pipettiert, die Probe für 15 min. bei Raumtemperatur belassen und anschließend für 4 min. bei 15 000 U/min zentrifugiert. Das durchschnittlich eluierte Volumen beträgt 28µl. Die gereinigten PCR-Produkte wurden direkt für die Sequenzierung eingesetzt.

### 2.2.3.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierungen nach SANGER *et al.* (1977) wurden mit dem Sequenzierungsautomaten DNA Sequencer model (4000 LI-COR) nach den entsprechenden Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es wurden fluoreszenzgekoppelte Primer sowie das *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* mit 7-deaza-dGTP (MWG-Biotech) verwendet.

In den folgenden Abbildungen 2.3 und 2.4 sind die jeweiligen Regionen im Chloroplasten- bzw. Kerngenom dargestellt, an denen sich die verwendeten Primer für die Amplifikation anheften.

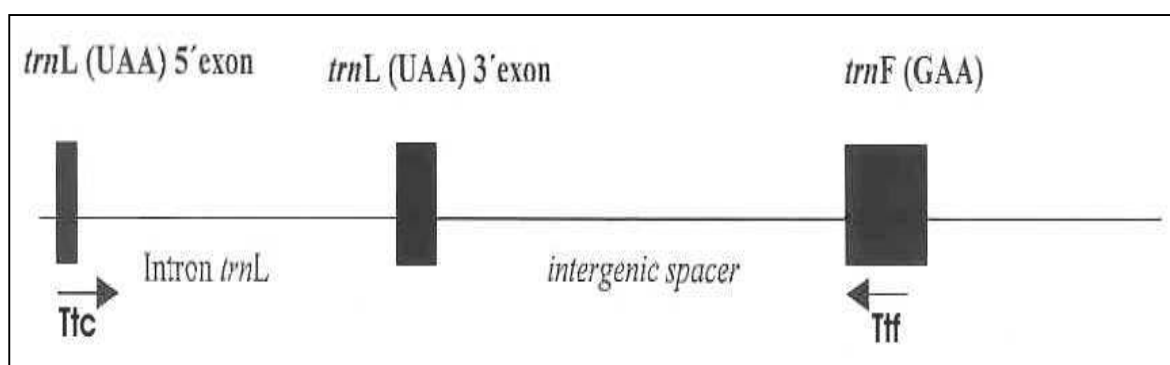


Abb. 2.3: *trnL-F* Region, bestehend aus dem *trnL*-Intron, dem *trnL* 3' Exon sowie der *intergenic spacer*-Region. Die Pfeile symbolisieren die Anheftungsstellen und die Verlängerungsrichtung der für die Amplifikation der *trnL-F* Region verwendeten Primer (nach TOULOUMENIDOU 2001).

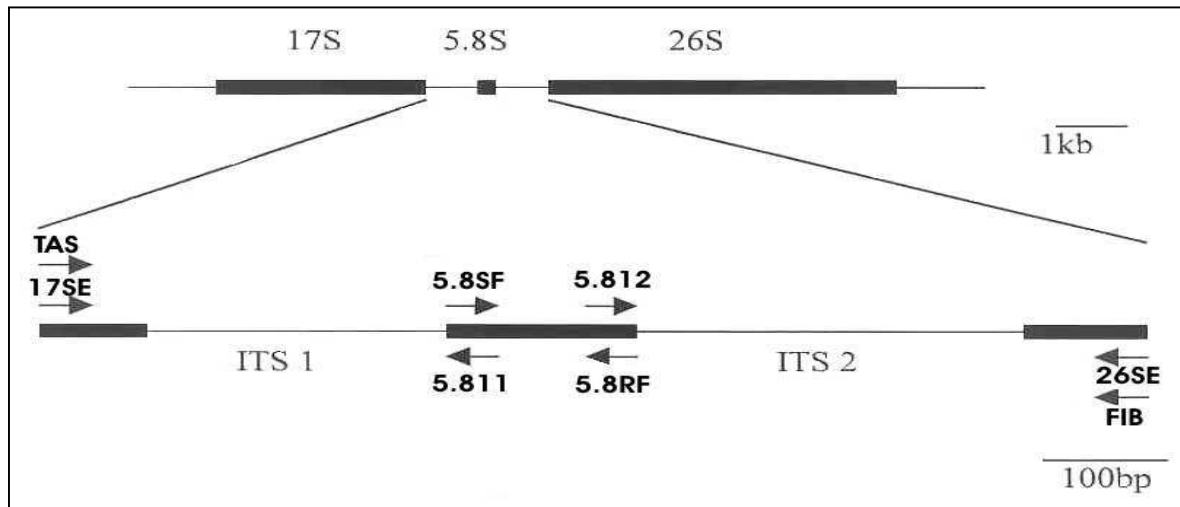


Abb. 2.4: Gesamt-ITS-Region bestehend aus ITS 1, 5.8S und ITS 2. Die Pfeile symbolisieren die Anheftungsstellen und die Verlängerungsrichtung der für die Amplifikation der ITS-Region verwendeten Primer (nach TOULOUMENIDOU 2001).

#### 2.2.3.1.6 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden nach dem *Sequencing* Manuskript von MWG-Biotech ausgewertet (TOULOUMENIDOU 2001). Die weitere Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Module EditSeq, MegAlign und SeqMan aus dem Computerprogramm LASERGENE™ (DNASTAR Madison, Wisconsin).

Dabei liegt folgende Kodierung für die Ko-Existenz von Basen vor:

N = A+C+T+G	W = A+T
R = A+G	H = A+T+C
Y = C+T	B = T+C+G
M = A+C	D = A+T+G
K = T+G	V = A+C+G
S = C+G	

### 2.2.3.2 Phylogenetische Analysen

Die phylogenetische Analyse erfolgte unter Verwendung der Beta Version 4.0b10 von PAUP (SWOFFORD 2002) sowie der Hilfe von HALL (2001).

#### 2.2.3.2.1 Alignierung der Sequenzen

Die Feststellung von Homologien der Merkmale bei den untersuchten Taxa erfolgt nach REMANE (1952) über den Grad der Merkmalsübereinstimmung, was nicht für einen gemeinsamen Ursprung der Arten sprechen muss. Nach AX (1988) sind homologe Merkmale als genetisch fixierte Merkmale zweier Arten definiert, die von einer gemeinsamen Stammart übernommen wurden und in ihrer Ausprägung geblieben sind.

Durch die Alignierung der Sequenzen wird die Anzahl potentieller phylogenetischer Informationen erkennbar. Die Durchführung beginnt mit der Suche nach Übereinstimmungen bei den Sequenzen, wobei dies mit den folgenden Kosten  $D$  (*costs*) verbunden ist:

$$D = s + wg, \quad \text{mit} \quad D: \text{Kosten}$$

s: Zahl der Substitutionen der Nukleotide  
g: Gesamte Länge aller Lücken (*gaps*)  
w: Wertigkeit der Lücken (*gaps*)

Lücken oder Gaps im Alignment sind nicht immer gleichzusetzen mit auf Mutationen basierenden Insertionen bzw. Deletionen, sondern können auch Artefakte darstellen (TOULOUMENIDOU 2001).

Die Sequenzen wurden mit dem Modul MegAlign von LASERGENE™ (DNASTAR Madison, Wisconsin) und der CLUSTAL Methode aligniert. So kommt es zu einem paarweisen Vergleich der Sequenzen, wobei Übereinstimmungsscores (*similarity scores*) zwischen den Sequenzen der Taxa mit möglichst niedrig gehaltenen Kosten gebildet werden. Die CLUSTAL Methode verwendet diese Übereinstimmungsscores für die Erstellung von Dendrogrammen.

Nach der Alignierung der Sequenzen wurden „unzuverlässige“ Regionen der Sequenzen aus der phylogenetischen Analyse entfernt (TOULOUMENIDOU 2001). Obwohl die Kriterien für das Entfernen solcher Regionen häufig subjektiv sind, sind sie dennoch unbedingt erforderlich, da diese Regionen in der Analyse falsche Informationen liefern könnten (GATESY *et al.* 1993).

### 2.2.3.2.2 Kladistische Methoden

Die kladistische Auswertung der durch die Sequenzierung gewonnenen Daten erfolgte nach der von HENNIG (1950) vorgeschlagenen Methode für die Rekonstruktion von Stammbäumen, der die Suche und die Feststellung des sogenannten Schwestertaxon für ein bestimmtes Taxon zugrunde liegt. Neu zu klassifizierende Taxa werden mit einer ursprünglichen Stammart verglichen und anhand der kladistischen Kriterien zugeordnet, da man annimmt, dass sich neue Merkmale durch die Prozesse der Mutation und Selektion entwickelt haben.

HENNIG hat einen Außengruppenvergleich (*outroup comparison*) vorgeschlagen, bei dem die Untersuchungsgruppe (*ingroup*) apomorphe Merkmalsausprägungen zeigt, während die nicht zur Untersuchungsgruppe gehörenden Verwandten die *outgroup* bilden und plesiomorphe Merkmalsausprägungen aufweisen.

Man unterscheidet in der Kladistik diskrete Verfahren und Distanzverfahren. Die diskreten Verfahren operieren direkt mit den Sequenzdaten und können dadurch Informationen nutzen, die bei der Konvertierung zu Distanzdaten verloren gehen können. Man unterscheidet dabei die zwei Hauptmethoden *Maximum Parsimony* (MP) und *Maximum Likelihood* (ML), von denen die erste für die phylogenetische Rekonstruktion bevorzugt wird.

Bei der *Maximum Parsimony*-Methode wird als Kriterium das sogenannte „sparsamste“ Kriterium verwendet, d.h. die Hypothese, dass die kleinste nötige Zahl an Veränderungen die wahrscheinlichste ist. Es wird der Baum gewählt, der die wenigsten evolutiven Schritte benötigt, indem jedes informative, individuelle Merkmal verglichen wird. Somit wird durch Betrachtung der Basenpositionen der Stammbaum mit den wenigsten Substitutionen für die Basenposition gesucht (TOULOU MENIDOU 2001).

Aufgrund der relativ großen Daten-Matrix war eine „heuristische“ Suche nach einem lokalen Sparsamkeitsmaximum (*local optimum*) erforderlich (RIEPEL 1999). Es wurde das *branch-swapping by „tree bisection and reconnection“* (TBR) mit 100 oder 1000 Replikaten und den Einstellungen: MULPARS, MULTREES und ACCTRAN-*Optimization* verwendet und eine „ungewichtete“ *Parsimony*-Analyse durchgeführt, was besagt, dass alle Charaktere gleich gewichtet wurden. Weiterhin waren alle Charaktere (Nukleotid-Positionen) „*unordered*“, d.h. jede Transformation des Charakters „kostet“ die gleiche Anzahl an Evolutionsschritten.

Die durch die Alignierung entstandenen Gaps wurden als nicht vorhandene Werte (*missing data*) berechnet.

Die Analyse der Datenmatrix resultierte in mehreren gleichermaßen sparsamen Kladogrammen (*Most Parsimonious Trees* / MPTs), von denen jedes eine mögliche phylogenetische Hypothese darstellt. Zur Vereinfachung der Darstellung dieses Kenntnisstandes wurden verschiedene Consensus-Methoden entwickelt (RIEPEL 1999), so dass man anhand des strikten Consensus („*strict consensus tree*“) oder des semistrikten Consensus („*semistrict consensus tree*“) eine Summation oder eine Art Mittelwert aller möglichen phylogenetischen Hypothesen vornehmen kann. Diejenigen Gabelpunkte, die in allen gleich sparsamen Kladogrammen in gleicher Weise bestimmt sind, werden auch im strikten Consensus-Schema eindeutig bestimmt (RIEPEL 1999). Eine weitere Consensus-Methode ist jene der „50%-igen Mehrheitsregel“ (*50% majority rule consensus tree*), bei der bewertet wird, wie oft welche der alternativen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb aller möglichen Kladogramme auftreten. Die Wahl der „50%-igen Mehrheitsregel“ resultiert in einem Consensus-Schema, das einen höheren Grad an Auflösung und somit eine verringerte Anzahl von Polytomien aufweist.

Die Verlässlichkeit dieses Baums wurde durch statistische Programme anhand der *Bootstrap*- (FELSENSTEIN 1985) oder der *JackKnife*-Methode (FARRIS *et al.* 1996) überprüft. Der *Bootstrap*-Baum wurde als *50% majority rule consensus tree* ausgegeben und zeigte an, mit welcher Frequenz eine bestimmte Verzweigung in allen *Bootstrap*-Bäumen vorkommt. Für die Bewertung des Baumes gilt folgendes: liegen die *Bootstrap*-Werte unter 50%, wird die Gruppierung nicht unterstützt. Bei Werten zwischen 50-74% erfolgt eine schwache, zwischen 75-84% eine mäßige und zwischen 85-100% eine starke Unterstützung der Gruppierung.

Die *JackKnife*-Methode ist ein Eliminierungstest (=Jackknifing) und stellt eine Alternative zu der *Bootstrap*-Methode dar, die bei einem umfangreichen Datensatz manchmal nicht durchführbar ist. Aus dem Original-Datensatz wird ein Pseudoreplikat konstruiert, welches nur aus einem gewissen Prozentsatz der Merkmale besteht. Die Wahrscheinlichkeit für die Eliminierung eines Merkmals darf nicht zu hoch sein, da es sonst keine sinnvolle Beziehung zwischen stützenden Merkmalen und der Frequenz von wiedergefundenen Artgruppen gibt (<http://www.webdoc.sub.gwdg.de/diss/2001/Kierstein>). Bei der Betrachtung der Bäume gilt, dass nur Werte über 63% für eine Gruppierung relevant sind.



Die *Maximum Likelihood* (ML)-Methode stellt die Suche nach der größten Wahrscheinlichkeit dar, mit der die beobachteten Daten mit einem bestimmten Modell zu erklären sind. Unterschiedliche Modelle machen die beobachteten Daten mehr oder weniger wahrscheinlich und in Kombination mit dem Programm MODELTEST (POSADA & CRANDALL 1998) werden verschiedene Modelle auf ihre Wahrscheinlichkeit hin getestet.

Auf der Grundlage eines formulierten Modells der Sequenzevolution in der Untersuchungsgruppe wird die Baumtopologie errechnet, welche die beobachtete Sequenzvariation mit der größten Wahrscheinlichkeit (*maximum likelihood*) erklärt (HUELSENBECK & CRANDALL 1997).

Für die Durchführung der ML-Analyse wurden die Programme MACCLADE 3.0 (MADISSON & MADISSON 1992) sowie MODELTEST Version 3.06 (POSADA & CRANDALL 1998) verwendet, wobei MODELTEST das Evolutionsmodell für die ML-Analyse vorschlägt. Die Einstellungen für die heuristische Suche waren gleich denen der MP-Analyse. Die Verlässlichkeit der Gruppierung wurde wiederum durch die *Bootstrap*- oder *JackKnife*-Methode überprüft.

Die Verwendung der *Maximum Parsimony* (MP)- sowie der *Maximum Likelihood* (ML)-Analyse liefert oft sehr ähnliche Ergebnisse, so dass der beste Stammbaum bei *Parsimony* häufig den besten *likelihood*-Wert besitzt (TOULOU MENIDOU 2001).

### 2.2.3.3 RAPD-Untersuchungen

Die RAPD- (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) PCR-Methode basiert auf einer PCR-Reaktion, bei der als Primer kurze, meist 10 Basenpaare (bp) lange DNA-Stücke mit definierten, aber zufällig gewählten Sequenzen verwendet werden. So werden Segmente der DNA amplifiziert, die im Grunde genommen unbekannt (= random) sind.

#### 2.2.3.3.1 RAPD-PCR

Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug insgesamt 25µl und setzte sich aus folgenden Komponenten des Mastermixes sowie der am Ende zugefügten 0,5µl genomischen DNA zusammen:

Mastermix pro Probe:

3,0	µl Primer
12,3	µl H <sub>2</sub> O
2,5	µl Biotherm-Puffer
2,5	µl Nucleotide
	(200µl-Portion aus 4µl G + µl A + 4µl T + 4µl C + 184µl H <sub>2</sub> O)
4,0	µl MgCl <sub>2</sub>
0,2	µl Biotherm-Polymerase
-----	
24,5	µl

Zu diesen 24,5µl des Mastermixes wurden 0,5µl genomische DNA der entsprechenden Art zugefügt, so dass man ein Volumen von 25µl erhalten hat.

Die vorbereiteten Ansätze liefen im Thermocycler mit dem Programm RAPD 40 ab.

Dieses Programm begann mit einer allgemeinen Denaturierung bei 94°C für 3 min., um die DNA in ihre Einzelstränge aufzutrennen.

Dann folgten 44 Amplifikationszyklen, die sich jeweils aus den folgenden drei Schritten zusammensetzen:

1. Denaturierungsschritt (Auftrennung): 94°C für 1 min.
2. Annealing (Primer-Anlagerung): 40°C für 1 min.
3. Elongation (Verlängerung/Extension): 72°C für 2 min.

Zum Abschluss der PCR folgte ein weiterer Schritt bei 72°C für 7 min., der ebenfalls der Elongation oder Extension dient.

Am Ende wurden die Proben bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gehalten.

**2.2.3.3.2 DNA-Gelelektrophorese**

Nach der PCR-Reaktion wurde der Erfolg der Amplifikation durch eine elektrophoretische Auftrennung über ein 2%iges Agarose-Gel in TAE-Puffer überprüft, welches bei 60V ca. 5 Stunden läuft. Die Amplifikation von DNA-Segmenten in RAPD-Reaktionen kommt nur

dann zustande, wenn der Primer an beiden Enden des Segmentes an entgegengesetzten DNA-Strängen bindet.

Für die Gelelektrophorese wurden 5µl PCR-DNA in Kombination mit 5µl Gel-Ladepuffer 1 neben einem Größenstandard (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus bzw. DNA-Marker 100bp-Leiter von 100 bp bis 5Kbp) aufgetragen.

Das Gel wurde in einem Ethidiumbromid-Färbebad angefärbt, zum Abspülen des überschüssigen Ethidiumbromids einige Zeit in frischem Wasser belassen und letztendlich über einen UV-Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht und fotografiert.

Zusätzlich wurden die Agarose-Gele über eine LISCAP-Apparatur eingescannt und auf dem Rechner abgespeichert, damit sie einer späteren Bearbeitung zur Verfügung stehen.

#### **2.2.3.3.3 Daten-Analyse**

Die Auswertung und Analyse der Amplifikationsprodukte wurde manuell vorgenommen. Dabei wurden die folgenden Kriterien betrachtet (SPIES 2004):

1. Die Anzahl der Fragmente
2. An- bzw. Abwesenheit der Marker
3. Die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit der Reaktion

Die Fotos der Gele wurden für die Auswertung der Daten der RAPD-Analyse verwendet, und die DNA-Fragment-Größen wurden mit dem DNA-Größenmarker, der auf dem selben Gel mitläuft, verglichen (LI *et al.* 1999). Die Banden wurden mit „1“ bewertet für ihre Anwesenheit und mit „0“ für ihre Abwesenheit in jeder DNA-Probe, um somit eine binäre Daten-Matrix zu erstellen (LI *et al.* 1999).

Ausgewertet wurden nur deutlich differenzierte Fragmente oder Banden, die bei einigen Arten ausgebildet sind und bei anderen nicht. Um die Reproduzierbarkeit der RAPD-Methode zu gewährleisten, muss die DNA-Konzentration mit Sorgfalt ausgewählt werden, da zuviel DNA zu verschmierten Bandenmustern führen kann, während zu wenig DNA zu unreproduzierbaren Ergebnissen führt (MÜLHARDT 2000).

Die Daten aus der binären Matrix wurden mit Hilfe der Beta Version 4.0b10 von PAUP (SWOFFORD 2002) ausgewertet. Aufgrund der relativ großen Daten-Matrix wurden die *heuristic search*-Suchkriterien gewählt (RIEPEL 1999). Die nach der *Maximum Parsimony*-

Methode entstandenen *Most Parsimonious Trees* (MPT) wurden zu einem Strikt-Consensus Baum vereinigt, dessen Verlässlichkeit durch statistische Programme anhand der *Bootstrap*-Methode (FELSENSTEIN 1985) und der *JackKnife*-Methode (FARRIS *et al.* 1996) überprüft wurde.

Bei *Bootstrap*-Werten unter 50% wird die Gruppierung nicht unterstützt: Bei Werten zwischen 50-74% erfolgt eine schwache, bei Werten zwischen 75-84% eine mäßige und bei Werten zwischen 85-100% eine starke Unterstützung der Gruppierung.

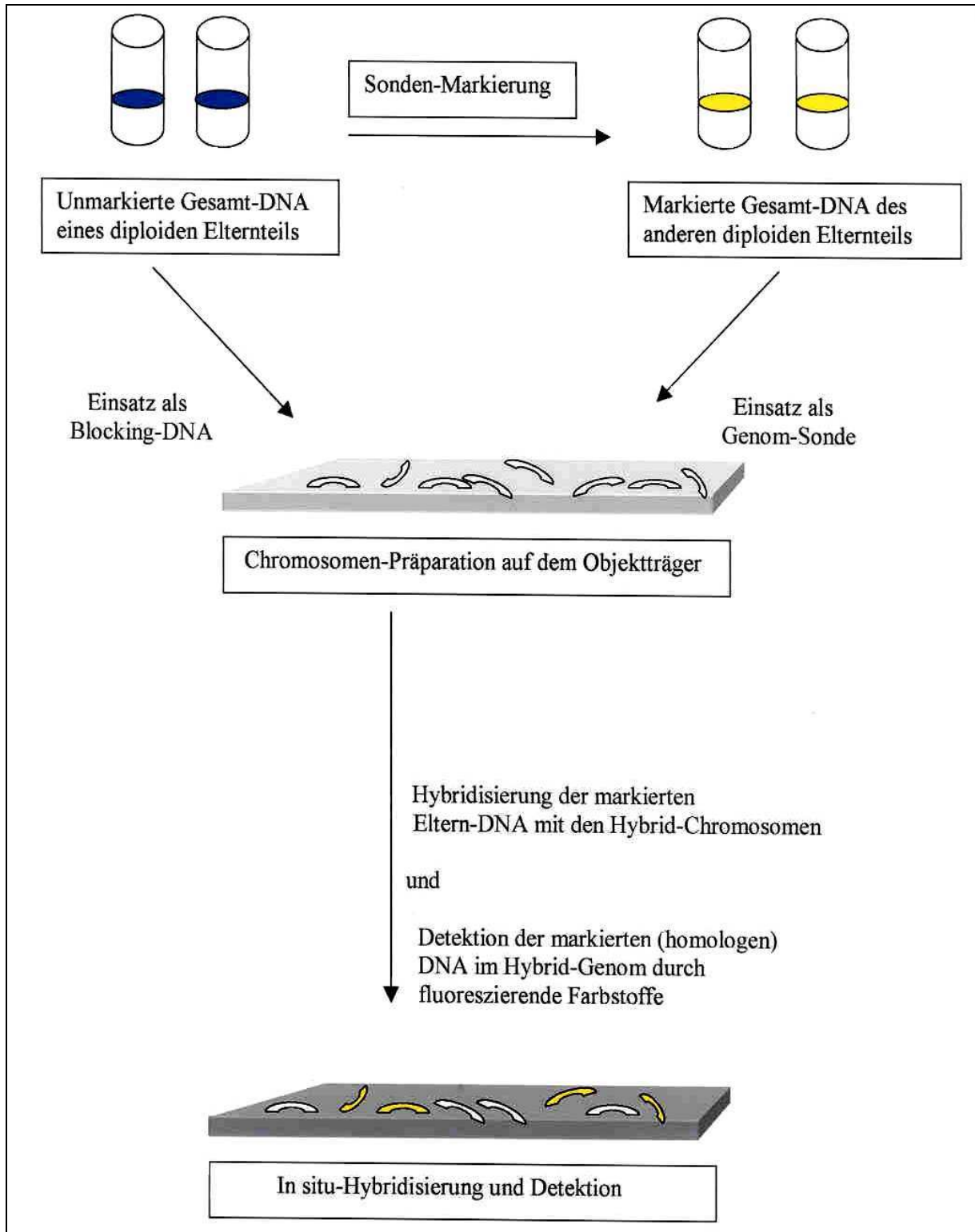
Bei der *JackKnife*-Methode sind nur Werte über 63% für eine Gruppierung relevant.

#### **2.2.4 Genomische *in situ*-Hybridisierung**

Die Methode der Genomischen *in situ*-Hybridisierung, kurz GISH, wurde mir durch die freundliche Unterstützung des Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben unter der Betreuung von Dr. Jörg Fuchs aus der Abteilung Cytogenetik von Prof. Dr. I. Schubert weitergegeben. Die meisten Angaben aus dem Protokoll basieren auf Anleitungen von Dr. Jörg Fuchs (FUCHS & SCHUBERT 1995; FUCHS *et al.* 1998). Die Anweisungen für die Chromosomen-Präparation sowie für die Herstellung der Sonden, der *In situ*-Hybridisierung und Detektion sind in vollständiger Form im Anhang als Protokoll (Kapitel 7.2) aufgeführt, so dass an dieser Stelle nur wesentliche Punkte der Methodik aufgeführt sind.

Für ein besseres Verständnis der Arbeitsabläufe wird in einem kleinen Schema (Abb. 2.5, verändert nach PAETSCH 2000) der grobe Ablauf der Methode verdeutlicht.

Nach diesem Grund-Prinzip der GISH zur Detektion parentaler Genombestandteile in einem Hybrid-Genom wurde in dieser Arbeit verfahren.

Abb. 2.5: Prinzip der Genomischen *in situ*-Hybridisierung (verändert nach PAETSCH 2000)

#### 2.2.4.1 Anzucht, Ernte und Vorbereitung der Keimlinge

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte durch Auslegen der Karyopsen von den tetraploiden Arten *A. caryophylla* und *A. multiculmis* auf feuchtem Filterpapier in Plastik-Petrischalen, die in einer feuchten Glas-Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Für die Durchführung von Negativ-Kontrollen wurde Samenmaterial der diploiden Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei*, *A. cupaniana* und *A. praecox* ausgesät.

Die Ernte erfolgte nach 5-10 Tagen morgens zwischen 8.00 Uhr bis spätestens 10.00 Uhr, sobald die Keimlinge ca. 1-2 cm groß waren. Die Keimungsrate der Karyopsen lag in den meisten Fällen bei über 50 %, wodurch eine hohe Ausbeute an verwendbarem Wurzelmaterial erhalten wurde.

Die Keimlinge wurden als Ganzes mit 8-Hydroxychinolin behandelt und für 4 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Derselbe Schritt bei Raumtemperatur hatte zu einer Verklumpung der Chromosomen geführt.

Anschließend erfolgte eine Fixierung der Keimlinge für 20-24 Stunden bei 4°C im Carnoyschen Fixierungsgemisch bestehend aus Ethanol : Eisessig im Verhältnis 3:1. Nach dem Auswaschen des Fixierungsgemisches mit 96%igem Ethanol wurden die fixierten Keimlinge in 70%igem Ethanol bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.2 Enzymbehandlung der Keimlinge

Die Wurzelspitzen wurden 30 min. in 0,01M Natrium-Citrat-Puffer gewaschen. Eine längere Einwirkzeit des Puffers hat im weiteren Verlauf zu einer schnelleren Auflösung der Gewebestrukturen geführt.

Für den anschließenden Enzymverdau gilt, dass sowohl die Verdauungszeiten als auch die Enzymkonzentrationen variabel sind. So wurden Tests durchgeführt, die dem Auffinden der besten Enzymmischung aus den drei Komponenten Pectolyase y23 (Sigma), Pectinase von *Aspergillus niger* (Sigma) und Cellulase „Onozuka r-10 (Serva) sowie der optimalen Zeit dienen sollten. Drei verschiedene Lösungen (in 0,01M Natrium-Citrat-Puffer angesetzt) wurden getestet, die sich folgendermaßen zusammensetzten (Tab. 2.3):

Tabelle 2.3: Verschiedene Lösungen für Enzymverdau

Lösung A	Lösung B	Lösung C
2,5% Pectolyase	2,5% Pectinase	1% Pectinase
2,5% Pectinase	2,5% Cellulase	4% Cellulase
2,5% Cellulase		

Nur die Verwendung von Lösung A hat einen ausreichenden Enzymverdau bewirkt und eine zufriedenstellende Quetschung der Wurzelspitzen ermöglicht. Die beiden anderen Enzym-Lösungen haben zu einer ungenügenden Aufweichung des Gewebes geführt, wodurch eine Quetschung der Wurzelspitzen nahezu unmöglich wurde.

Bezüglich der optimalen Inkubationszeit der Enzymlösung haben Versuche zwischen 10-30 min. deutlich gemacht, dass eine zu lange Einwirkzeit sehr schnell das Gewebe komplett auflösen kann. Durch einen Verdau der Proben für 10 min. bei Raumtemperatur in der Lösung A konnten die besten Ergebnisse bei einer Quetschung erzielt werden.

Die weitere Bearbeitung der Keimlinge hin zur Herstellung der Chromosomen-Quetsch-Präparate sowie deren Waschschrte und Enzymbehandlungen zur Vorbereitung der Hybridisierung ist dem Protokoll im Anhang (7.2) zu entnehmen.

#### 2.2.4.3 Blattmaterial für Genom-Sonden und Blocking-DNA

Für die Herstellung der zu markierenden Sonden und der Blocking-DNA wurde 0,5-1,0g in Silica-Gel getrocknetes Blattmaterial der diploiden Arten *A. praecox*, *A. elegantissima*, *A. cupaniana* und *A. tenorei* geerntet. Eine Isolation der Gesamt-DNA erfolgte nach einem veränderten Protokoll von DOYLE & DOYLE (1987).

Die extrahierte DNA wurde mit 100µl TE-Puffer versetzt und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die DNA-Konzentration sowie der Reinheitsgrad des extrahierten DNA-Materials wurde über eine photometrische Messung mit Hilfe eines Eppendorf Photometer bestimmt (Tab. 2.4).

Tabelle 2.4: Photometrische Daten der eingesetzten Arten

Art	DNA-Gehalt (in ng/ $\mu$ l)	Art	DNA-Gehalt (in ng/ $\mu$ l)
A. praecox 1	2454,3	A. cupaniana 54	1326,7
A. praecox 17	216,9	A. cupaniana 31	80,1
A. praecox 15	2192,5	A. cupaniana 68	1239,3
A. elegantissima 4	819,6	A. tenorei 62	1928,6
A. elegantissima 32	805,4	A. tenorei 65	24,9
A. elegantissima 11	403,0	A. tenorei 63	1342,3

Die erhaltenen Werte wurden zusätzlich über eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das Agarose-Gel (Abb. 2.6) wurde nach Ablauf für 15 min. in Ethidiumbromid angefärbt und anschließend unter UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht (PAETSCH 2000).

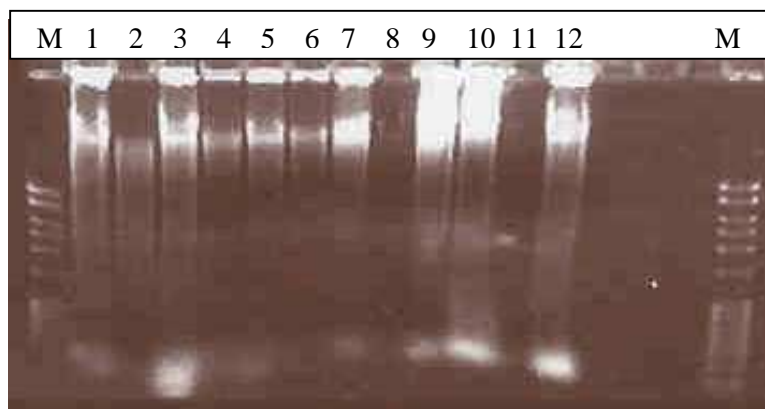


Abb. 2.6: Agarose-Gel zur DNA-Kontrolle

M = DNA-Marker 100bp-Leiter von 100bp bis 5 Kbp (Diagonal)	
Spur 1: <i>A. praecox</i> 1;	Spur 2: <i>A. praecox</i> 17;
Spur 3: <i>A. praecox</i> 15;	Spur 4: <i>A. elegantissima</i> 4;
Spur 5: <i>A. elegantissima</i> 32;	Spur 6: <i>A. elegantissima</i> 11;
Spur 7: <i>A. cupaniana</i> 54;	Spur 8: <i>A. cupaniana</i> 31;
Spur 9: <i>A. cupaniana</i> 68;	Spur 10: <i>A. tenorei</i> 62;
Spur 11: <i>A. tenorei</i> 65;	Spur 12: <i>A. tenorei</i> 63;



Um für die nachfolgenden Prozesse die störende RNA zu entfernen, wurde die DNA jeweils mit dem Enzym RNase behandelt. Entsprechende Nachweise über den Erfolg der RNase-Behandlung wurden über Agarose-Gele wie in der Abb. 2.7 dokumentiert.

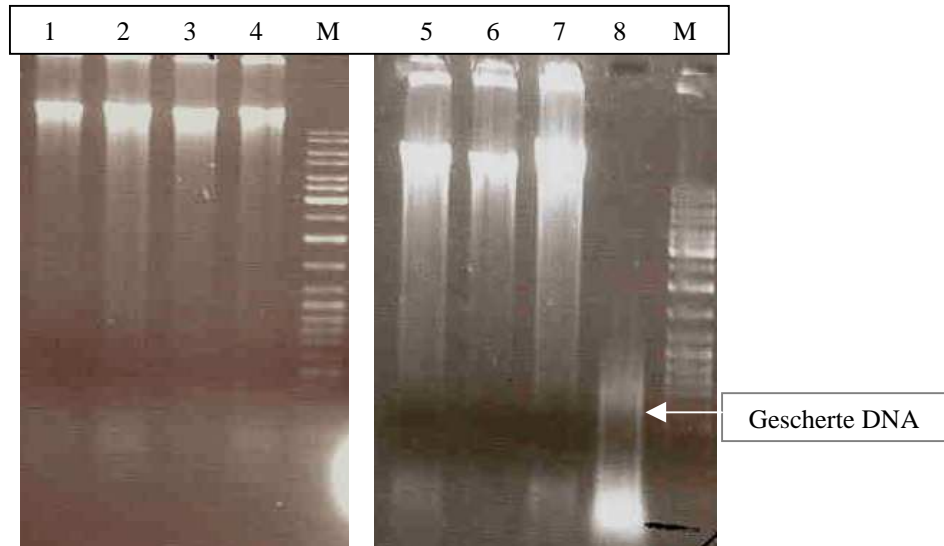


Abb. 2.7: Agarose-Gel zur Kontrolle des RNA-Abbaus mittels RNase

M = Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100-10000bp (Fermentas)  
 Spur 1: *A. cupaniana* 68; Spur 2: *A. elegantissima* 4;  
 Spur 3: *A. praecox* 1; Spur 4: *A. tenorei* 63;  
 Spur 5: *A. elegantissima* 32; Spur 6: *A. praecox* 15;  
 Spur 7: *A. tenorei* 62;  
 Spur 8: *A. elegantissima* 4;  
 (bereits geschert über Ultraschall, aber ohne RNase-Behandlung)

#### 2.2.4.3.1 Markierung der Sonden-DNA

Die Markierung der Sonden wurde hauptsächlich über die Methode der Nick-Translation mit dem Biotin- bzw. Digoxigenin-„Nick Translation Mix für *in situ* Sonden“ (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die verwendeten fertigen Reaktionsgemische enthalten neben den markierten Nukleotiden auch die Enzyme DNA-Polymerase I und DNase I aus *E. coli*, welche das Einfügen der *nicks* katalysieren und die DNA sowohl markieren als auch fragmentieren. Eine vorhergehende Denaturierung und Scherung ist nicht notwendig, da die erforderliche einheitliche Fragmentlänge mit einer maximalen Größenverteilung im Bereich zwischen 200 und 500 Nukleotiden erreicht wird.

Versuchsweise wurde auch die Variante einer Markierung mit Einzelkomponenten durchgeführt. Das Pipettierschema ist der Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.5: Markierung mit Einzelkomponenten

	<i>Apraecox</i> <sup>Bio</sup>	<i>Aelegantissima</i> <sup>Dig</sup>	<i>Atenorei</i> <sup>Bio</sup>	<i>Acupaniana</i> <sup>Dig</sup>
DNA	3µl	3µl	5µl	4µl
NT-Puffer	5µl	5µl	5µl	5µl
β-Mercaptoethanol	5µl	5µl	5µl	5µl
dNTP-Mix	5µl	5µl	5µl	5µl
dUTP-Mix (Bio oder Dig)	3µl	3µl	3µl	3µl
H <sub>2</sub> O	25,5µl	25,4µl	23,5µl	24,4µl
DNase (1:250)	2,5µl	2,6µl	2,5µl	2,6µl
Polymerase	1µl	1µl	1µl	1µl
Gesamtvolumen	50µl	50µl	50µl	50µl

Der Erfolg jeder Markierungsreaktion wurde über ein entsprechendes Agarose-Gel (Abb. 2.8) getestet. In der dargestellten Abbildung besitzen die markierten Arten eine Fragmentlänge unterhalb der optimalen 500 bp. Die Inkubationszeit der Markierungsreaktion bei 15°C war in diesem Fall zu lang.

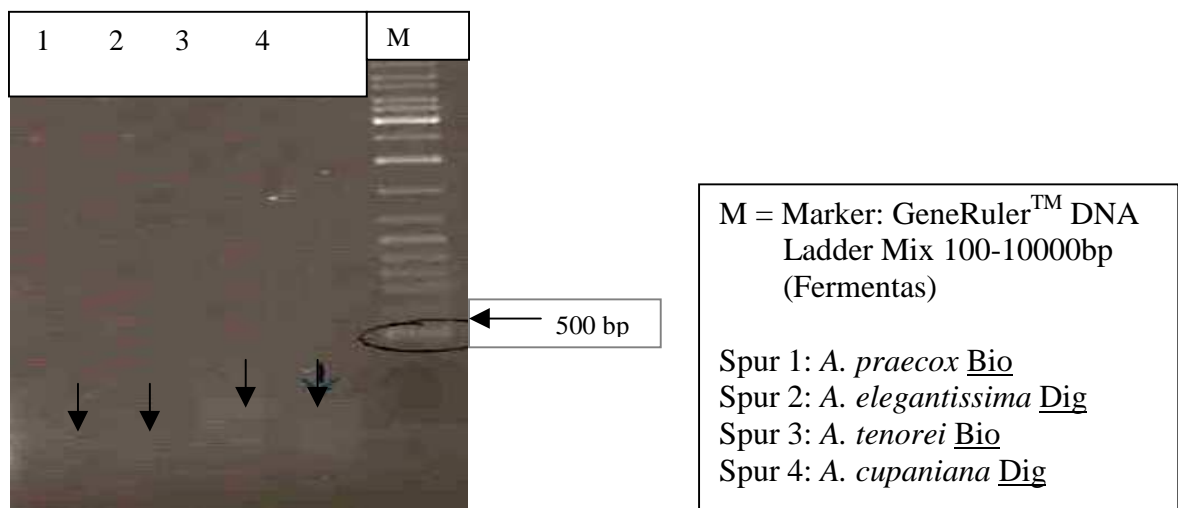


Abb. 2.8: Agarose-Gel zur Überprüfung der Markierung

Die weitere umfangreiche Bearbeitung der Sonden-DNA ist dem Protokoll im Anhang zu entnehmen.

### 2.2.4.3.2 Blocking-DNA

Nicht nur die Sonden für die Chromosomen-Präparate, sondern auch die Blocking-DNA-Proben mußten eine Fragment-Länge von 200-500 bp aufweisen. Aus diesem Grund wurde das DNA-Material durch Ultraschall-Fragmentierung mit einem Sonicierer oder alternativ mit Hilfe des Enzyms DNase I zerkleinert. Entsprechende Vortests zur Enzymkonzentration und –menge sowie zur Inkubationszeit sind im Protokoll im Anhang aufgeführt.

Anhand einer Agarose-Gelelektrophorese konnte das Ergebnis überprüft werden (Abb. 2.9).

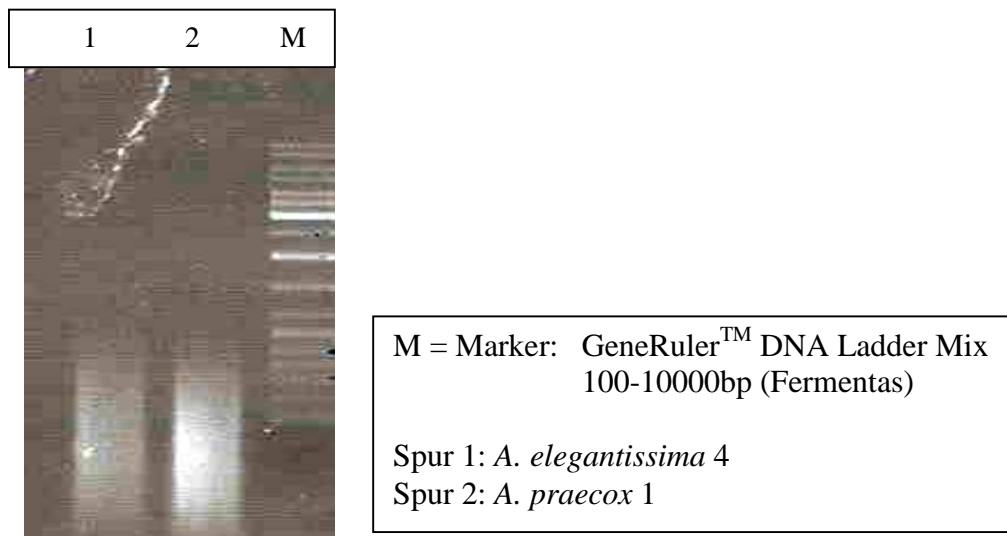


Abb. 2.9: Agarose-Gel zur Überprüfung der Scherung der DNA

### 2.2.4.4 Hybridisierung und Detektion

Vor der Hybridisierung mußten die Objektträger mit der jeweiligen Art und der entsprechend aufzutragenden Sonde beschriftet und numeriert werden, damit die fertig markierten DNA-Sonden auf das richtige Chromosomen-Präparat aufgetragen wurden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer Feuchtekammer im Wärmeschrank.

Nach der Hybridisierung wurden im Rahmen der Detektion die eingebauten Sonden durch die Behandlung mit entsprechenden Antikörpern „sichtbar“ gemacht. Die umfangreichen Schritte dieser Detektion sind in dem Protokoll im Anhang aufgeführt.

#### **2.2.4.5 Auswertung der Präparate**

Die Untersuchung der Signale erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2 (Fa. Zeiss) unter Verwendung der entsprechenden Filtersätze. Jeder Farbstoff hat einen spezifischen Anregungsbereich, so dass es pro Farbstoff einen entsprechenden Filter gibt, der ausschließlich die zur Anregung erforderliche Wellenlänge durchläßt. Fotografische Aufnahme wurden mit einem digitalen, gekühlten CCD- Kamera-System durchgeführt, wobei jedes Fluorochrom einzeln eingefangen wird, und die Bilder anschließend mit geeigneter Software (Gene Join, Adope Photoshop) bearbeitet und übereinander gelagert werden (nach FUCHS *et al.* 1998).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Morphologie

#### 3.1.1 Überblick über die Arten

Die Arten der in der gesamten Mediterraneis und in Mitteleuropa verbreiteten Gattung *Aira* zeichnen sich durch eine z.T. unklare Abgrenzung gegeneinander aus. Bereits 1899 erfolgte durch ASCHERSON & GRAEBNER eine Einteilung der Arten entsprechend ihrer Rispenform und Ährchenstiellänge in die drei Sektionen *Trichodaera*, *Euaera* (=Aira) und *Pycnaera*.

Die letztgenannte Sektion *Pycnaera* enthält nur die Art *A. praecox*. Im Gegensatz zu allen anderen Vertretern der Gattung *Aira* ist sie durch eine zusammengezogene Rispe charakterisiert (ALBERS 1978).

Die folgende Tabelle 3.1 gibt die Sektionszugehörigkeit der einzelnen Arten wieder.

Tabelle 3.1: Sektionszugehörigkeit der Arten

<b>Sektion <i>Aira</i> (<i>Euaera</i>)</b>
<i>A. cupaniana</i> Guss.
<i>A. uniaristata</i> Lag. & Rodr.
<i>A. byzantina</i> F. Albers
<i>A. multiculmis</i> Dum.
<i>A. armoricana</i> F. Albers
<i>A. caryophyllea</i> L. <i>ssp. caryophyllea</i>
<i>A. caryophyllea</i> <i>ssp. Edouardi</i> (Reut.) F. Albers
<b>Sektion <i>Trichodaera</i></b>
<i>A. elegantissima</i> Schur. <i>ssp. elegantissima</i>
<i>A. elegantissima</i> <i>ssp. scoparia</i> (Adam.) F. Albers
<i>A. tenorei</i> Guss.
<i>A. provincialis</i> Jordan
<i>A. intermedia</i> Guss.
<b>Sektion <i>Pycnaera</i></b>
<i>A. praecox</i> L.

Im Rahmen dieser Studie wurde ein Teil der Arten der Gattung *Aira* bearbeitet, die im folgenden genauer vorgestellt werden. Bei der Gattung werden zur Unterscheidung der Arten in erster Linie habituelle und blütenmorphologische Merkmale herangezogen. Hier spielen neben dem Verhältnis der Ährchenlänge zur Länge der Ährchenstiele (= Ährchen-Ährchenstiel-Längenverhältnis) auch die Ährchenlänge, die Form und die Ausmaße der Hüllspelzen sowie die Antherenlänge eine wichtige Rolle.

Bei allen *Aira*-Arten handelt es sich um annuelle, niedrige Gräser, die den für Poaceen typischen Aufbau zeigen. Die folgenden morphologischen Kriterien (MUER & ALBERS, unveröffentlicht) gelten für alle Arten der Gattung *Aira*: Die Blätter sind häufig zusammengerollt und borstenförmig, meist kurz und wie die Rispe rötlich überlaufen.

Die Arten zeigen einen mehr oder weniger rispenförmigen Blütenstand, wobei die Rispe – mit Ausnahme von *A. praecox* (Abb. 3.5) – locker ausgebreitet ist. Der Aufbau der Rispe wird charakterisiert durch das Ährchen-Ährchenstiel-Längenverhältnis (ASCHERSON & GRAEBNER 1899), woraufhin die Einteilung in die drei Sektionen zustande kam. Die Sektion *Pycnaera* hebt sich dabei von den anderen beiden ab, da ihre einzige Art *A. praecox* einen ährenförmigen Blütenstand mit stark verkürzten Rispenästen aufweist.

Die Ährchen sind seitlich zusammengedrückt und weisen zwei stiellose bzw. fast stiellose zwittrige Blüten auf. Die Hüllspelzen sind fast gleich lang, häutig, gekielt und länger als die Deckspelzen. Auch die Deckspelzen sind mehr oder weniger gleich lang, ebenfalls häutig, zugespitzt und an der Spitze zweispaltig. Im unteren Drittel befindet sich häufig dorsal eine mehr oder weniger gekniete, ungegliederte und nicht verdickte Granne, wohingegen die Deckspelzenbasis meist kurze, borstenförmige Haare trägt. Die Vorspelze ist kürzer als die Deckspelze.

In Abbildung 3.1 sind stellvertretend für die Gattung *Aira* mikroskopische Aufnahmen einer Deckspelze mit ihrer behaarten Basis und ihrer im unteren Drittel ansetzenden Granne von *A. elegantissima* dargestellt.

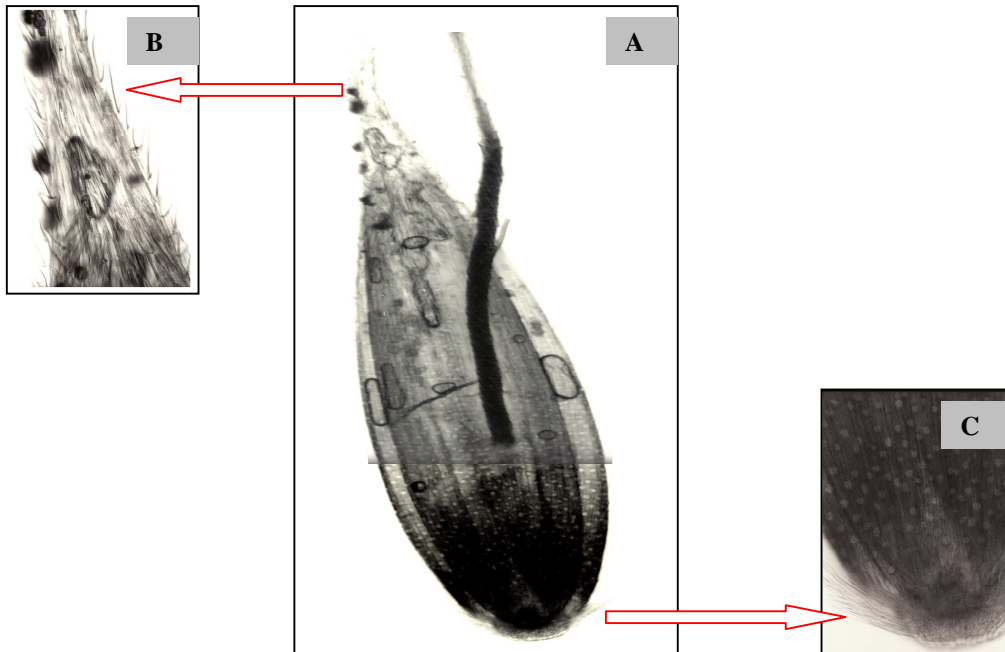


Abb. 3.1: Mikroskopische Aufnahme einer Deckspelze mit Granne von *A. elegantissima*

- A: Komplette Deckspelze mit Granne.
- B: Ausschnitt aus dem Bereich der Deckspelzenspitze.
- C: Ausschnitt aus dem Bereich der Basis.

Zu erkennen sind hier die borstenförmigen kurzen Haare.

Die für die weitere Untersuchung wichtigen Arten werden nun vorgestellt.

Innerhalb der einzelnen Artbeschreibungen handelt es sich bei den dargestellten Abbildungen jeweils um fotografierte Herbarbelege aus dem Botanischen Garten Münster, die hauptsächlich auf den Sammlung von Steinert und Muer beruhen, sowie um Aufnahmen des ausgesäten Pflanzenmaterials.

Wie durch die Beschreibungen festgestellt werden kann, sind sich die drei diploiden Arten *A. elegantissima* (siehe 3.1.1.1), *A. tenorei* (siehe 3.1.1.2) sowie *A. cupaniana* (siehe 3.1.1.3) morphologisch und auch karyologisch (siehe Kapitel 3.2) sehr ähnlich, so dass es leicht zu einer Bastardierung zwischen den Arten kommen könnte. Dies wird durch unterschiedliche Anthesezeiten verhindert, da es dadurch zu einer (zeitlichen) Kreuzungsbarriere kommt (STEINERT 1988).

### 3.1.1.1 *Aira elegantissima* Schur.

*A. elegantissima* erreicht eine Größe zwischen 5-30 (40) cm. Die Stengel sind dünn, gebüschelt oder einzeln wachsend, dabei aufrecht oder gekniet aufsteigend, und kahl.

Die Blätter sind bis zu 5 cm lang und meist eingerollt. Die Blattscheiden sind rauh, die lanzettliche Ligula ist 2-3 mm lang.

Die Rispe ist sehr locker ausgebreitet (siehe Abbildung 3.2) und besitzt lange haarfeine, meist abstehende rauhe Rispenäste. Die Ährchenstiele sind 2-10 mal so lang wie das 1,5-2,5 mm lange Ährchen und sind unterhalb des Ährchens etwas keulenförmig verdickt. Die Hüllspelzen sind lanzettlich, zugespitzt und oft gezähnt, und auf dem Kiel rauh. Die Deckspelzen sind etwas kürzer und tragen dorsal im unteren Drittel eine 2-3 mm lange Granne. Häufig ist jedoch nur die obere Deckspelze begrannt. Die Antheren sind ca. 0,2-0,4 mm lang.

Die Blütezeit für diese Art liegt zwischen April und Juni, wobei sie an offenen, sonnigen Plätzen und in lichten Wäldern auf trockenem, saurem, nährstoffarmen, sandigen Böden zu finden ist.

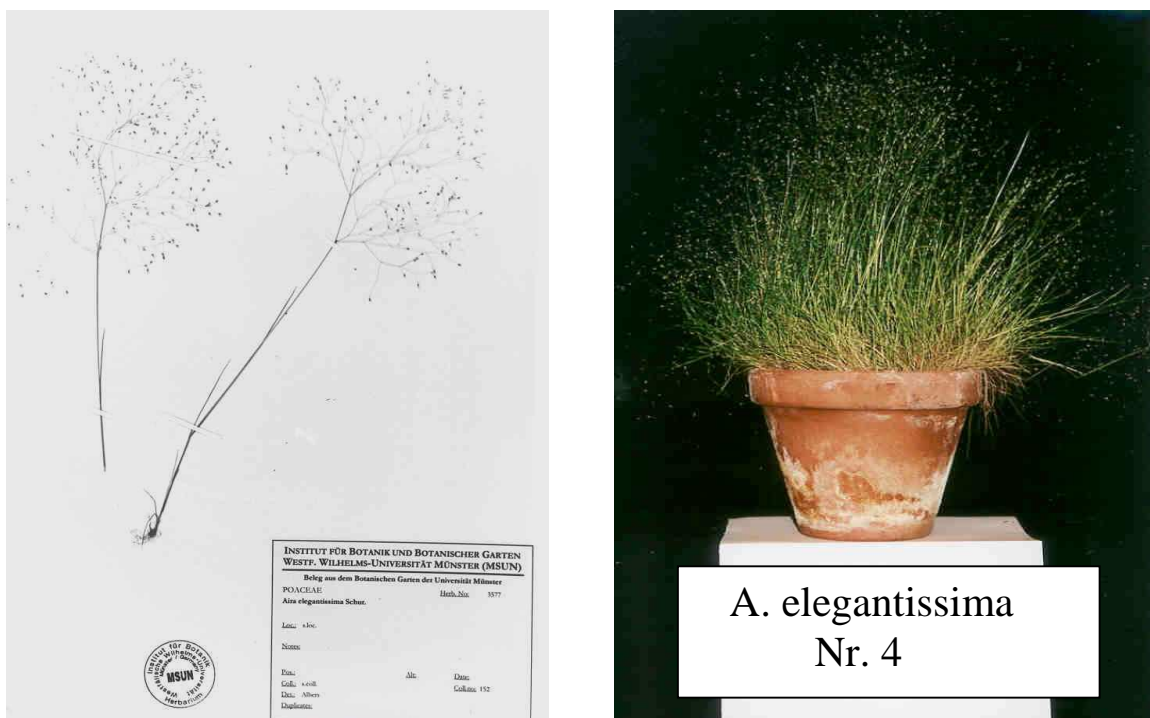


Abb. 3.2: *A. elegantissima*: Herbarbeleg (links) und Foto (rechts)



### 3.1.1.2 *Aira tenorei* Guss.

*A. tenorei* erreicht eine Größe von 10-40 cm. Die Stengel sind dünn und oft in Büscheln wachsend, dabei aufrecht oder gekniet aufsteigend und kahl.

Die Blätter werden bis zu 5 cm lang, ca. 1 mm breit und sind meist eingerollt. Die Blattscheiden sind rau, die Ligula ist 2-3 mm lang.

Die Rispe (Abb. 3.3) ist – sehr ähnlich zu *A. elegantissima* – breit abstehend, sehr locker und mit haarfeinen stark gespreizten Rispenästen versehen. Die Ährchenstiele werden bis zu 20 mm lang und sind damit 4-10 (12) mal so lang wie die nur ca. 1,5-1,8 mm langen eiförmigen Ährchen. Weiterhin sind sie unterhalb des Ährchens etwas keulenförmig verdickt. Die Hüllspelzen sind oval und auf dem Kiel nur wenig rau. Die Hüllspelzenspitze ist deutlich abgerundet. Die Deckspelzen sind kürzer als die Hüllspelzen und an der Spitze eingekerbt, aber nicht deutlich zweispaltig. Anders als bei *A. elegantissima* sind die Deckspelzen hier meist ohne Granne. Die Antheren sind ca. 0,5-0,6 mm groß.

Die Blütezeit dieser Art kann bereits im April beginnen, ist aber eher auf den Mai und Juni begrenzt. Als Standorte kann man mehr oder weniger offene, sonnige bis halbschattige Plätze und lichte Wälder nennen, wo die Pflanze auf trockenem, saurem, nährstoffarmen Sand- und Lehmböden anzutreffen ist.

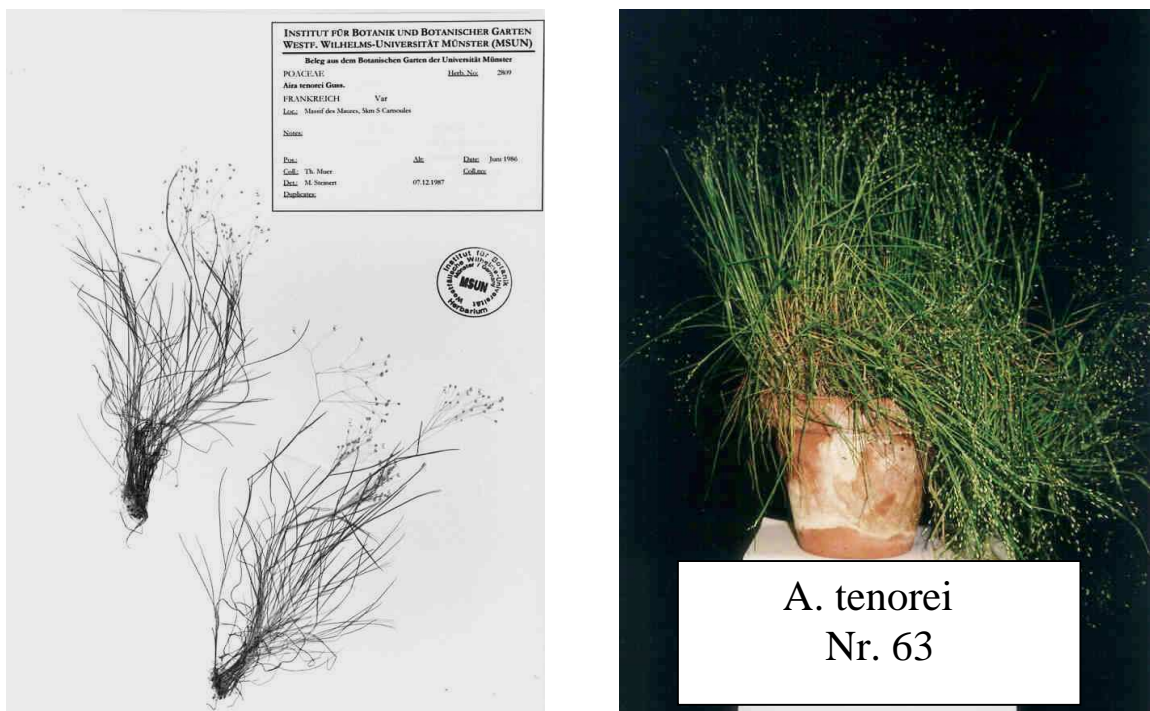


Abb. 3.3: *A. tenorei*: Herbarbeleg (links) und Foto (rechts)

### 3.1.1.3 *Aira cupaniana* Guss.

*A. cupaniana* erreicht eine Größe von 10-50 cm. Die dünnen Stengel wachsen in Büscheln, sind aufrecht und kahl.

Die Blätter sind bis zu 5 cm lang und 0,5-1,0 mm breit. Sie sind meist eingerollt, wie die Stengel kahl und auf den Nerven rau. Die Blattscheiden sind ebenfalls rau. Die lanzettliche Ligula wird bis zu 6 mm lang.

Die Rispe ist, wie man in Abbildung 3.4 erkennen kann, ziemlich locker, wobei die Rispenäste schräg aufrecht oder etwas abspreizend sind. Die Ährchenstiele sind 1-3 mal so lang wie die 1,8-2,5 mm langen Ährchen. Die Ährchenstiele bilden unterhalb des Ährchens einen mehr oder weniger deutlich abgesetzten Ringwulst. Die Ährchen sind auffällig in Gruppen zusammenstehend angeordnet. Die abgerundeten Hüllspelzen sind auf dem Kiel rau, die Hüllspelzenspitze ist gezähntet oder besitzt eine kleine aufgesetzte Spitze. Die Deckspelzen sind 0,8-1,3 mm lang, und sind damit deutlich kürzer als die Hüllspelzen. Sie tragen dorsal im unteren Drittel eine 3-4 mm lange Granne. Häufig ist nur die obere Deckspelze begrannt. Die Antheren sind 0,2-0,4 mm lang.

Die Blütezeit dieser Art erstreckt sich sehr früh von März bis Mai. Die Standorte sind offene, sonnige Plätze mit trockenen, sauren, nährstoffarmen und sandigen Böden.

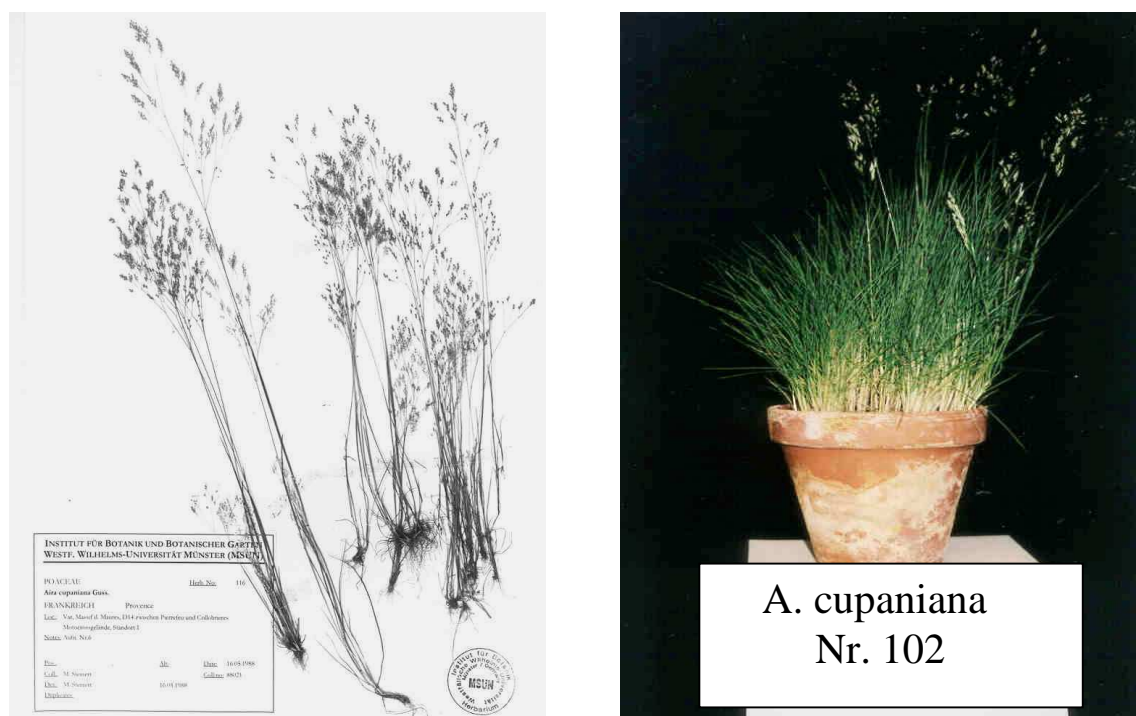


Abb. 3.4: *A. cupaniana*: Herbarbeleg (links) und Foto (rechts)

### 3.1.1.4 *Aira praecox* L.

*A. praecox* ist mit einer Größe von 3-15 (20) cm eher kleinwüchsig. Die sehr dünnen Stengel sind oft gebüschelt, aufrecht oder knickig-abstehend, kahl oder fast kahl.

Die bis zu 5 cm langen, 1 mm breiten eingerollten Blätter sind ebenfalls kahl und nur auf den Nerven rau. Die Ligula wird bis zu 3 mm lang.

Einzigartig in der Gattung *Aira* sind die bei *A. praecox* anliegenden Rispenäste (siehe Abbildung 3.5), wodurch die 1-3 cm lange Rispe ährenförmig zusammengezogen ist.

Die Ährchenstiele sind 1-3 mm lang und damit meist kürzer als die 2,5-3,5 mm langen Ährchen, die zu mehreren dicht zusammenstehen. Die Hüllspelzen sind zugespitzt und auf dem Kiel rau. Die Deckspelzen sind etwas kürzer als die Hüllspelzen, lanzettlich und tragen im unteren Drittel je eine ca. 3,5 mm lange Granne. Die Antheren sind ca. 0,2-0,4 mm lang.

Die Blütezeit dieser Art liegt zwischen April und Juni, kann sich aber auch bis in den August hineinziehen. Die Pflanze bevorzugt offene und sonnige Plätze mit trockenen, sauren, nährstoffarmen Sandböden.

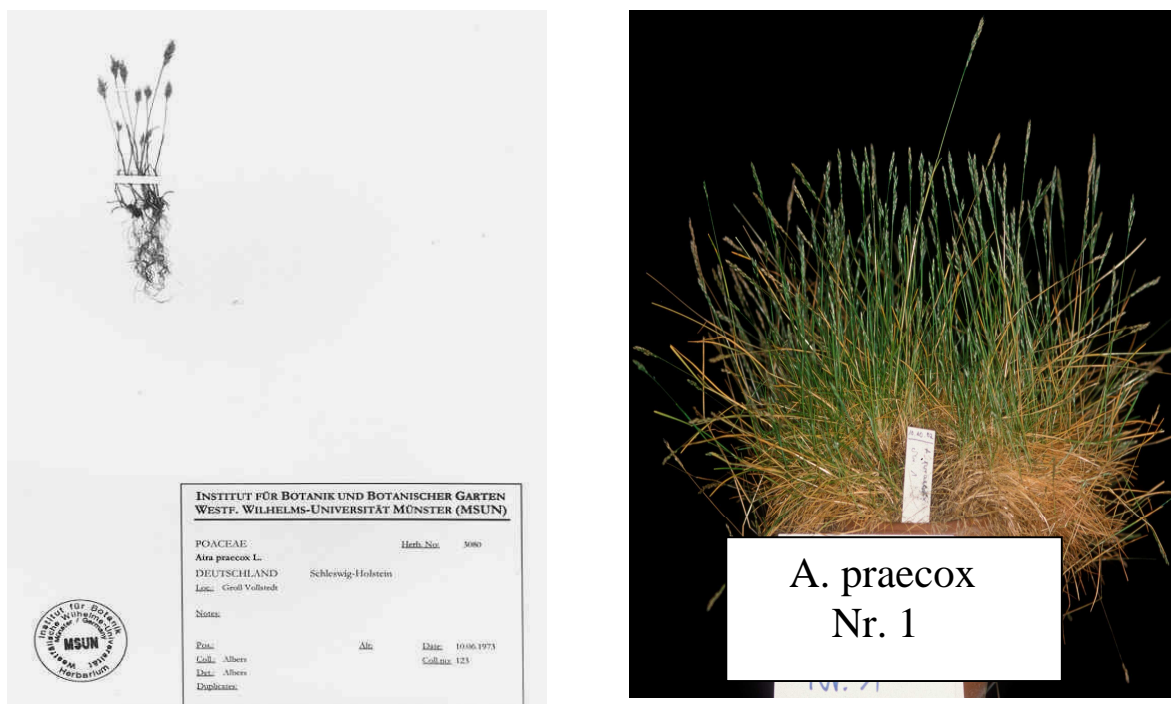


Abb. 3.5: *A. praecox*: Herbarbeleg (links) und Foto (rechts)

### 3.1.1.5 *Aira caryophyllea* L.

*A. caryophyllea* wird zwischen 5-30 (40) cm hoch. Der dünne Stengel ist aufrecht wachsend oder aufrecht aufsteigend, in kleinen Büscheln angeordnet oder einzeln, und kahl. Die Blätter sind bis zu 5 cm lang und 0,5 mm breit, eingerollt und auf den Nerven rau. Die Ligula ist lanzettlich und bis 4 mm lang.

Die Rispe ist locker (siehe Abbildung 3.6) und besitzt lange, aufrechte bis ab gespreizte, dünne Rispenäste. Die Ährchenstiele sind ca. 1-3 mal so lang wie die 2,5-3,5 mm lange Ährchen und sind unterhalb des Ährchens leicht verdickt.

Die Hüllspelzen sind lanzettlich, zugespitzt und auf dem Kiel rau. Die Deckspelzen sind kürzer und tragen dorsal im unteren Drittel eine 2-3 mm lange Granne. Selten ist die untere Blüte unbegrannt. Die Antheren sind 0,2-0,4 (0,5) mm lang.

Die Blütezeit erstreckt sich bei den in Südeuropa verbreiteten Vertretern auf die Monate April bis Juni, wohingegen die in Mitteleuropa angesiedelten Vertreter dieser Art zwischen Mai und Juli zur Blüte kommen. Die Pflanzen bevorzugen offene, sonnige Plätze und lichte Wälder, uns sind auf warmen, trockenen, kalkarmen, sauren sandig-lehmigen Böden zu finden.

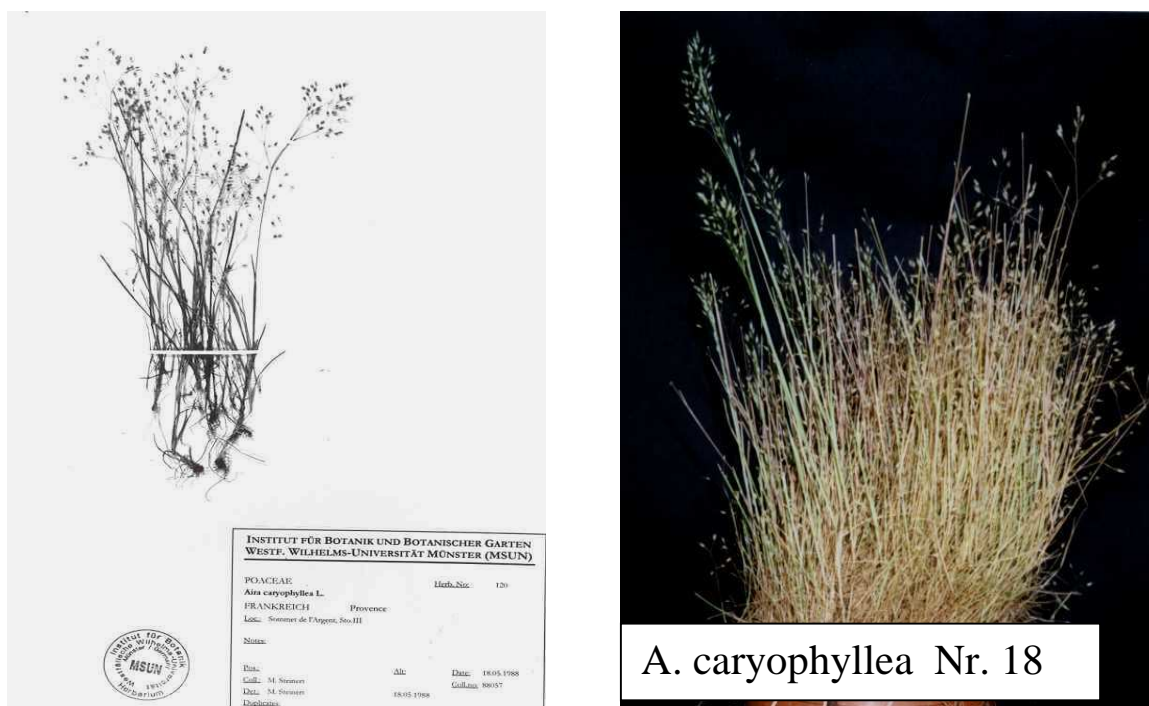


Abb. 3.6: *A. caryophyllea*: Herbarbeleg (links) und Foto (rechts)



### 3.1.1.6 *Aira multiculmis* Dum.

*A. multiculmis* erreicht eine Höhe von 20-50 cm und wächst in dichten Büscheln mit 20 oder mehr Stengeln.

Sie zeigt insgesamt morphologisch große Ähnlichkeiten zu der eben besprochenen Art *A. caryophyllea*, kann aber durch eine knickig hin- und hergebogene Rispenachse von *A. caryophyllea* unterschieden werden (ALBERS 1980).

Zudem befinden sich bei *A. multiculmis* in den Verzweigungspunkten der Äste an der Hauptachse häufiger als bei den anderen Arten sterile Rispenäste (ALBERS 1980). Die Rispenstiele sind, wie in Abbildung 3.7 zu erkennen, aufrecht abstehend und die Ährchenstiele sind ca. 5 mm lang. Damit sind sie nicht mehr als zweimal so lang wie die 2,3-2,5 mm langen Ährchen. Die Hüllspelzen besitzen eine mehr oder weniger abgesetzte Spitze. Die Antheren sind 0,3-0,5 mm lang.

Die Blütezeit erstreckt sich über die Monate Mai bis Juli. Lokalisiert ist die Art auf offenen, sonnigen Plätzen auf trockenen, nährstoffarmen sauren Sandböden.

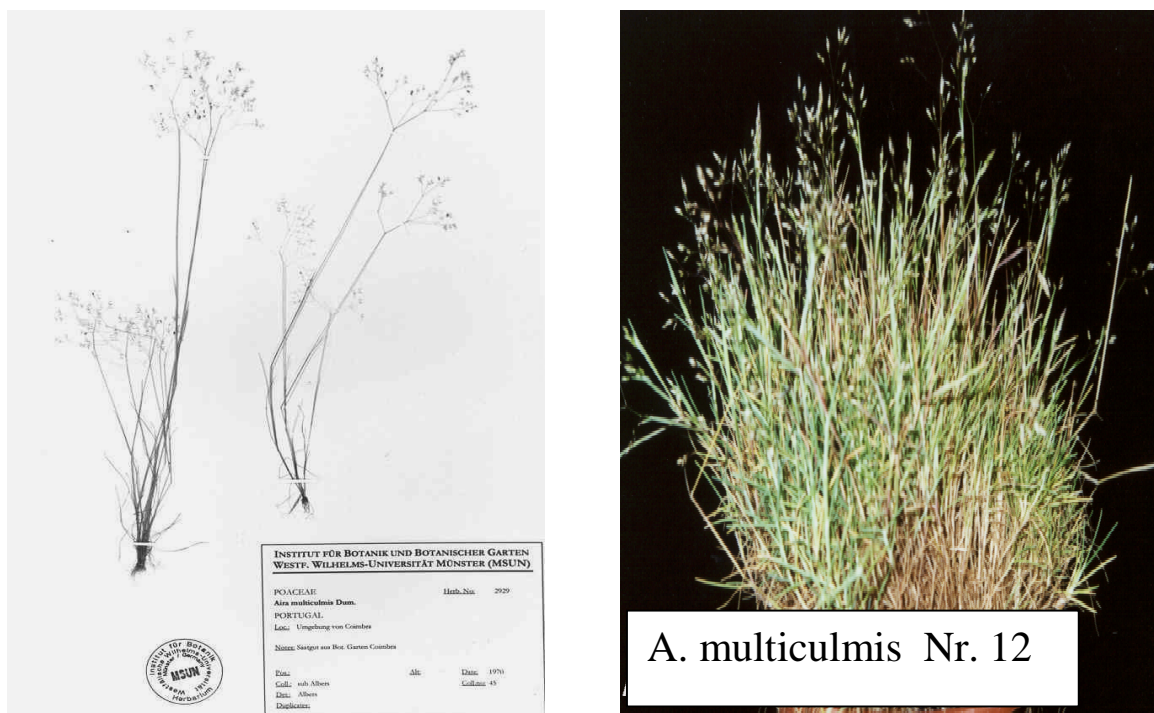


Abb. 3.7: *A. multiculmis*: Herbarbeleg (links) und Foto (rechts)

### 3.1.2 Morphologische Merkmalsmatrix

Die morphologische Analyse unter Verwendung einer Merkmalsmatrix wurde mit allen Arten der Gattung *Aira* durchgeführt. Folgende 13 Charaktere wurden ausgewählt:

- (1) Pflanze annuell (0) oder ausdauernd (1)
- (2) Chromosomen 14 (0) oder 28 (1)
- (3) Rispen ährenförmig (0) oder ausgebreitet (1)
- (4) Antheren kurz (0) oder lang (1)
- (5) Wuchshöhe <30cm (0) oder >30cm (1)
- (6) Ährchen <2,5mm (0) oder >2,5mm (1)
- (7) Keine Knickung der Hauptrispenachse (0) oder Knickung (1)
- (8) Keine sterilen Rispenäste (0) oder sterile Rispenäste (1)
- (9) Karyotyp symmetrisch (0) oder Karyotyp asymmetrisch (1)
- (10) Hüllspelzen länglich-schmal (0) oder Hüllspelzen breit-oval (1)
- (11) Hüllspelzenlänge <2,0mm (0) oder >2,0mm (1)
- (12) Karyopsenlänge <1,2mm (0) oder >1,2mm (1)
- (13) Deckspelzenlänge <1,8mm (0) oder >1,8mm (1)

Nach der Bewertung der Arten entsprechend dem Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein des jeweiligen Merkmals, ergibt sich die folgende in Tabelle 3.2 dargestellte Matrix.

Sollte für ein Merkmal keine Aussage getroffen werden können, so wird dies mit einem „?“ bewertet. Als Außengruppe wurde *Poa pratensis* ausgewählt.

Tabelle 3.2: Merkmalsmatrix für morphologische Charaktere

Charakter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Art													
<i>Poa pratensis</i>	1	?	1	?	1	1	0	0	?	?	?	?	?
<i>A. armoricana</i>	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	?	1	?
<i>A. byzantina</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	?	0	?
<i>A. caryophyllea</i>	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
<i>A. cupaniana</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. elegantissima</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. intermedia</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	?	1	?
<i>A. multiculmis</i>	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
<i>A. praecox</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
<i>A. provincialis</i>	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>A. tenorei</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>A. uniaristata</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	?	1	?

Von diesen 13 Charakteren sind insgesamt 9 Charaktere parsimony-informativ, während die restlichen 4 Charaktere als parsimony-uninformativ eingestuft werden.

Der erste gewählte Charakter bezüglich der Lebensweise der Pflanzen ist autapomorph für *Poa pratensis*, der dritte Charakter bezüglich der Rispenform ist autapomorph für *A. praecox* und der siebente und achte Charakter bezüglich der Knickung der Rispenachse und des Vorhandenseins von sterilen Rispenästen ist jeweils autapomorph für *A. multiculmis*, so dass diese vier Charaktere in die Analyse als „nicht informativ“ einbezogen werden.

Aus der Analyse der übrigen 9 Charaktere erhält man zahlreiche MPTs (*Most parsimonious trees*), die zu einem „50% Majority Rule Consensus Tree“ zusammengefasst werden. Dieser stellt eine Art Mittelwert der gesamten Bäume dar, bei dem letztendlich die Verzweigungen auftreten, die in 50% der Ergebnisbäume vorhanden sind.

Bei dem in Abbildung 3.8 dargestellten Kladogramm handelt es sich um ein polytomes Muster der verschiedenen Arten, aus dem nicht einmal *Poa pratensis* hervortritt. Es werden lediglich zwei Subcladen gebildet, die jeweils nur mit einem geringen *Bootstrap*-Wert (Subclade I mit 68% bzw. Subclade II mit 56%) unterstützt werden. Da die beiden angegebenen Werte zwischen 50-74% liegen, spricht dies für eine nur schwache Gruppierung.

Die Subclade I besteht aus den vier Arten *A. byzantina*, *A. cupaniana*, *A. elegantissima* und *A. tenorei*, die aufgrund ihrer Ähnlichkeiten bezüglich der untersuchten morphologischen Charaktere zusammen mit einem *Bootstrap*-Wert von 68% gruppiert werden.

Eine weitere Gruppierung bzw. Subcladen-Bildung mit einer *Bootstrap*-Unterstützung von 56% ergibt sich mit den Arten *A. caryophyllea* und *A. praecox*. Diese beiden Vertreter der Gattung *Aira* werden aufgrund ihres gemeinsamen asymmetrischen Karyotyps und ihrer Übereinstimmung in der Ährchengröße zusammengefasst.

Alle übrigen Arten können nicht weiter gruppiert werden, sondern stehen jeweils für sich.

Dies Kladogramm ist somit nicht sehr aussagekräftig, sondern vermittelt nur eine begrenzte Aufteilung der Arten.

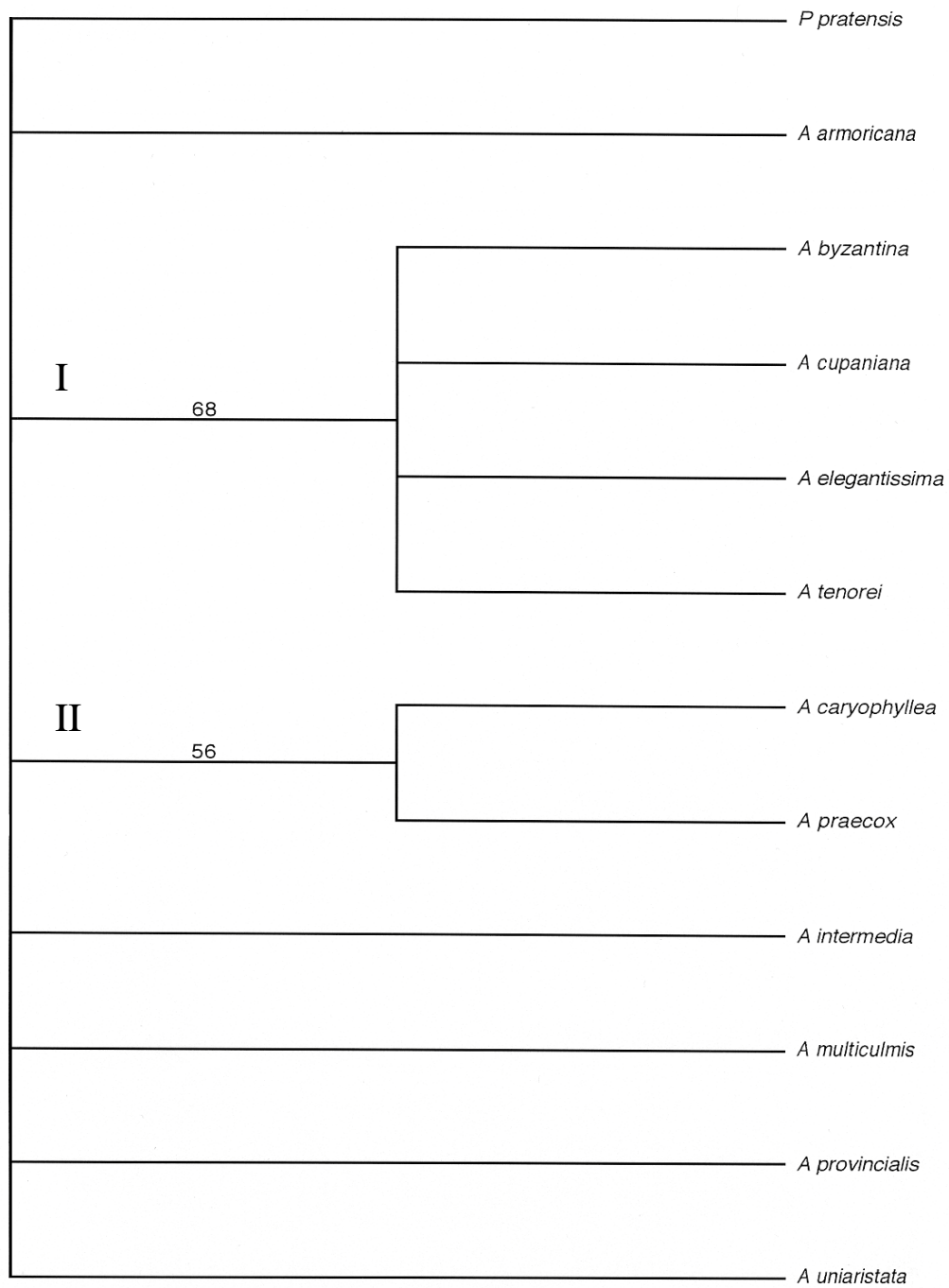


Abb. 3.8: Kladogramm basierend auf einer morphologischen Merkmalsmatrix.

Als Außengruppe wurde *Poa pratensis* gewählt.

Die angegebenen Werte stellen die *Bootstrap*-Werte dar.



### **3.2 Karyologie und Verbreitung**

Die karyologischen Untersuchungen stellen einen wesentlichen Bestandteil des methodischen Repertoires innerhalb taxonomischer Untersuchungen dar und bilden besonders im Rahmen dieser Arbeit die wichtigste Arbeitsgrundlage. Auf der karyologischen Ebene soll durch die Chromosomenanalyse der potentiellen diploiden Ausgangsarten sowie der tetraploiden Zielarten ein Versuch zur Rekonstruktion der phylogenetischen Entwicklung innerhalb der Gattung unternommen werden. Ein Vergleich der Chromosomenmorphologien konnte bereits häufig zur Klärung von Verwandtschaftskomplexen beitragen.

Seit WULFF (1937) und HAGERUP (1939) sind die beiden in der Gattung *Aira* vorkommenden Chromosomenzahlen 14 und 28 bekannt. Es tritt somit die Basiszahl  $x = 7$  auf, die auch in anderen Gattungen dieser Subtribus zu finden ist.

Die karyologischen Analysen wurden an den ausgewählten *Aira*-Arten *A. elegantissima*, *A. praecox*, *A. multiculmis* und *A. caryophyllea* durchgeführt, welche die vier verschiedenen Karyotypen [A], [B], [AA] und [AB] repräsentieren.

Zusätzlich wurden auch die Arten *A. tenorei* und *A. cupaniana* eingehend untersucht.

Insgesamt lassen sich die einzelnen Arten am besten mit Hilfe ihrer Idiogramme vergleichen und analysieren, die eine schematische graphische Darstellung des Karyotyps präsentieren (NAGL 1976). Für diese Idiogramme werden jeweils die homologen Chromosomenpaare zu einem Wert vereinigt, so dass nur der jeweils haploide Chromosomensatz dargestellt wird. Für die Erstellung der Idiogramme werden die Chromosomen ihrer Größe nach hintereinander gestellt, wobei der längere Arm jeweils nach unten gerichtet ist und die Centromere stets auf einer Linie liegen. Vorhandene Satelliten oder sekundäre Einschnürungen werden nach der Länge ihres kurzen Armes eingeordnet, wobei die Satelliten bzw. Einschnürungen jeweils nach oben gerichtet werden. Bei Arten mit einem asymmetrischen Karyotyp werden zuerst die metacentrischen Chromosomen ihrer Größe nach angeordnet, bevor die asymmetrischen Chromosomen folgen.

Eine weitere Möglichkeit für einen einfachen direkten Vergleich der Karyotypen untereinander ist diejenige mit Hilfe von Karyopolygonen (siehe Abb. 2.1). Die hier ermittelten Daten werden dabei auf einer Kreisfläche aufgetragen (SAUER & HEUBL 1984).

### 3.2.1 Karyotyp-Analysen

Insgesamt sind für die Erstellung eines Karyotyps bei einer Art die Bearbeitung und Auswertung von je mindestens 10-15 gut gespreiteten Metaphase-Platten notwendig. Erst aus diesen Ergebnissen kann man ein mittleres Gesamtergebnis erhalten, das dem Karyotyp der jeweiligen Art entspricht. Die erhaltenen Daten für die einzelnen Arten sind nachfolgend aufgeführt.

#### 3.2.1.1 *Aira elegantissima* Schur.

Die Daten für die Analyse des Karyotyps von *A. elegantissima* haben sich aus der Auswertung von 13 Metaphase-Platten ergeben, deren Werte im Durchschnitt zusammengefasst wurden und in Tabelle 3.3 zu sehen sind.

Die Anzahl der Chromosomen der diploiden Art *A. elegantissima* beträgt  $2n = 14$ .

Die durchschnittliche Gesamtlänge des diploiden Chromosomensatzes (siehe Tabelle 3.3) liegt bei 43,2  $\mu\text{m}$ , und weicht damit nur geringfügig von der bei ALBERS (1980a) angegebenen Länge von 49,5  $\mu\text{m}$  ab. Die Länge der Chromosomen variiert im Schnitt zwischen 2,2 und 4,0  $\mu\text{m}$  (siehe Tabelle 3.3). Dadurch ergibt sich ein durchschnittlicher Größengradient von 55,9. Die durchschnittliche Chromosomenlänge liegt bei 3,1  $\mu\text{m}$ .

Der Index der Karyotypsymmetrie beträgt im Durchschnitt 54,7 (siehe Tabelle 3.3). Damit ist dieser Karyotyp sehr homogen bzw. symmetrisch, was ebenfalls durch das Vorkommen von 14 ausschließlich metacentrischen Chromosomen bestätigt wird (siehe Abb. 3.10). Aus diesem Grund wird *A. elegantissima* dem Karyotyp [A] nach ALBERS (1978a) zugeordnet.

In wenigen Metaphaseplatten-Analysen fanden sich auch zwei bzw. vier submetacentrische Chromosomen, die aber im Durchschnitt in der Analyse keine Beachtung fanden.

Jeweils ein Chromosomenpaar zeichnet sich durch das Vorhandensein eines Satelliten aus, dessen Index durchschnittlich bei 0,5 liegt. Zusätzliche sekundäre Einschnürungen wurden jedoch nicht gefunden.

Tabelle 3.3: Mittelwerte und Einzelergebnisse der karyologischen Analysen von *A. elegantissima*

Proben.- Nr.	Genom- Gesamtlänge (2n) in $\mu\text{m}$	Durchschn. Chrom.Länge ( $\mu\text{m}$ )	kürzestes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	längstes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	Größen- Gradient- Index	Index der Karyotyp- Symmetrie	SAT- Index
Nr. 1	27,84	1,99	1,60	2,54	62,99	57,64	0,70
Nr. 2	38,85	2,77	1,51	3,67	41,14	53,00	0,68
Nr. 3	38,44	2,74	1,70	3,86	44,04	54,14	0,40
Nr. 4	30,52	2,18	1,60	2,73	58,61	55,00	0,33
Nr. 5	55,38	3,95	2,07	4,71	43,95	55,50	0,22
Nr. 6	44,10	3,15	2,26	5,09	44,40	53,00	0,69
Nr. 7	41,68	2,98	2,64	3,30	80,00	54,57	0,62
Nr. 8	50,12	3,58	2,73	4,52	60,39	55,50	0,56
Nr. 9	38,08	2,72	2,07	3,49	59,31	53,14	0,50
Nr. 10	38,64	2,76	2,36	3,39	69,61	56,86	0,43
Nr. 11	44,50	3,18	2,26	3,96	57,07	54,07	0,435
Nr. 12	49,18	3,51	2,64	5,09	51,87	54,07	0,335
Nr. 13	64,64	4,62	3,11	5,75	54,09	54,86	0,425
<b>Summe</b>	561,97	40,13	28,55	52,1	727,47	711,35	6,325
<b>Mittelwert</b>	43,2284	3,0869	2,1961	4,0076	55,9592	54,7192	0,4865
	<b>43,2</b>	<b>3,1</b>	<b>2,2</b>	<b>4,0</b>	<b>55,9</b>	<b>54,7</b>	<b>0,5</b>

Aus diesen ermittelten Daten ergibt sich das in Abbildung 3.9 dargestellte Karyopolygon für *A. elegantissima*. Anhand eines Karyopolygon lassen sich Arten direkt miteinander vergleichen.

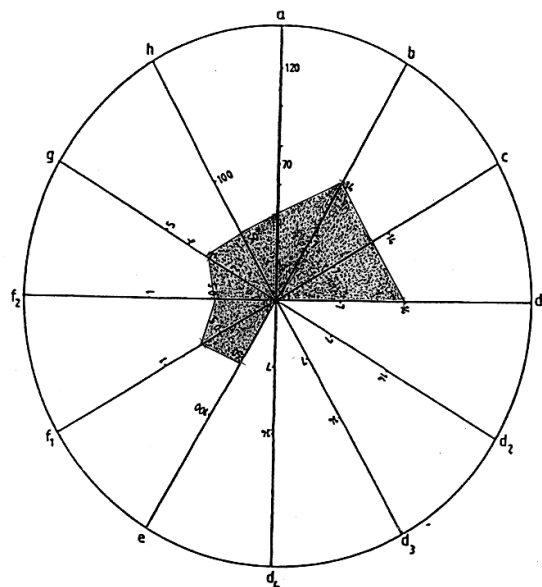


Abb. 3.9: Karyopolygon von *A. elegantissima* (nach Werten aus Tabelle 3.3)

Für die Ermittlung der Daten zur Erstellung eines Idiogrammes wurden die Längen der homologen Chromosomenpaare 1-7 einer jeden ausgewerteten Metaphase-Platte zu einem Wert vereinigt (nach Mittelwertberechnung und Standardabweichung).

Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Durchschnittliche Chromosomendaten bei *A. elegantissima*

Chromosomen-paar - Nr.	Relative Länge(%)	Länge in $\mu\text{m}$	Centromer-position	SAT-Index	Index der Sek. Einsch.
1	17,07	3,69	0,55		
2	15,08	3,26	0,54		
3	10,18	2,20	0,54		
4	17,81	3,85	0,56	0,50	
5	13,51	2,92	0,54		
6	12,08	2,61	0,55		
7	10,18	2,20	0,54		

Aus diesen mittleren Chromosomen-Daten lässt sich das Idiogramm von *A. elegantissima* darstellen (Abb. 3.10), somit also der haploide Satz dieser Art.

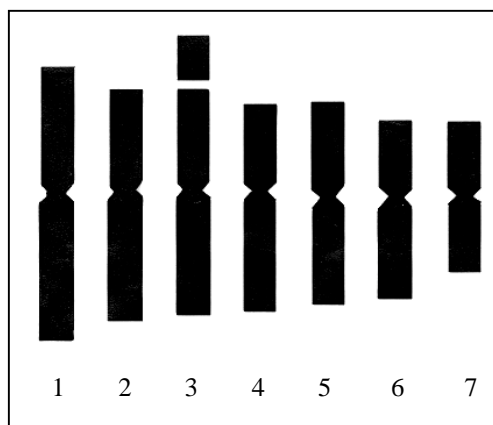


Abb. 3.10: Idiogramm von *A. elegantissima*

Das Karyogramm von *A. elegantissima* ist in der folgenden Abbildung 3.11 dargestellt.



Abb. 3.11: Karyogramm von *A. elegantissima* 32

### 3.2.1.2 *Aira cupaniana* Guss.

Die zu einem Durchschnitt zusammengefassten Daten aus der Auswertung mehrerer Metaphase-Platten von *A. cupaniana* sind in der Tabelle 3.5 dargestellt.

Die Anzahl der Chromosomen der diploiden Art *A. cupaniana* beträgt  $2n = 14$ .

Die durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes liegt bei 50,8  $\mu\text{m}$ . Die Größe der Chromosomen variiert im Schnitt zwischen 2,6 und 4,6 $\mu\text{m}$  (siehe Tabelle 3.5), wodurch sich ein mittlerer Größengradient von 56,1 ergibt.

Die durchschnittliche Chromosomenlänge liegt bei 3,6 $\mu\text{m}$ .

Der Index der Karyotipsymmetrie beträgt im Durchschnitt 54,2. Dies weist auch bei dieser Art auf einen sehr homogenen und symmetrischen Karyotyp hin, ähnlich dem von *A. elegantissima*, was durch das Vorhandensein von stets 14 metacentrischen Chromosomen bestätigt wird. So kann diese Art ebenfalls dem von ALBERS (1980b) benannten Grundtyp [A] zugeordnet werden.

Es wurden bei keiner Metaphase-Platten Satelliten gefunden, und auch eine sekundäre Einschnürung konnte nur bei der Auswertung einer Probe ermittelt werden, die jedoch nicht berücksichtigt wurde.

Tabelle 3.5: Mittelwerte und Einzelergebnisse der karyologischen Analysen von *A. cupaniana*

Proben.- Nr.	Genom- Gesamtlänge (2n) in $\mu\text{m}$	Durchschn. Chrom Länge ( $\mu\text{m}$ )	kürzestes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	längstes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	Größen- Gradient- Index	Index der Karyotyp- Symmetrie	SAT- Index der sekundären Einschnürung
Nr. 1	46,58	3,33	2,83	4,05	69,88	55,64	0,525
Nr. 2	39,94	2,85	2,17	3,86	56,22	53,21	
Nr. 3	48,26	3,45	2,64	4,52	58,41	52,78	
Nr. 4	47,68	3,40	2,54	4,24	59,90	55,07	
Nr. 5	95,20	6,80	4,81	8,58	56,06	54,71	
Nr. 6	38,85	2,77	1,51	3,67	41,14	53,00	
Nr. 7	38,08	2,72	2,07	3,49	59,31	53,14	
Nr. 8	55,38	3,95	2,07	4,71	43,95	55,50	
Nr. 9	47,68	3,40	2,54	4,24	59,90	55,07	
<b>Summe</b>	457,65	32,67	23,18	41,36	504,77	488,12	0,525
<b>Mittelwert</b>	50,85	3,63	2,5755	4,5955	56,0855	54,2355	
	<b>50,8</b>	<b>3,6</b>	<b>2,6</b>	<b>4,6</b>	<b>56,1</b>	<b>54,2</b>	

Die Darstellung der ermittelten Werte in Form des Karyopolygons findet sich in Abbildung 3.12.

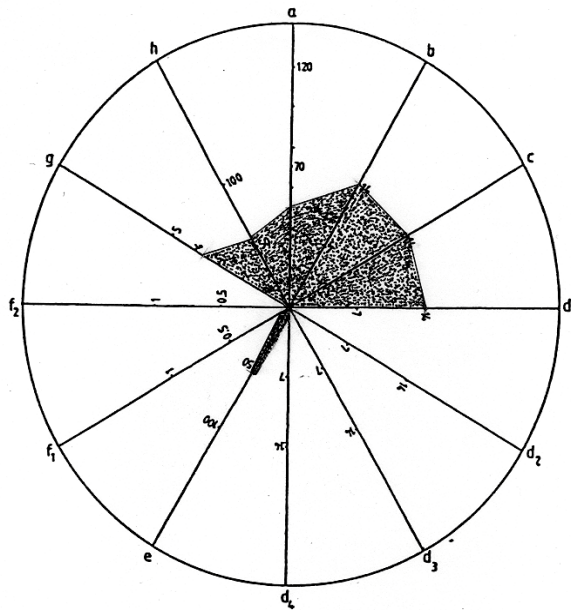


Abb. 3.12: Karyopolygon von *A. cupaniana* (nach Werten aus Tabelle 3.5)

Für die Ermittlung der Daten zur Erstellung eines Idiogrammes wurden die Längen der homologen Chromosomenpaare 1-7 einer jeden ausgewerteten Metaphase-Platte zu einem Wert vereinigt (nach Mittelwertberechnung und Standardabweichung). Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Durchschnittliche Chromosomendaten bei *A. cupaniana*

Chromosomenpaar - Nr.	Relative Länge(%)	Länge in $\mu\text{m}$	Centromerposition	SAT-Index	Index der Sek. Einsch.
1	16,73	4,25	0,55		
2	17,6	4,47	0,56		
3	15,35	3,90	0,55		
4	14,33	3,64	0,53		
5	13,46	3,42	0,52		
6	12,4	3,15	0,54		
7	10,12	2,57	0,54		

Die Darstellung der mittleren Chromosomen-Daten als Idiogramm ist in Abbildung 3.13 zu finden.

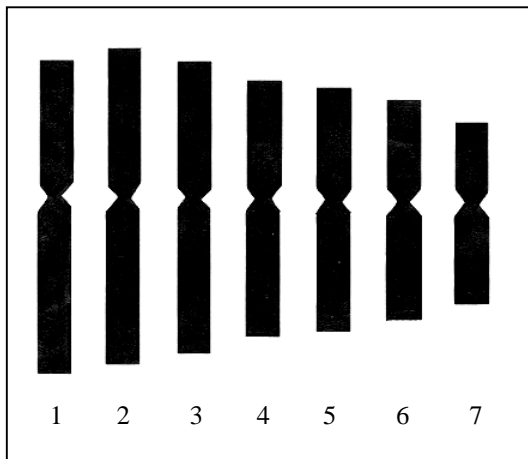


Abb. 3.13: Idiogramm von *A. cupaniana*

Das Karyogramm der Art ist in der folgenden Abbildung 3.14 anhand mitotischer Chromosomen dargestellt.

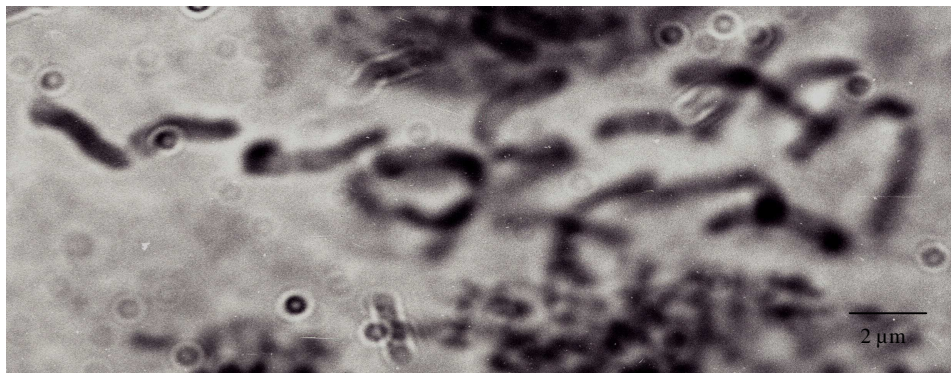


Abb. 3.14: Karyogramm von *A. cupaniana* 31

### 3.2.1.3 *Aira tenorei* Guss.

Die Daten für die Analyse des Karyotyps von *A. tenorei* haben sich aus der Auswertung von 9 Metaphase-Platten ergeben, deren Werte in Tabelle 3.7 zusammengefasst wurden.

Die Anzahl der Chromosomen der diploiden Art *A. tenorei* beträgt  $2n = 14$ .

Die durchschnittliche Gesamtlänge des diploiden Chromosomensatzes hat sich aus dem Mittelwert aller ausgewerteten Platten ergeben und liegt bei 57,6  $\mu\text{m}$ . Die Größe der Chromosomen variiert im Durchschnitt (siehe Tabelle 3.7) zwischen 2,9 und 5,5  $\mu\text{m}$ .

Bei Betrachtung aller einzelnen Proben ergibt sich ein mittlerer Größengradient von 52,6.

Die durchschnittliche Chromosomenlänge liegt bei 4,1  $\mu\text{m}$ .

Der Index der Karyotypsymmetrie beträgt im Durchschnitt 54,9 (Tabelle 3.7).

Der Chromosomensatz von *A. tenorei* weist jeweils 14 metacentrische Chromosomen auf, d.h. alle Chromosomen zeichnen sich durch das Vorhandensein von medianen Centromerpositionen aus. Vergleichbar mit den Karyotypen von *A. elegantissima* und *A. cupaniana* kann somit auch derjenige von *A. tenorei* dem Grundkaryotyp [A] nach ALBERS (1978a) zugeordnet werden.

Es tritt jeweils ein Chromosomenpaar mit einem 0,82  $\mu\text{m}$  großen Satelliten auf, das Vorhandensein von sekundären Einschnürungen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Tabelle 3.7: Mittelwerte und Einzelergebnisse der karyologischen Analysen von *A. tenorei*

Proben.- Nr.	Genom- Gesamtlänge (2n) in $\mu\text{m}$	Durchschn. Chrom Länge ( $\mu\text{m}$ )	kürzestes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	längstes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	Größen- Gradient- Index	Index der Karyotyp- Symmetrie	SAT- Index	Index der sekundären Einschnürung
Nr. 1	67,24	4,80	3,86	7,16	53,91	54,14	0,42	
Nr. 2	46,18	3,30	2,17	4,52	48,01	55,36	0,41	
Nr. 3	80,66	5,76	3,58	7,54	47,48	57,57	0,375	
Nr. 4	60,68	4,33	2,92	6,41	45,55	54,86	0,505	
Nr. 5	55,38	3,95	2,07	4,71	43,95	55,50	0,22	
Nr. 6	64,64	4,62	3,11	5,75	54,09	54,86	0,425	
Nr. 7	46,58	3,33	2,83	4,05	69,88	55,64	0,525	
Nr. 8	49,18	3,51	2,64	5,09	51,87	54,07	0,335	
Nr. 9	48,26	3,45	2,64	4,52	58,41	52,78		
<b>Summe</b>	518,8	37,05	25,82	49,75	473,15	494,78	3,215	
<b>Mittelwert</b>	57,6444	4,1166	2,8688	5,5277	52,5722	54,9755	0,4018	
	<b>57,6</b>	<b>4,1</b>	<b>2,9</b>	<b>5,5</b>	<b>52,6</b>	<b>54,9</b>	<b>0,4</b>	



Aus diesen Daten lässt sich das Karyopolygon für *A. tenorei* darstellen (Abb. 3.15).

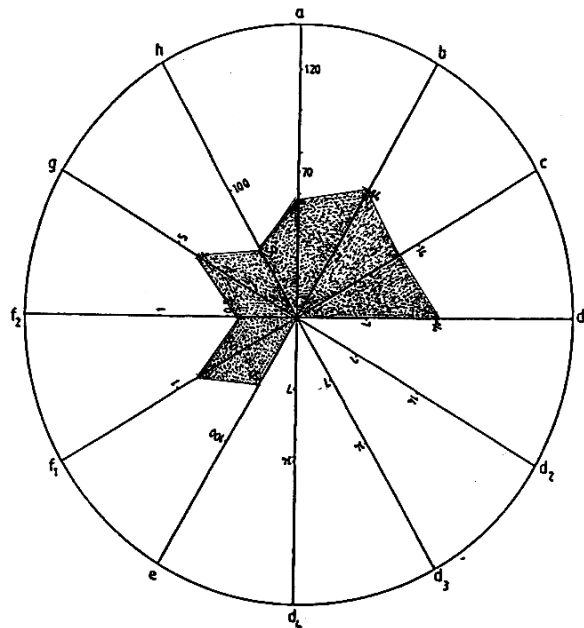


Abb. 3.15: Karyopolygon von *A. tenorei* (nach Werten aus Tabelle 3.7)

Für die Erstellung eines Idiogrammes wurden die Datensätze der homologen Chromosomenpaare 1-7 zu einem durchschnittlichen Wert vereinigt (nach Mittelwertberechnung und Standardabweichung), nach dem auch das Karyopolygon erstellt wurde. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: Durchschnittliche Chromosomendaten bei *A. tenorei*

Chromosomenpaar - Nr.	Relative Länge(%)	Länge in $\mu\text{m}$	Centromerposition	SAT-Index	Index der Sek. Einsch.
1	17,18	4,95	0,56		
2	14,95	4,31	0,56		
3	18,42	5,31	0,56	0,4	
4	14,33	4,13	0,55		
5	13,32	3,84	0,52		
6	11,83	3,41	0,54		
7	9,96	2,87	0,55		

Die Darstellung der mittleren Chromosomen-Daten als Idiogramm ist in Abbildung 3.16 zu finden.

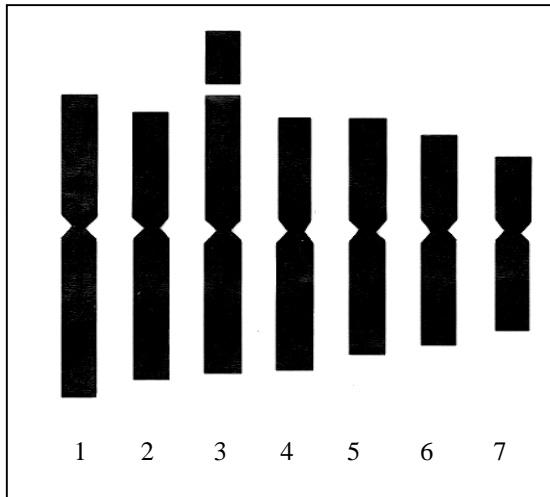


Abb. 3.16: Idiogramm von *A. tenorei*

Das Karyogramm von *A. tenorei* ist in der folgenden Abbildung 3.17 dargestellt.



Abb. 3.17: Karyogramm von *A. tenorei* 65

#### 3.2.1.4 *Aira praecox* L.

Die Anzahl der Chromosomen der diploiden Art *A. praecox* beträgt  $2n = 14$ .

Die durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes nach Auswertung aller Metaphase-Platten liegt bei  $53,5 \mu\text{m}$ , wobei im Schnitt (siehe Tabelle 3.9) die kürzesten Chromosomen  $2,7 \mu\text{m}$  und die größten  $4,8 \mu\text{m}$  lang sind.

Dadurch ergibt sich ein durchschnittlicher Größengradient von  $56,7$ .

Die durchschnittliche Chromosomenlänge liegt bei  $3,8 \mu\text{m}$ .

Der Index der Karyotypsymmetrie beträgt im Durchschnitt  $59,6$ .

Der Chromosomensatz besteht aus 14 Chromosomen. Von diesen sind 10 metacentrisch und 4 als submetacentrisch zu beschreiben.

In 4 von 23 Metaphaseplatten-Analysen fanden sich auch subteloцентриsche Chromosomen, die jedoch im Schnitt nicht weiter beachtet wurden.

Durch den erhöhten Karyotypsymmetrie-Index in Verbindung mit ihrer in der Gattung einzigartigen Rispenform wird diese Art dem abgewandelten Karyotyp [B] nach ALBERS (1978b) zugeordnet.

Jeweils ein Chromosomenpaar zeichnet sich durch das Vorhandensein von Satelliten aus, eine sekundäre Einschnürung wurden in der Mehrzahl der untersuchten Metaphase-Platten ebenfalls gefunden.

Tabelle 3.9: Mittelwerte und Einzelergebnisse der karyologischen Analysen von *A. praecox*

Proben.- Nr.	Genom- Gesamtlänge (2n) in $\mu\text{m}$	Durchschn. Chrom Länge ( $\mu\text{m}$ )	kürzestes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	längstes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	Größen- Gradient- Index	Index der Karyotyp- Symmetrie	SAT- Index	Index der sekundären Einschnürung
Nr. 1	54,26	3,87	2,45	4,71	52,02	60,50	0,33	0,35
Nr. 2	56,08	4,01	2,07	5,09	44,66	63,35	0,40	0,58
Nr. 3	52,00	3,71	2,36	5,56	42,45	59,36	0,25	0,73
Nr. 4	50,68	3,62	2,83	4,33	65,36	58,00		
Nr. 5	58,24	4,16	2,83	5,28	53,60	60,28	0,44	0,70
Nr. 6	45,98	3,28	2,26	4,43	51,01	60,14	0,35	
Nr. 7	55,02	3,93	2,64	5,65	46,72	56,71	0,44	0,615
Nr. 8	45,80	3,27	1,70	4,05	41,97	57,78	0,24	0,50
Nr. 9	50,84	3,63	2,45	4,62	53,03	62,07	0,29	0,28
Nr. 10	60,88	4,35	3,11	5,28	58,90	64,07	0,73	0,625
Nr. 11	57,04	4,07	3,20	5,08	62,99	61,28	0,38	0,62
Nr. 12	61,44	4,39	3,86	4,90	78,77	61,86	0,24	0,71
Nr. 13	55,20	3,94	3,30	4,52	73,01	58,21	0,65	
Nr. 14	36,76	2,62	1,88	3,02	62,25	54,14	0,55	
Nr. 15	55,78	3,98	2,92	5,09	57,37	58,50	0,205	0,52
Nr. 16	53,16	3,80	3,49	4,15	84,10	63,71	0,42	0,58
Nr. 17	46,54	3,32	1,88	4,05	46,42	59,43	0,535	
Nr. 18	59,56	4,25	3,58	4,90	73,06	56,43	0,29	0,84
Nr. 19	47,30	3,38	1,79	4,33	41,34	58,43	0,51	0,64
Nr. 20	59,54	4,25	3,11	6,31	49,29	57,14	0,45	0,73
Nr. 21	56,14	4,01	3,11	5,37	57,91	58,57	0,51	0,51
Nr. 22	58,58	4,18	2,54	4,99	50,90	62,14	0,37	0,42
<b>Summe</b>	1118,24	79,84	56,82	100,72	1196,23	1249,96	8,21	9,53
<b>Mittelwert</b>	53,2495	3,8019	2,7057	4,7961	56,9633	59,5219	0,4105	0,5956
	<b>53,5</b>	<b>3,8</b>	<b>2,7</b>	<b>4,8</b>	<b>56,7</b>	<b>59,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>



Die Darstellung der mittleren Chromosomen-Daten als Idiogramm ist in der Abbildung 3.19 zu finden.

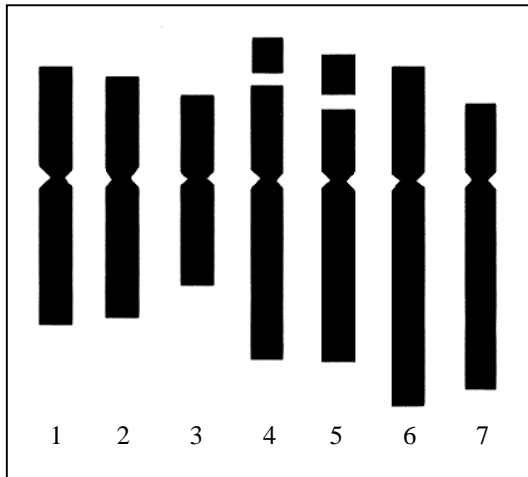


Abb. 3.19: Idiogramm von *A. praecox*

Das Karyogramm von *A. praecox* ist in der folgenden Abbildung 3.20 dargestellt.



Abb. 3.20: Karyogramm von *A. praecox* 95

### 3.2.1.5 *Aira caryophyllea* L.

Die Anzahl der Chromosomen der tetraploiden Art *A. caryophyllea* beträgt  $2n = 28$ .

Die durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes liegt bei 89,5  $\mu\text{m}$ .

Die Größe der Chromosomen variiert nach Betrachtung aller ausgewerteten Metaphase-Platten im Schnitt zwischen 2,1  $\mu\text{m}$  und 4,2  $\mu\text{m}$ , wodurch sich ein durchschnittlicher Größengradient von 50,9 ergibt (siehe Tabelle 3.11).

Die durchschnittliche Chromosomenlänge liegt bei 3,2  $\mu\text{m}$ .

Der Index der Karyotypsymmetrie beträgt im Durchschnitt 56,8. Dieser ermittelte Wert ist für einen asymmetrischen Karyotyp eher niedrig.

Der Chromosomensatz besteht aus 28 Chromosomen. Von diesen sind zwischen 20 und 24 Chromosomen metacentrisch, d.h. mit medianer Centromerposition, und dementsprechend zwischen 4 und 8 Chromosomen submetacentrisch.

Auch dies ist für einen asymmetrischen Karyotyp eher ungewöhnlich, da man mehr Chromosomen erwarten würde, die dem submetacentrischen bzw. subtelocentrischen Typus zuzuordnen sind.

Mit Ausnahme einer untersuchten Probe wurden immer mindestens ein Satellit, in den meisten Fällen jedoch die erwarteten zwei Satelliten gefunden.

Weitere sekundäre Einschnürungen konnten aber nicht festgestellt werden.

Der Karyotyp dieser Art ist nach ALBERS (1978b) aus der allopolyploiden Bildung des Karyotyps [A] mit dem Karyotyp [B] entstanden, und wird als Karyotyp [AB] bezeichnet.

Tabelle 3.11: Mittelwerte und Einzelergebnisse der karyologischen Analysen von *A. caryophyllea*

Proben.- Nr.	Genom- Gesamtlänge (2n) in $\mu\text{m}$	Durchschn. Chrom Länge ( $\mu\text{m}$ )	kürzestes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	längstes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	Größen- Gradient- Index	Index der Karyotyp- Symmetrie	1. SAT- Index	2. SAT- Index
Nr. 1	105,42	3,76	3,02	4,43	68,17	57,50	0,50	0,38
Nr. 2	87,44	3,12	2,17	4,34	50,00	56,57	0,45	0,71
Nr. 3	85,76	3,06	2,07	3,86	53,63	57,00		
Nr. 4	80,14	2,86	1,79	3,96	45,20	53,64	0,19	0,30
Nr. 5	85,36	3,05	1,51	4,24	35,61	56,50	0,375	0,45
Nr. 6	86,70	3,10	1,69	4,43	38,15	58,51	0,32	0,62
Nr. 7	93,32	3,33	2,64	3,96	66,67	57,18	0,35	0,57
Nr. 8	101,00	3,61	1,98	4,71	42,04	56,28	0,47	0,505
Nr. 9	90,66	3,24	2,26	4,05	55,80	56,89	0,77	0,39
Nr. 10	84,46	3,02	2,60	3,77	59,95	56,21	0,435	0,55
Nr. 11	78,78	2,81	2,07	3,58	57,82	55,57	0,62	
Nr. 12	99,90	3,57	2,36	4,71	50,11	59,71	0,49	
Nr. 13	84,80	3,03	1,60	4,15	38,55	56,64	0,45	0,415
<b>Summe</b>	1163,74	41,56	27,76	54,19	661,7	738,2	5,42	4,89
<b>Mittelwert</b>	89,5184	3,1969	2,1353	4,1684	50,9	56,7846	0,4516	0,489
	<b>89,5</b>	<b>3,2</b>	<b>2,1</b>	<b>4,2</b>	<b>50,9</b>	<b>56,8</b>	<b>0,45</b>	<b>0,49</b>

Aus diesen ermittelten Daten lässt sich das Karyopolygon für *A. caryophyllea* darstellen (Abb. 3.21).

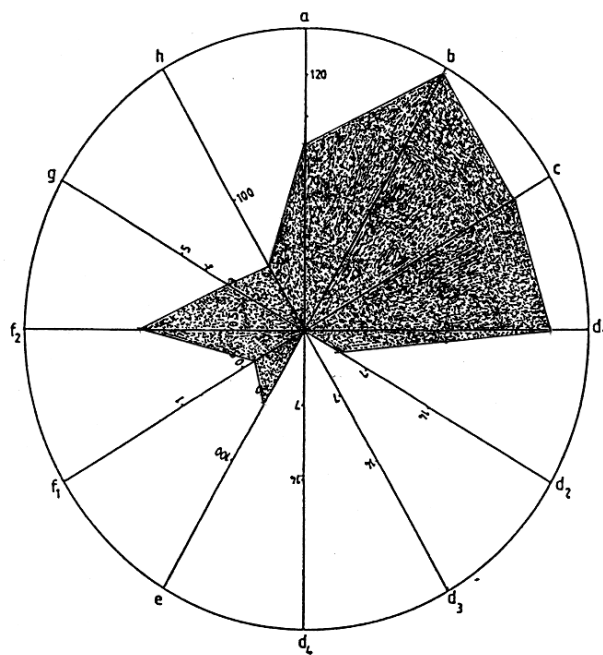


Abb. 3.21: Karyopolygon von *A. caryophyllea* (nach Werten aus Tabelle 3.11)



Für die Erstellung eines Idiogrammes wurden die Längen der homologen Chromosomenpaare 1-14 einer jeden ausgewerteten Metaphase-Platte zu einem Wert vereinigt (nach Mittelwertberechnung und Standardabweichung), nach dem auch das Karyopolygon erstellt wurde. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.12 dargestellt.

Tabelle 3.12: Durchschnittliche Chromosomendaten bei *A. caryophyllea*

Chromosomen-paar - Nr.	Relative Länge(%)	Länge in $\mu\text{m}$	Centromer-position	SAT-Index	Index der Sek. Einsch.
1	9,94	4,34	0,52		
2	8,63	3,77	0,55		
3	8,20	3,58	0,53		
4	8,20	3,58	0,58		
5	6,69	2,92	0,58		
6	7,12	3,11	0,58		
7	6,69	2,92	0,55		
8	6,48	2,83	0,53		
9	5,82	2,54	0,52		
10	5,18	2,26	0,50		
11	4,97	2,17	0,52		
12	7,33	3,20	0,62	0,45	
13	7,33	3,12	0,66	0,49	
14	7,56	3,30	0,69		

Die Darstellung der mittleren Chromosomen-Daten als Idiogramm ist in Abbildung 3.22 zu finden.

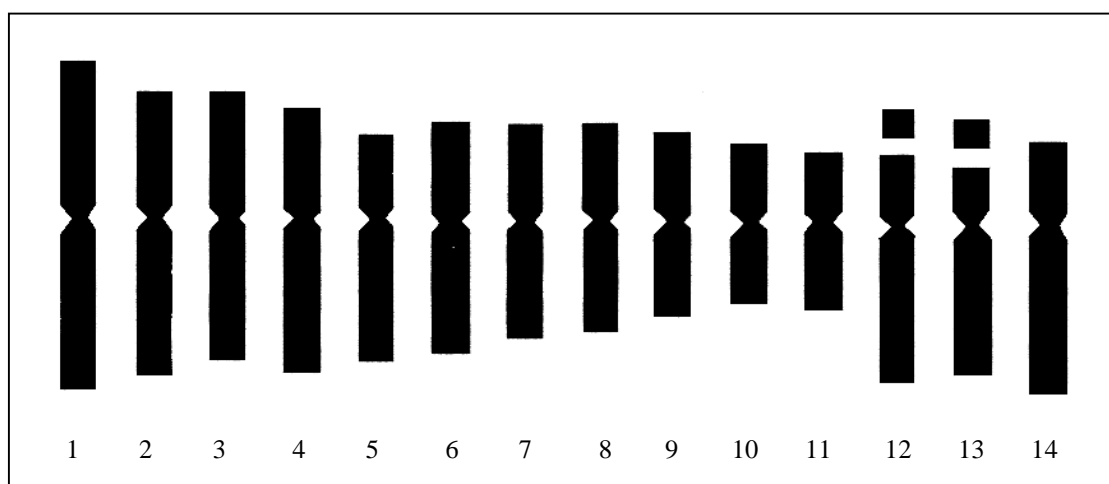


Abb. 3.22: Idiogramm von *A. caryophyllea*

Das Karyogramm von *A. caryophyllea* ist in der folgenden Abbildung 3.23 dargestellt.

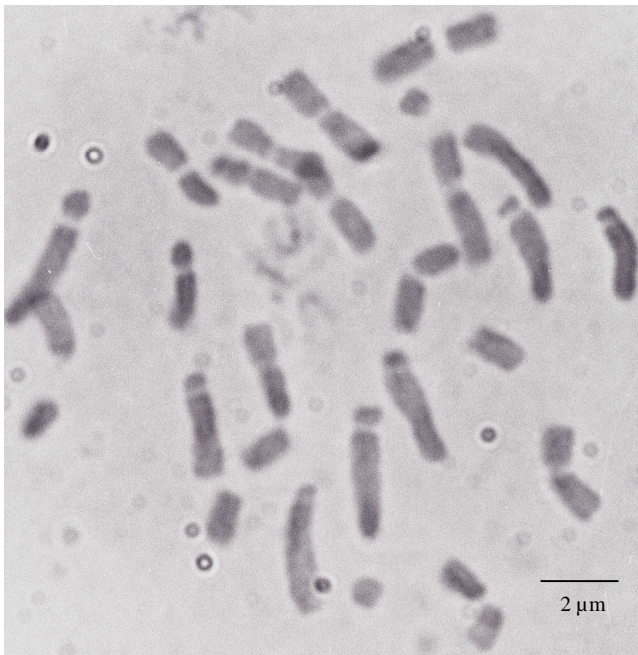


Abb. 3.23: Karyogramm von  
*A. caryophyllea* 18

### 3.2.1.6 *Aira multiculmis* Dum.

Die Daten aus der Auswertung von 15 Metaphase-Platten sind in der Tabelle 3.13 dargestellt.

Die Anzahl der Chromosomen der tetraploiden Art *A. multiculmis* beträgt  $2n = 28$ .

Die durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes liegt bei 101,4 µm.

Die Größe der Chromosomen variiert zwischen 2,2 µm und 5,2 µm, wodurch sich ein Größengradient von 44,3 ergibt (siehe Tabelle 3.13).

Die durchschnittliche Chromosomenlänge liegt bei 3,6 µm.

Der Index der Karyotypsymmetrie beträgt im Durchschnitt 54,5.

Der Chromosomensatz besteht aus 28 Chromosomen, die allesamt metacentrisch sind, d.h. mit medianer Centromerposition.

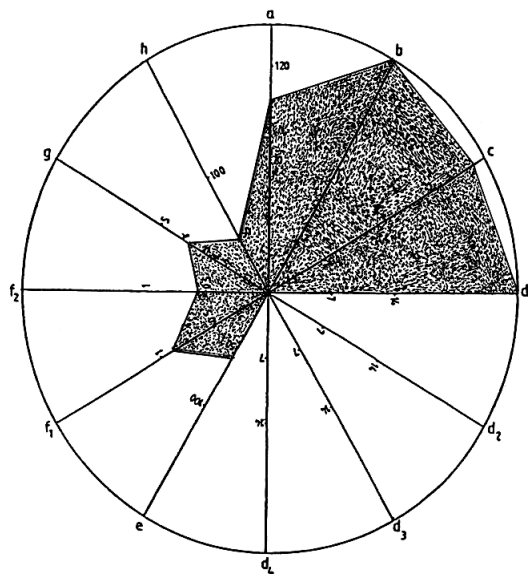
Es wurden bei allen untersuchten Platten stets ein Chromosomenpaar mit Satelliten gefunden, jedoch nur in der Hälfte der Fälle ein Paar mit sekundären Einschnürungen.

Diese tetraploide Art ist nach ALBERS (1978b) aus der alloautoployploiden Bildung zweier Arten des Karyotyps [A] entstanden und wird dem Karyotyp [AA] zugeordnet.

Tabelle 3.13: Mittelwerte und Einzelergebnisse der karyologischen Analysen von *A. multiculmis*

Proben.- Nr.	Genom- Gesamtlänge (2n) in $\mu\text{m}$	Durchschn. Chrom Länge ( $\mu\text{m}$ )	kürzestes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	längstes Chromosom ( $\mu\text{m}$ )	Größen- Gradient- Index	Index der Karyotyp- Symmetrie	SAT- Index	Index der sekundären Einschnürung
Nr. 1	78,24	2,79	1,79	4,43	40,41	55,18	0,50	
Nr. 2	77,44	2,76	1,88	3,86	48,70	55,20	0,44	
Nr. 3	101,38	3,62	2,26	5,28	42,80	55,46	0,505	0,56
Nr. 4	91,07	3,25	2,17	3,86	56,22	54,86	0,40	0,69
Nr. 5	89,12	3,18	1,88	4,62	40,69	55,32	0,44	
Nr. 6	105,36	3,76	2,54	4,52	56,19	55,11	0,47	
Nr. 7	98,58	3,52	2,26	5,18	43,63	54,28	0,33	0,585
Nr. 8	97,20	3,47	2,45	4,99	49,10	54,89	0,425	
Nr. 9	114,22	4,08	2,26	5,47	41,32	55,43	0,50	0,50
Nr. 10	81,98	2,93	1,60	4,43	36,12	54,71	0,585	0,525
Nr. 11	136,42	4,87	3,11	8,29	37,51	53,39	0,765	0,48
Nr. 12	115,14	4,11	2,83	5,09	55,60	53,43	0,655	
Nr. 13	77,84	2,78	1,51	4,05	37,28	53,50	0,67	
Nr. 14	126,08	4,50	3,02	6,50	46,46	53,78	0,50	
Nr. 15	130,82	4,67	2,26	6,79	33,28	52,96	0,61	
<b>Summe</b>	1520,89	54,29	33,82	77,36	665,31	817,5	7,795	3,34
<b>Mittelwert</b>	101,392	3,6193	2,2546	5,1573	44,354	54,5	0,5196	0,5566
	<b>101,4</b>	<b>3,6</b>	<b>2,2</b>	<b>5,2</b>	<b>44,3</b>	<b>54,5</b>	<b>0,52</b>	<b>0,56</b>

Aus diesen ermittelten Daten lässt sich das Karyopolygon für *A. caryophyllea* darstellen (Abb. 3.24).

Abb. 3.24: Karyopolygon von *A. multiculmis* (nach Werten aus Tabelle 3.13)

Für die Erstellung eines Idiogrammes wurden die Längen der homologen Chromosomenpaare 1-14 einer jeden ausgewerteten Metaphase-Platte zu einem Wert vereinigt (nach Mittelwertberechnung und Standardabweichung), nach dem auch das Karyopolygon erstellt wurde. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Tabelle 3.14: Durchschnittliche Chromosomendaten bei *A. multiculmis*

Chromosomenpaar - Nr.	Relative Länge(%)	Länge in $\mu\text{m}$	Centromerposition	SAT-Index	Index der Sek. Einsch.
1	9,36	4,75	0,55		
2	8,73	4,43	0,54		
3	8,25	4,19	0,53		
4	7,68	3,90	0,53		
5	7,31	3,71	0,56		
6	8,84	4,49	0,54		0,56*
7	8,57	4,35	0,57	0,52	
8	6,70	3,40	0,54		
9	6,85	3,48	0,52		
10	6,40	3,25	0,55		
11	5,97	3,03	0,53		
12	5,53	2,81	0,54		
13	5,12	2,60	0,54		
14	4,43	2,25	0,54		

Das \* bedeutet, dass nur in 50% der ausgewerteten Platten eine sek. Einschnürung zu finden war. Dennoch wurde der Mittelwert in diese Auswertung integriert.

Die Darstellung der mittleren Chromosomen-Daten als Idiogramm ist in Abbildung 3.25 zu finden.

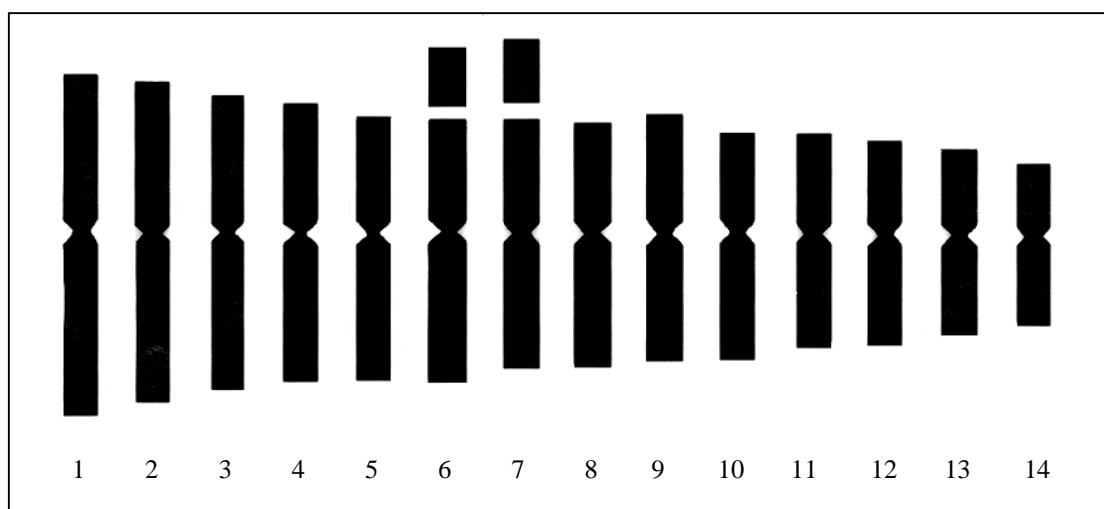


Abb. 3.25: Idiogramm von *A. multiculmis*

Das Karyogramm von *A. multiculmis* ist in der folgenden Abbildung 3.26 dargestellt.

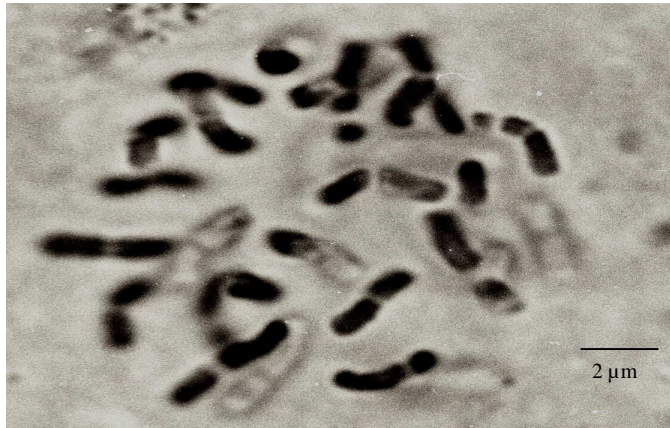


Abb. 3.26: Karyogramm von  
*A. multiculmis* 12

### 3.2.1.7 *A. provincialis* Jordan

Die tetraploide Art *A. provincialis* spielte im Rahmen der karyologischen Untersuchungen keine Rolle. Bei den noch zu besprechenden molekulargenetischen Arbeiten (Kapitel 3.3.1.2) hat jedoch die Verwendung der Herkunft *A. provincialis* 28 zu Verwirrung geführt. Einige wenige Metaphase-Platten wurden analysiert, um eindeutig den tetraploiden Charakter dieser Herkunft nachweisen zu können.

Die Anzahl der Chromosomen beträgt  $2n = 28$ . Die ermittelte Genomgesamtlänge liegt bei  $82,0 \mu\text{m}$ , die Größe der Chromosomen variiert zwischen  $1,9 \mu\text{m}$  und  $4,6 \mu\text{m}$ . Dadurch läßt sich ein Größengradient von  $41,3$  ermitteln. Der Index der Karyotypsymmetrie beträgt  $54,7$ . Alle 28 Chromosomen sind metacentrisch, ein Chromosomenpaar besitzt stets einen Satelliten. Weitere sekundäre Einschnürungen konnten nicht ermittelt werden

Das abgebildete Idiogramm (Abb. 3.27) zeigt einen homogenen, symmetrischen Karyotyp, den man dem Typ [AA<sup>4</sup>] nach STEINERT (1988) zuordnen kann.

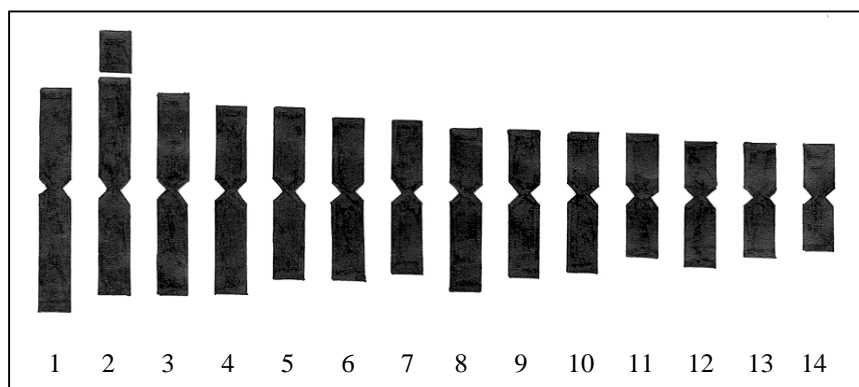


Abb. 3.27: Idiogramm  
von *A. provincialis* 28

### 3.2.2 Karyotyp-Vergleich

Die nachfolgenden Tabellen (Tab. 3.15 und 3.16) beinhalten die Ergebnisse aus den karyologischen Untersuchungen der zuvor behandelten einzelnen Arten, mit Ausnahme von *A. provincialis*. Durch die Darstellung in Form dieser Tabellen sind die wichtigsten und relevanten Daten der Karyotypen zusammengefasst, wodurch ein besserer Überblick über die Arten und einen Vergleich untereinander geschaffen wird.

Tabelle 3.15: Chromosomenwerte für die diploiden Arten

	<b>A. elegantissima</b>	<b>A. tenorei</b>	<b>A. cupaniana</b>	<b>A. praecox</b>
<b>Genomgesamtlänge</b>	43,2 µm	57,6 µm	50,8 µm	53,5 µm
<b>Chromosomengrößen-variation</b>	2,2 – 4,0 µm	2,9 – 5,5 µm	2,6 – 4,6 µm	2,7 – 4,8 µm
<b>Durchschnittliche Chromosomenlänge</b>	3,1 µm	4,1 µm	3,6 µm	3,8 µm
<b>Index der Karyotypsymmetrie</b>	54,7	54,9	54,2	59,6
<b>Beschreibung der Chromosomen</b>	7 m	7 m	7 m	5 m 2 sm
<b>SAT-Anzahl</b>	1 SAT-Paar	1 SAT-Paar	keine	1 SAT-Paar
<b>Sek. Einschnürung</b>	keine	keine	keine	1 Paar mit sek. Einschnürung

Tabelle 3.16: Chromosomenwerte für die tetraploiden Arten

	<b>A. caryophyllea</b>	<b>A. multiculmis</b>
<b>Genomgesamtlänge (µm)</b>	89,5 µm	101,4 µm
<b>Chromosomengrößen-variation</b>	2,1 – 4,2 µm	2,2 – 5,2 µm
<b>Durchschnittliche Chromosomenlänge</b>	3,2 µm	3,6 µm
<b>Index der Karyotypsymmetrie</b>	56,8	54,5
<b>Beschreibung der Chromosomen</b>	10-12 m 2-4 sm	14 m
<b>SAT-Anzahl</b>	2 SAT-Paare	1 SAT-Paar
<b>Sek. Einschnürung</b>	keine	z.T. 1 Paar mit sek. Einschnürung

Legende: m = metacentrisch; sm = submetacentrisch; SAT = Satelliten

Wie man anhand der Tabelle 3.15 bei den diploiden Arten sehen kann, unterscheiden sich die Daten bezüglich der Genomgesamtlänge mit Ausnahme von *A. elegantissima* nicht wesentlich voneinander. Die Gesamtlängen der vier diploiden Arten variieren zwischen 50,8  $\mu\text{m}$  bei *A. cupaniana* und 57,6  $\mu\text{m}$  bei *A. tenorei*. Die Art *A. praecox* besitzt eine Gesamtlänge des Genoms von 53,5  $\mu\text{m}$ , womit die Länge zwischen denen der beiden erst genannten Arten liegt. Einzig die ermittelte Länge von 43,2  $\mu\text{m}$  bei *A. elegantissima* liegt weit unter den anderen Werten.

Bezüglich des Index der Karyotypsymmetrie (Tab. 3.15), der einen symmetrischen bzw. asymmetrischen Karyotyp anzeigt, stimmen die drei dem Karyotyp [A] zugehörigen Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei* und *A. cupaniana* mit ihren fast identischen Werten überein. Die dem asymmetrischen Karyotyp [B] zugeordnete Art *A. praecox* zeigt mit einem Karyotypsymmetrie-Index von 59,6 einen höheren Wert.

Ein Vergleich der Chromosomengrößen zeigt, dass diese bei allen vier Arten im Schnitt übereinstimmen. Die durchschnittliche Chromosomenlänge (Tab. 3.15) ist ebenfalls bei allen vier Arten in einem ungefähr gleichen Bereich. Mit Ausnahme von *A. cupaniana* besitzen die beiden anderen dem Karyotyp [A] angehörigen Arten jeweils ein Chromosomenpaar mit Satelliten. Ebenso besitzt auch die Art *A. praecox* ein Chromosomenpaar mit Satelliten und zusätzlich ein Chromosomenpaar, welches eine sekundäre Einschnürung zeigt.

Betrachtet man die beiden tetraploiden Arten *A. caryophyllea* als Vertreter des Karyotyps [AB] und *A. multiculmis* als Vertreter des Karyotyps [AA] anhand ihrer Werte aus Tabelle 3.16 so fällt auf, dass *A. multiculmis* eine wesentliche größere Genomgesamtlänge aufweist als *A. caryophyllea*. Bezüglich des Karyotypsymmetrie-Index liegt *A. caryophyllea* bei 56,8 und *A. multiculmis* bei 54,5. Bei *A. caryophyllea* konnten stets die erwarteten zwei Satelliten-Chromosomenpaare gefunden werden, während bei *A. multiculmis* mit ihren 26 bis 28 metacentrischen Chromosomen immer nur ein Chromosomenpaar mit Satelliten vorhanden war.

Für die Beschreibung eines Karyotyps sind insbesondere die Genomgesamtlänge, sowie der Größengradient-Index, der Karyotypsymmetrie-Index und die Chromosomenzahl wichtige Indices.

Für die Erstellung eines Karyotyp-Vergleichs wurden die Art *A. praecox* mit dem Karyotyp [B], die Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei* und *A. cupaniana* mit dem Karyotyp [A] sowie die tetraploiden Arten *A. caryophyllea* mit dem Typ [AB] und *A. multiculmis* mit dem Karyotyp [AA] ausgewählt.

Von diesen sechs Arten wurden die oben genannten Indices verwendet und grafisch aufgetragen (Abb. 3.28).

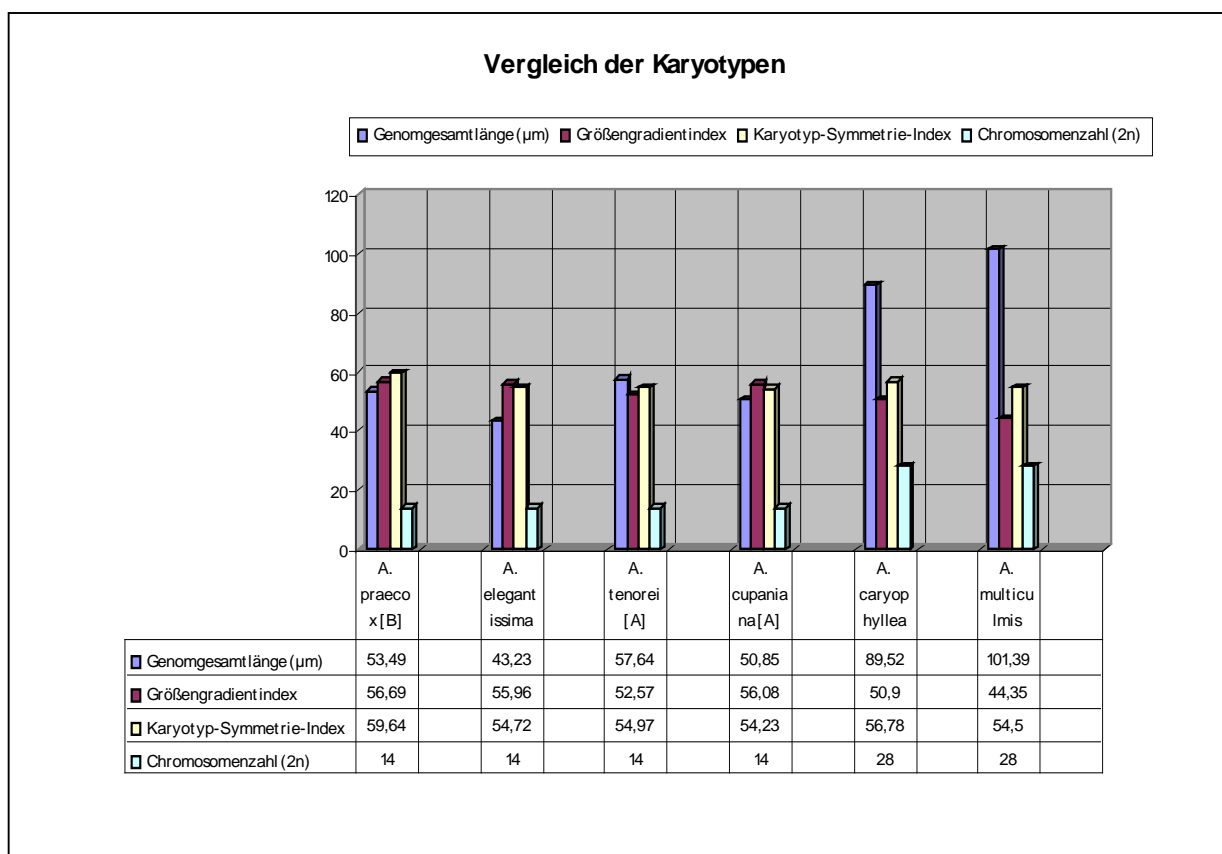


Abb. 3.28: Vergleich der einzelnen Karyotypen bei sechs Arten



Die Werte der Genomgesamtlängen bei den beiden tetraploiden Arten *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* sind fast doppelt so groß sind wie die der vier diploiden Arten (Abb. 3.28).

Die tetraploide *A. multiculmis* weist mit 54,5 einen ähnlichen Karyotypsymmetrie-Index auf wie die diploiden Arten *A. elegantissima* (54,7), *A. tenorei* (55,0) und *A. cupaniana* (54,2).

*A. multiculmis* mit dem Karyotyp [AA] ist mittels Alloautopolyploidie entstanden, d.h. durch Verdopplung des Chromosomensatzes von Arten des Grundtyps [A], ohne dass bisher Rückschlüsse auf die Ausgangsarten getroffen werden konnten. *A. multiculmis* wurde früher als Subspezies von *A. caryophyllea* angesehen, dann aber aufgrund der deutlichen Unterschiede im Karyotyp in den Rang einer eigenen Art erhoben. Den Auswertungen zufolge findet man bei *A. multiculmis* stets ein Chromosomenpaar mit Satelliten und in ca. 50% der untersuchten Metaphase-Platten noch eine zusätzliche sekundäre Einschnürung. Als diploide Ausgangsarten zeigen nur *A. elegantissima* und *A. tenorei* in ihrem Genom ein Chromosomenpaar mit Satelliten, so dass eine von beiden als „Satelliten-Geber“ in Betracht gezogen werden kann. Daraus läßt sich jedoch kein eindeutiger Beweis über die Beteiligung der diploiden Ausgangseltern treffen.

Bei den beiden Arten *A. caryophyllea* und *A. praecox* liegt ein asymmetrischer Karyotyp vor, der sich in einem höheren Index widerspiegelt. Dieser kommt zustande, da beide Arten einen geringen Anteil an metacentrischen Chromosomen aufweisen. Dennoch ist der Wert bei *A. caryophyllea* (56,8) niedriger als bei *A. praecox* (59,6). Erklärbar ist dies dadurch, dass *A. caryophyllea* im Zuge der allopolyploiden Bildung oder interspezifischen Hybridisierung 50% eher symmetrische Chromosomen des Karyotyps [A] erhält sowie 50% eher asymmetrische Chromosomen des Typs [B]. Der Karyotyp von *A. praecox* läßt sich somit in demjenigen von *A. caryophyllea* wiederfinden (ALBERS 1978b).

Erste Vermutungen bezüglich der beteiligten diploiden Art mit dem Karyotyp [A] konzentrieren sich auf *A. elegantissima*. Diese Art besitzt ebenso wie *A. praecox* ein Chromosomenpaar mit Satelliten. Da *A. caryophyllea* zwei SAT-Chromosomenpaare besitzt und nur eines von *A. praecox* als erste Ausgangsart stammt, könnte das zweite Paar von *A. elegantissima* weitergegeben werden. Auch die Betrachtung der jeweiligen Genomgesamtlänge der beiden potentiellen „Eltern“-Arten *A. praecox* und *A. elegantissima* deutet an, dass eine Addition beider Werte etwa der Genomgesamtlänge von *A. caryophyllea* entspricht.

### 3.2.3 DAPI-Anwendung

Die neben der Karmin-Färbung nach SNOW (1963) eingesetzte Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Unterstützung der karyologischen Untersuchungen konnte nicht zur verbesserten Visualisierung der Kerne beitragen. Da infolge der äußerlich nicht sichtbaren Anfärbung der Wurzelspitzen kein Hinweis auf gut gequetschte Chromosomen-Präparate erhalten werden konnte, haben sich die meisten Präparationen im Nachhinein als unzureichend gequetscht herausgestellt. Die Anfärbung mit DAPI war insofern erfolgreich, dass die Kern-DNA im Fluoreszenzmikroskop gut erkennbar waren. Da aber nur geringe Spreitungen vorlagen, konnten keine Karyotyp-Untersuchungen vorgenommen werden.

Aus diesem Grund wurde auf weitere Untersuchungen mit Hilfe der DAPI-Färbung verzichtet.

### 3.2.4 Verbreitung der Arten

Kenntnisse über die Verbreitung der Gattung *Aira* sind wichtig für ein mögliches Verständnis über die Entwicklung der Karyotypen. ALBERS (1980b) hat sich eingehend mit der Verbreitung der Arten auch im Hinblick auf ihre Karyotypen beschäftigt und auch STEINERT (1988) hat Verbreitungskarten für die Gattung zusammengestellt.

Gerade Aussagen über die Verbreitung der Chromosomenzahlen und im Idealfall der Karyotypen können aus diesem Grund wesentlich zum Verständnis eines Verwandtschaftskomplexes beitragen.

Die beiden nachfolgenden Abbildungen 3.29 und 3.30 zeigen die Verbreitungsgebiete der Gattung *Aira*, zum einen der diploiden und zum anderen der tetraploiden Karyotypen, damit ein besserer Überblick auch über mögliche Kontaktzonen geschaffen werden kann. Diese Kontaktzonen können eventuell Aufschluß über die Bildung der tetraploiden Arten liefern.

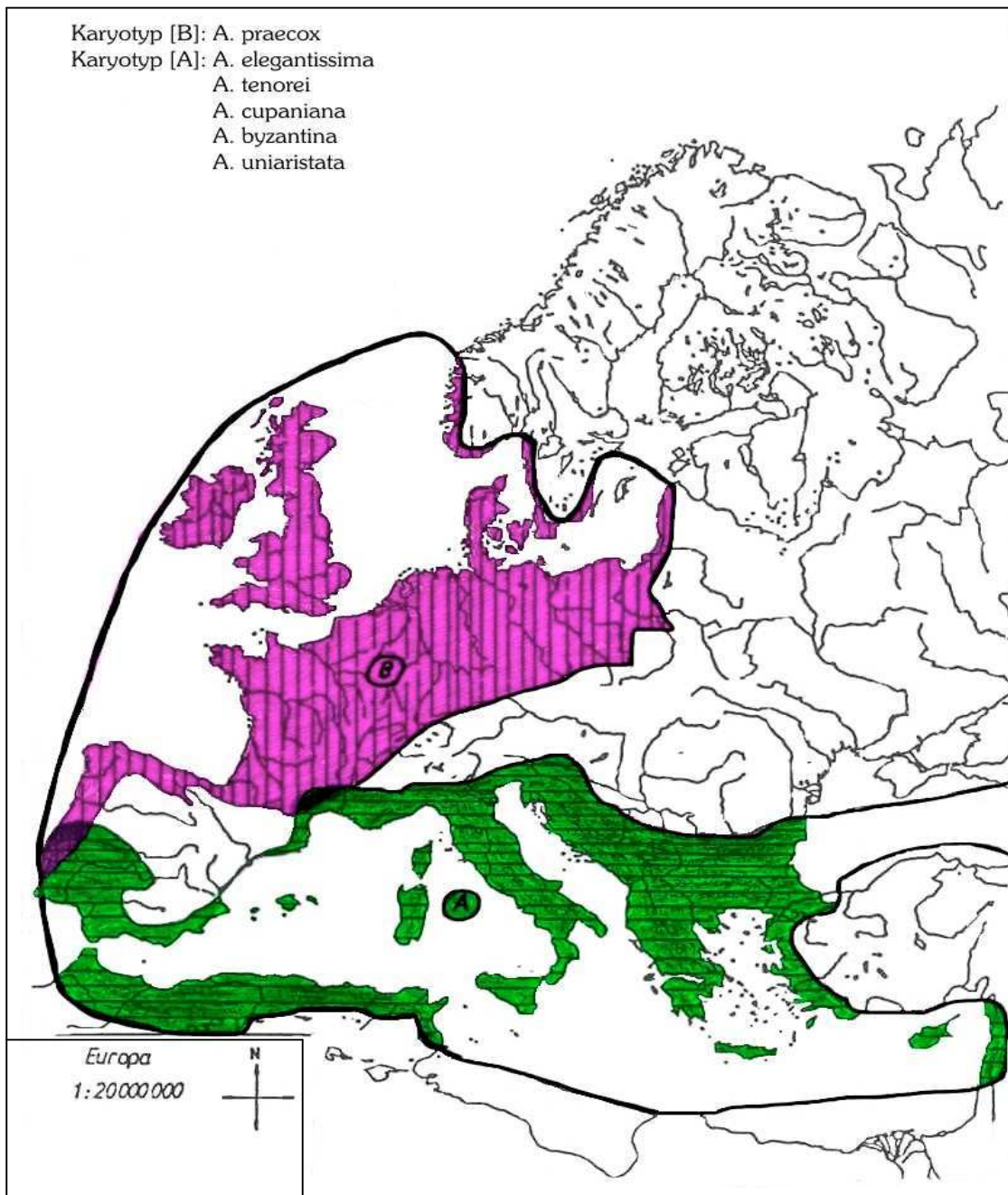


Abb. 3.29: Verbreitung der diploiden Karyotypen [A] und [B]  
(verändert nach STEINERT 1988)

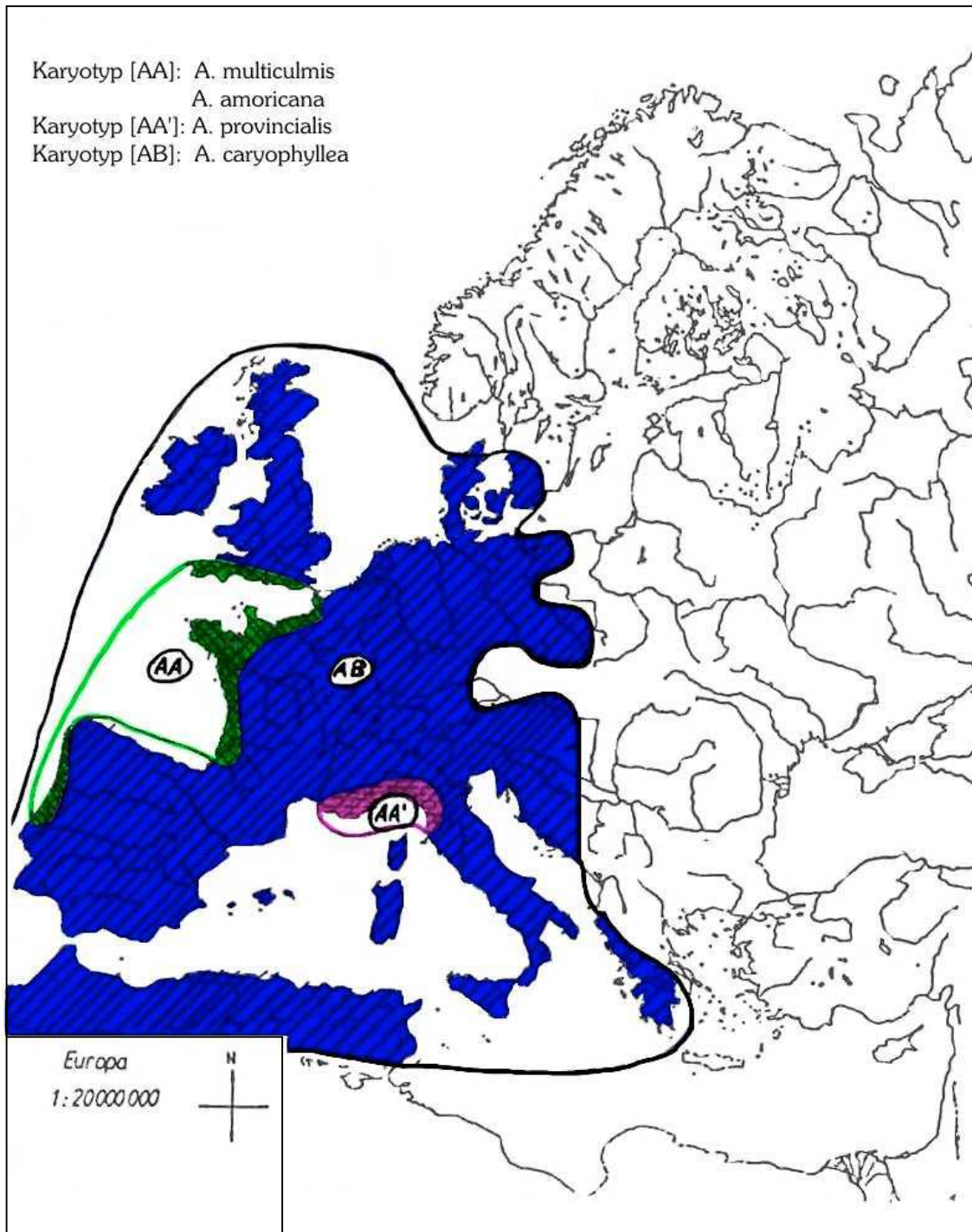


Abb. 3.30: Verbreitung der tetraploiden Karyotypen [AA], [AA'] und [AB]  
(verändert nach STEINERT 1988)

Wie man anhand der beiden Abbildungen (Abb. 3.29 und 3.30) erkennen kann, liegt der Verbreitungsschwerpunkt der meisten Arten der Gattung *Aira* in der Mediterraneis mit deutlicher Ausstrahlung nach Mitteleuropa.

Die mediterran verbreiteten Arten sind dabei den zwei Sektionen *Aira* (*Euaera*) und *Trichodaera* zuzuordnen (ALBERS 1980b).

In der westlichen Mediterraneis kommt die größte Anzahl diploider Arten vor, je weiter man das Gebiet nach Osten betrachtet, desto geringer wird die Artenzahl.

Innerhalb der *Airinae* stellt die Gattung *Aira* mit ihren einzelnen Vorkommen am Schwarzen Meer und im Kaukasus die am weitesten nach Osten vordringende Gattung dar.

Einige Arten zeigen eine deutliche Ausbreitungstendenz im atlantischen Gebiet, aber einzig die Art *A. praecox* mit dem Karyotyp [B] verlässt den mediterranen Einflussbereich (ALBERS 1980b), wie man anhand der Abbildung 3.29 gut erkennen kann.

Auf den beiden folgenden Abbildungen sind die jeweiligen diploiden (Abb. 3.31) und tetraploiden (Abb. 3.32) Arten mit ihrem Verbreitungsgebiet dargestellt. Hier werden die Arten nicht entsprechend ihrem Karyotyp zusammengefasst, sondern einzeln betrachtet.

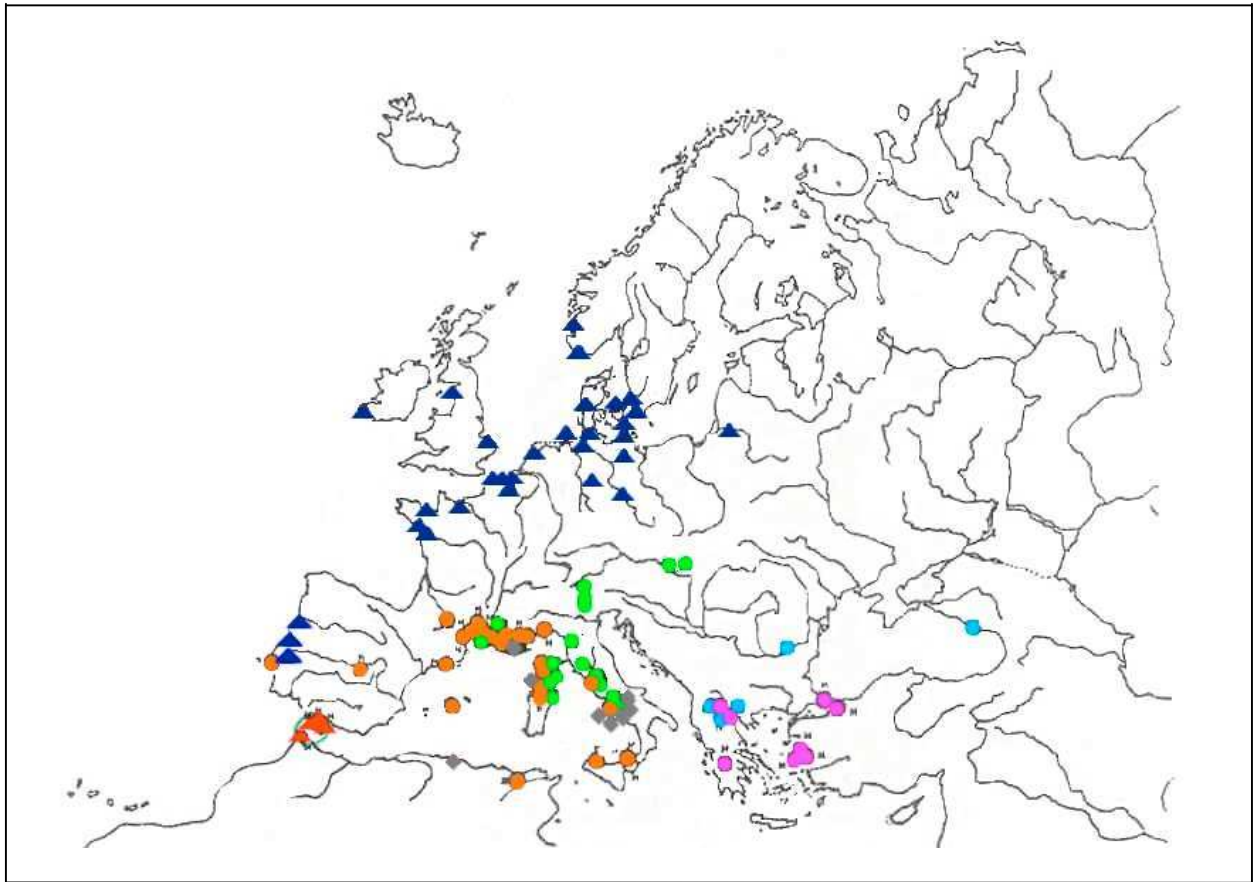


Abb. 3.31: Verbreitungsgebiete der diploiden Arten der Gattung *Aira* (verändert nach ALBERS 1979)

Legende:

- |   |   |
|---|---|
| <i>A. uniaristata</i> [A]                             | ▲ |
| <i>A. byzantina</i> [A]                               | ● |
| <i>A. elegantissima</i> ssp. <i>elegantissima</i> [A] | ● |
| <i>A. elegantissima</i> ssp. <i>scoparia</i> [A]      | ● |
| <i>A. cupaniana</i> [A]                               | ● |
| <i>A. tenorei</i> [A]                                 | ◆ |
| <i>A. praecox</i> [B]                                 | ▲ |



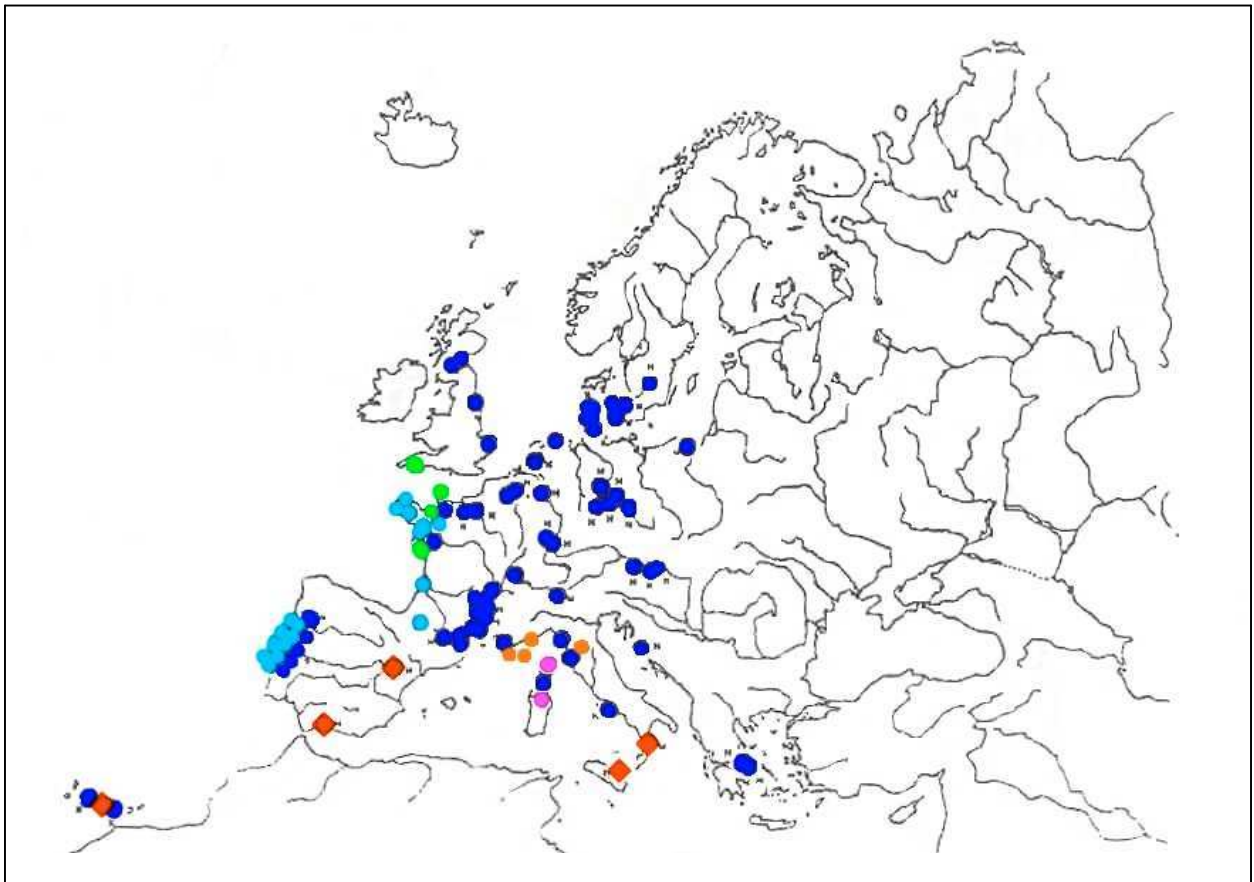


Abb. 3.32: Verbreitungsgebiete der tetraploiden Arten der Gattung *Aira* (verändert nach ALBERS 1979)

Legende:

- |  |   |
|--|---|
| <i>A. caryophyllea</i> ssp. <i>caryophyllea</i> [AB] | ● |
| <i>A. caryophyllea</i> ssp. <i>Edouardi</i> [AB]     | ◆ |
| <i>A. provincialis</i> [AA]                          | ● |
| <i>A. intermedia</i> [AA]                            | ● |
| <i>A. multiculmis</i> [AA]                           | ● |
| <i>A. armoricana</i> [AA]                            | ● |

Betrachtet man die Verbreitungskarten (Abb. 3.29 bis Abb. 3.32), kann man folgende Beobachtungen machen, die auch von ALBERS (1980b) und STEINERT (1988) dokumentiert wurden:

Nach Abb. 3.29 ist eine sehr deutliche Trennung der Verbreitungsgebiete der diploiden Arten mit dem Karyotyp [A] und dem Verbreitungsgebiet der ebenfalls diploiden Art *A. praecox* mit dem abgeleiteten Karyotyp [B] offensichtlich.

Das Areal der zur Sektion Trichodaera gehörenden *A. elegantissima* umfasst mit Sardinien und Korsika die Inseln des westlichen Mittelmeeres, weiter mit Italien die Apenninische Halbinsel sowie den nördlichen Balkan. Die Art erreicht jedoch im südlichen Teil der heutigen Tschechischen Republik ihre nördliche Grenze. Insgesamt ist das Verbreitungsgebiet von *A. elegantissima*, aufgeteilt nach den beiden vorkommenden Subspezies *elegantissima* und *scoparia*, nicht so weitreichend im Mittelmeerraum konzentriert, wie es beispielsweise bei *A. cupaniana* der Fall ist. Dafür dringt *A. elegantissima* besonders durch ihre Subspezies *scoparia* relativ weit gen Osten vor. Wenn man für diese Art nach möglichen Kontaktzonen mit *A. praecox* sucht, so kann man zweierlei Feststellungen machen.

Betrachtet man die Abbildung 3.29, in der die Verbreitungsgebiete allgemein nach ihren diploiden Karyotypen dargestellt sind, dann gibt es zwei mögliche Kontaktzonen zwischen den Karyotypen [A] und [B], die zum einen in Portugal und zum anderen in Südostfrankreich lokalisiert sind. Wenn man sich jedoch die Abbildung 3.31 anschaut, bei der die Arten einzeln mit ihren Verbreitungsgebieten dargestellt sind, so kann man keine Kontaktzonen zwischen *A. elegantissima* und *A. praecox* feststellen.

Das Verbreitungsgebiet für die diploide Art *A. praecox*, einziger Vertreter der Sektion Pycnaera, ist komplett auf den nördlichen bzw. gemäßigten atlantischen Raum ausgerichtet und dringt bis nach Skandinavien vor (Abb. 3.29). Dabei konzentriert sich die Ausbreitung auf die atlantischen Küstenregionen von Portugal aus bis nach Dänemark und Südnorwegen, einschließlich Fundorten in Irland und Großbritannien. Nach STEINERT (1988) erstreckt sich das Verbreitungsgebiet dieser Art noch relativ weit ins Inland von z.B. Frankreich, Belgien, Niederlanden und Deutschland und ist somit viel weitreichender als es den Angaben von ALBERS (1979) nach der Fall ist. Hiernach ist die Art *A. praecox* nicht bis nach Südostfrankreich zu verfolgen, wodurch sich keine Kontaktzone mit *A. elegantissima* ergibt.



*A. cupaniana* mit dem Karyotyp [A] aus der Sektion *Aira* ist im gesamten westlichen Mittelmeerraum verbreitet (Abb. 3.31). So findet man sie in Portugal, Spanien inklusive den Balearen, in Südostfrankreich, Korsika, sowie Italien mit ihren Inseln Sardinien und Sizilien. Durch ihr Vorkommen in Portugal zeigt sie deutliche atlantische Ausbreitungstendenzen. Dadurch kann man sie beispielsweise in Verbindung bringen mit der Art *A. praecox*, die in Portugal an das Gebiet von *A. cupaniana* stößt. Hier existiert eine mögliche Kontaktzone zwischen einer diploiden Art des Karyotyps [A] und der zum Karyotyp [B] gehörenden diploiden Art *A. praecox*.

Die aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten sehr eng mit *A. elegantissima* verwandte Art *A. tenorei* mit dem Karyotyp [A] kommt im mediterranen Raum rund ums Mittelmeer vor, dabei vor allem in Italien, auf den Inseln Korsika und Sardinien, weiter in Südostfrankreich, und ist mit Algerien auch auf dem afrikanischen Kontinent zu finden (Abb. 3.31).

Die beiden weiteren diploiden Vertreter des Karyotyps [A] *A. uniaristata* und *A. byzantina* zeigen ein eher eingeschränktes Verbreitungsgebiet. So ist *A. uniaristata* nur durch wenige Aufsammlungen rund um die Straße von Gibraltar belegt, dabei aber sowohl auf dem europäischen wie auch auf dem afrikanischen Kontinent zu finden (Abb. 3.31).

*A. byzantina* demgegenüber ist nach ihrem Vorkommen im ehemaligen byzantinischen Reich benannt, d.h. sie ist durch Aufsammlungen im heutigen Griechenland und in der heutigen Türkei belegt (Abb. 3.31).

Betrachtet man die beiden Karten zu den Verbreitungsgebieten der tetraploiden Arten (Abb. 3.30 und 3.32), so fällt folgendes auf: Insgesamt erstrecken sich die tetraploiden Arten über annähernd das gleiche Verbreitungsgebiet wie die diploiden Arten, dehnen sich aber noch weiter in den Mittelmeerraum aus, was vor allem an dem enorm großen Areal der Art *A. caryophyllea* mit dem Karyotyp [AB] liegt. Dies erstreckt sich nicht nur über den mediterranen Raum wie Griechenland, Italien, Portugal und Südostfrankreich, sondern die Art dringt weit nach Norden vor und ist in Mittel- und Nordeuropa bis hoch nach Skandinavien lokalisiert.

Damit ist sie neben der diploiden Art *A. praecox* die einzige, die so weit nördlich vordringt und man kann sagen, dass sich das heutige Areal von *A. caryophyllea* nahezu mit dem von *A.*

*praecox* besiedelten atlantischen Gebiet und mit dem Teil des Mittelmeerraumes, den die Sippen der Sektion *Aira* einnehmen, deckt.

Die Art *A. caryophyllea* hat sich als optimales Syntheseprodukt erwiesen, da sie sowohl die von den diploiden mediterranen Arten bevorzugten Biotop besiedelt als auch das Areal unter entsprechenden Klimabedingungen weit nördlich nach Mitteleuropa behaupten kann (Abb. 3.30). Hier zeigt sie jedoch oft eine relative Standortkonstanz mit einer Besiedelung auf offenen Sandböden und exponierten Hängen (ALBERS 1980b).

Die anderen tetraploiden Arten kommen überwiegend im westlichen Mittelmeerraum vor. Das Taxon *A. intermedia* mit dem Karyotyp [AA] weist bereits auf einen eventuellen intermediären Charakter hin und könnte nach morphologischen Befunden aus der Verbindung von *A. cupaniana* und *A. tenorei* hervorgegangen sein (ALBERS 1980b). Sie ist nur durch wenige Aufsammlungen auf Korsika und Sardinien belegt (Abb. 3.32).

Ein ähnlich kleines Verbreitungsgebiet zeigt die Art *A. provincialis*, die in der Abbildung 3.30 mit dem Karyotyp [AA'] dargestellt ist, und deren Gebiet sich auf die Region um Südostfrankreich und dem dort angrenzenden Teil Italiens beschränkt (Abb. 3.32).

Die Art *A. multiculmis* mit dem Karyotyp [AA] ist nach den Abbildungen 3.30 und 3.32 auf die Küstenregionen Portugals konzentriert und erstreckt sich von dort aus nördlich bis nach Westfrankreich in die Bretagne sowie den beiden Kanalinseln Guernsey und Jersey.

Die auf Südengland und die Bretagne beschränkte *A. armoricana* muss sich insgesamt aus Ökotypen von *A. multiculmis* entwickelt haben (Abb. 3.32).

### **3.3 Molekulargenetische Untersuchungen**

Die Rekonstruktion der Stammesgeschichte (Phylogenese) hat das Ziel, ein natürliches System der Organismen zu schaffen. Grundlage ist das von HENNIG (1950; 1966) erarbeitete Konzept der konsequent phylogenetischen Systematik, deren Ziel es ist, geschlossene Abstammungsgemeinschaften (Monophyla) zu finden.

Molekulare Merkmale sind grundsätzlich nicht anders zu bewerten als morphologische Merkmale. Da sie aber in höherer Zahl vorliegen als die morphologischen Merkmale führen sie zu einer wesentlichen Erweiterung des Spektrums an Informationen.

#### **3.3.1 DNA-Sequenzierungen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ITS-Region und die *trnL-F* Region von Arten der Gattung *Aira* (Poaceae) sequenziert und phylogenetisch ausgewertet. Das Alignment der Sequenzen findet sich im Anhang als Nexus-Format (Kapitel 7.3), wobei die Position der Regionen im Alignment markiert sind.

Ebenso wie bei der morphologischen Analyse wird anhand einer erstellten Merkmalsmatrix (siehe Kapitel 3.1) auch bei der molekulargenetischen Analyse durch DNA-Sequenzierungen für die Stammbaumrekonstruktionen ein sogenannter Außengruppenvergleich (*outgroup comparison*) nach HENNIG (1950) durchgeführt.

In diesem Zusammenhang wurden für die Untersuchungen an der ITS-Region des Kerngenoms (nrDNA) bekannte Sequenzen aus der GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) sowie aus der EMBL Nucleotide Sequence Database ([www.ebi.ac.uk/embl/](http://www.ebi.ac.uk/embl/)) von *Deschampsia cespitosa* (NCBI GenBank Akzessionsnummer L36513) sowie *Miscanthus sinensis* (EMBL MSI 426565) als *Outgroup* verwendet.

Die Untersuchungen an der *trnL-F* Region des Chloroplastengenoms wurden mit einer Sequenz von *Poa pratensis* (NCBI GenBank Akzessionsnummer AY061956) als *Outgroup* durchgeführt.

### 3.3.1.1 Chloroplastengenom – *trnL-F* Region

Das Alignment der Sequenzen ist im Nexus-Format (ab Seite 184) im Anhang zu finden. Insgesamt besteht das *trnL-F* Alignment aus 8 Taxa mit je 859 einbezogenen Charakteren (Nukleotid-Positionen), die alle gleich gewichtet werden.

Von diesen 859 Charakteren sind 728 Charaktere konstant, 116 variable Charaktere sind parsimony-uninformativ und nur 15 Charaktere sind parsimony-informativ.

Als informative Stelle wird eine Nukleotid-Position bezeichnet, wenn sie mindestens zwei unterschiedliche Nukleotide in mindestens zwei Sequenzen aufzeigt (TOULOU MENIDOU 2001). Es wurde eine „ungewichtete“ Parsimony-Analyse durchgeführt, bei der die heuristische Suche insgesamt 15 MPTs (*Most Parsimonius Trees*) mit einer Länge von 143 Schritten ergeben hat. Das Phylogramm von einem MPT, welches die Merkmalsunterschiede zeigt, ist in Abb. 3.33 dargestellt. Für die MPTs gelten: Consistency-Index (CI) = 0,951, Retention-Index (RI) = 0,562.

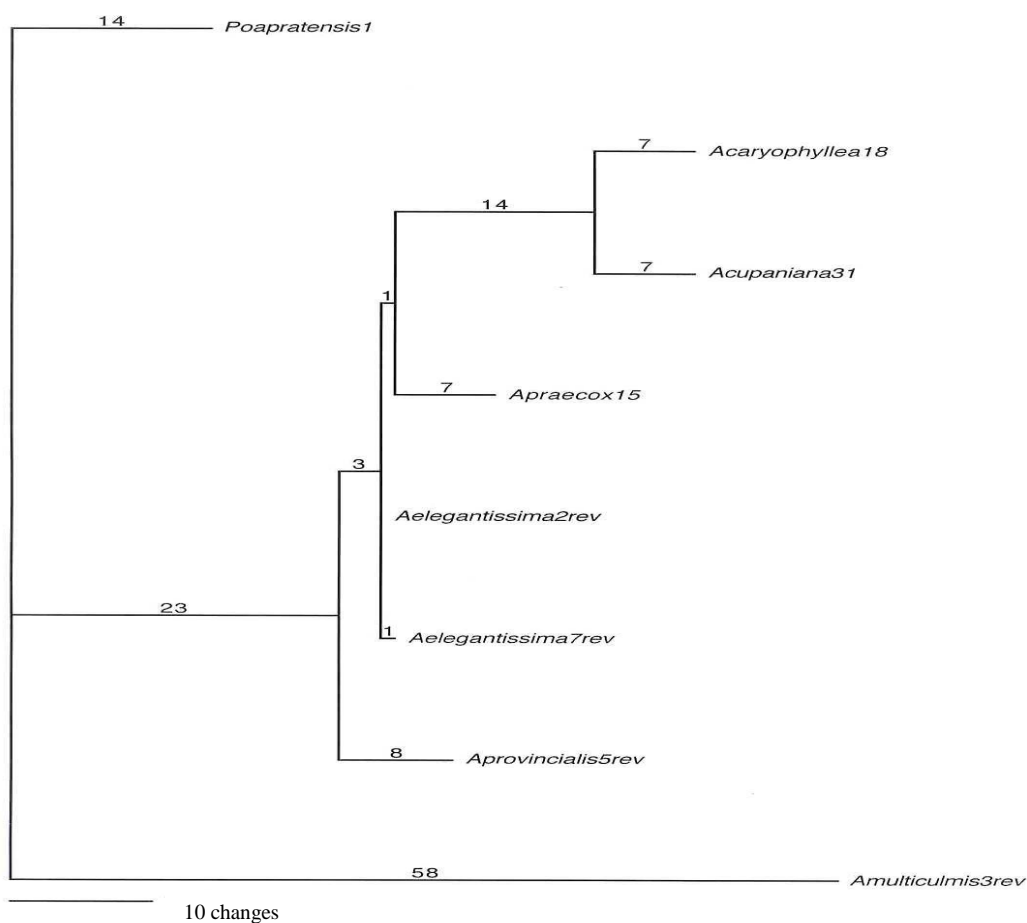


Abb. 3.33: Ein Phylogramm von den 15 MPTs. Länge = 143, CI = 0,951, RI = 0,562.

Nach diesem Phylogramm (Abb. 3.33) tritt neben *Poa pratensis* 1 auch *A. multiculmis* 3 als *Outgroup* hervor, wobei diese insgesamt sogar mehr Veränderungen (*changes*) zeigt. Die übrigen untersuchten Arten gruppieren sich zusammen, weisen aber keine sinnvolle Claden-Bildung auf.

Von diesen 15 MPTs wurde der *Semistrict Consensus Tree* entwickelt (Abb. 3.34).

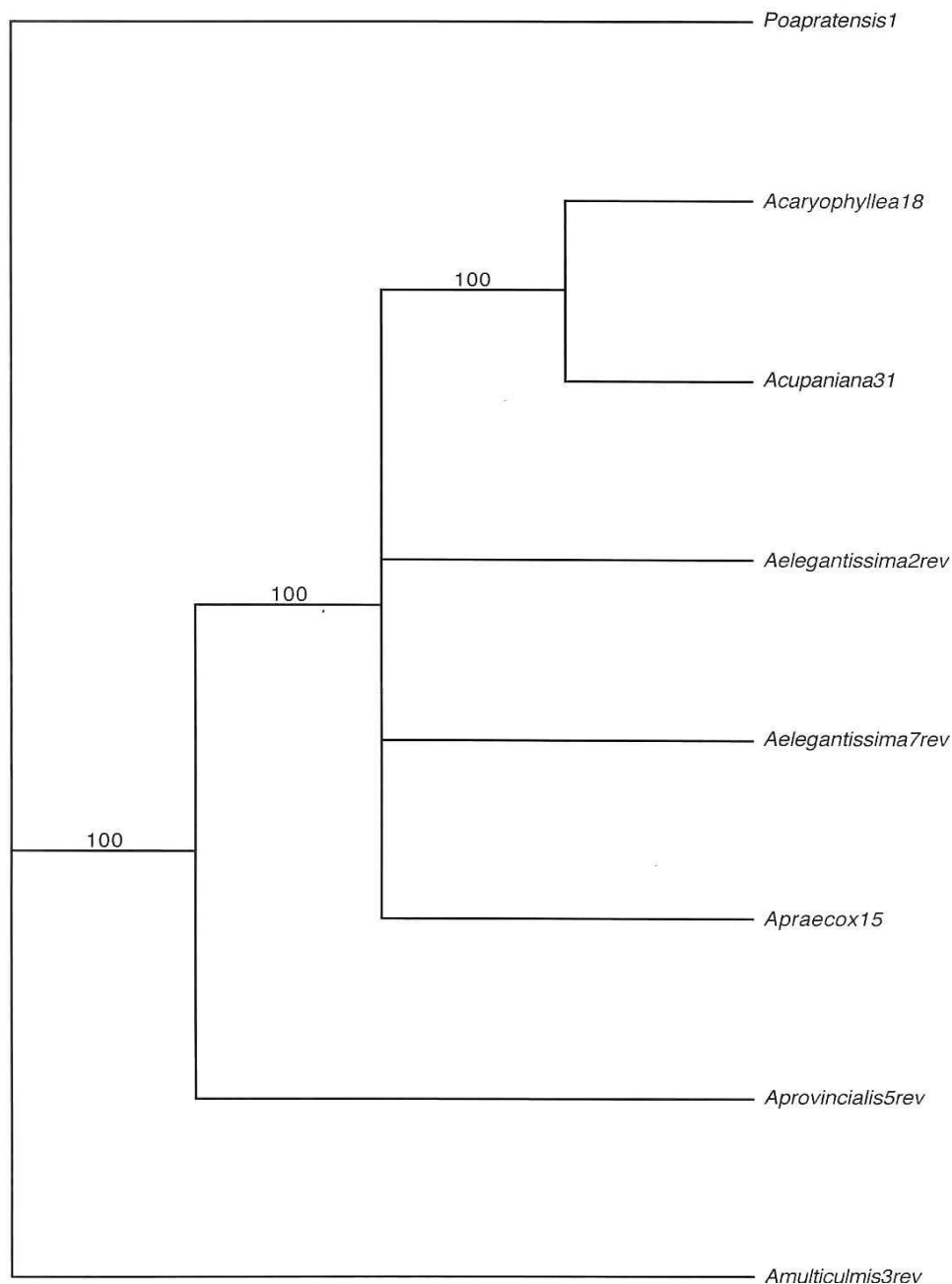


Abb. 3.34: *Semistrict Consensus*-Baum von 15 MPTs. Mit 100 wird die Gruppierung der Arten bezeichnet, die bei allen 15 MPTs vorhanden ist.

Auch in der Abb. 3.34 ist *A. multiculmis* 3 neben *Poa pratensis* 1 als *Outgroup* angeordnet. Es zeigt sich eine vergleichbare Gruppierung zu Abb. 3.33.

Um die Stabilität der Gruppierung zu ermitteln, ist sowohl eine *Bootstrap*-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt worden, sowie ebenfalls eine *JackKnife*-Analyse mit 1000 Replikaten und 37% Deletion der Charaktere pro Replikat (Abb. 3.35).

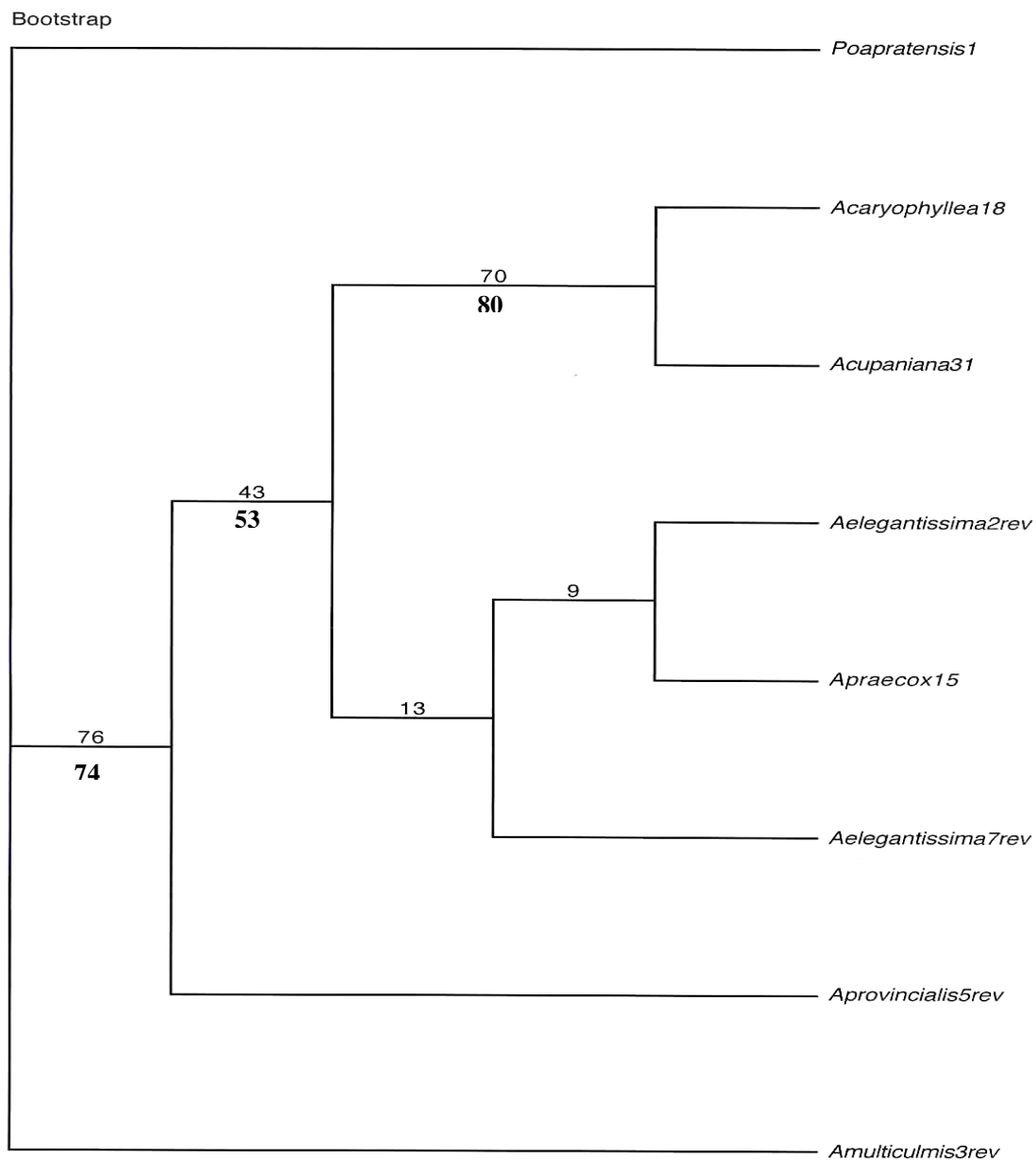


Abb. 3.35: *trnL-F Bootstrap*-Baum.

Die Zahlen über den Ästen entsprechen den *Bootstrap*-Werten.

Die Zahlen unterhalb der Äste entsprechen den *JackKnife*-Werten.

Anhand Abb. 3.35 wird deutlich, dass die Sequenzen der *trnL-F* Region aufgrund ihrer großen Übereinstimmung im Alignment nicht sehr informativ sind. Dies spiegelt sich nicht nur in der Anordnung von *A. multiculmis* 3 als *Outgroup* neben *Poa pratensis* 1 wider, sondern auch in der wenig sinnvollen Claden-Bildung von *A. caryophyllea* und *A. cupaniana* einerseits und von *A. elegantissima* und *A. praecox* andererseits (Abb. 3.35).

Die *Bootstrap*- und *JackKnife*-Werte (Abb. 3.35) liefern diesbezüglich auch nur eine sehr schwache Unterstützung der Gruppierungen.

Weiterhin wurde eine *Maximum Likelihood*-Analyse durchgeführt. Für diese Analyse wurde vom Programm MODELTEST das Modell TrN+I (*Transitional model with consideration of substitution rate heterogeneity across sites*, TAMURA & NEI 1993) vorgeschlagen und verwendet. Die Einstellungen für die ML-Analyse sind der Tabelle 3.17 zu entnehmen.

Tabelle 3.17: ML-Einstellungen nach dem vorgeschlagenen Modell TrN+I (*Transitional model with consideration of substitution rate heterogeneity across sites*)

Base Frequencies	Rate Matrix	-lnL = 1833.2023, mit L = Likelihood-Wert
freq A = 0.3277	R (a) [A – C] = 1.0000	I = 0.4378
freq C = 0.1688	R (b) [A – G] = 2.9977	
freq G = 0.1574	R (c) [A – T] = 1.0000	
freq T = 0.3461	R (d) [C – G] = 1.0000	
	R (e) [C – T] = 2.0088	
	R (f) [G – T] = 1.0000	

Die Analyse nach der *Maximum Likelihood*-Methode hat einen *Semistrict Consensus*-Baum mit der gleichen Topologie wie bei der *Maximum Parsimony*-Analyse ergeben, deshalb wird er hier nicht dargestellt. Auch bei der ML-Methode wurde zur Überprüfung der Robustheit der Äste eine *Bootstrap*-Analyse durchgeführt. Das *ML-Bootstrap*-Kladogramm zeigt die gleiche Gruppierung wie das *MP-Bootstrap*-Kladogramm, so dass auf dessen Abbildung ebenfalls verzichtet wird.

### 3.3.1.2 Kerngenom – ITS-Region

Mit der Sequenzierung der Regionen ITS1, 5.8S und ITS2 wurden insgesamt über 75% der gesamten ITS-Region (TOULOU MENIDOU 2001) bei Arten der Gattung *Aira* sequenziert. Das Alignment, welches als Nexus-Format im Anhang (Seite 187) zu finden ist, besteht aus 13 Taxa mit jeweils 825 einbezogenen Charakteren, die alle gleich gewichtet sind. Von diesen 825 alignierten Nukleotiden sind 620 Charaktere (Nukleotid-Positionen) konstant, während 140 variable Charaktere parsimony-uninformativ und 65 Charaktere parsimony-informativ sind. Im Rahmen der *Maximum Parsimony* (MP)-Analyse wurde eine heuristische Suche mit 100 Replikaten durchgeführt. Diese hat 40 MPTs ergeben, von denen einer als Phylogramm in Abb. 3.36 dargestellt ist. Die Baum-Länge beträgt 251 Schritte, der Consistency-Index (CI) liegt bei 0,892 und der Retention-Index (RI) bei 0,797.

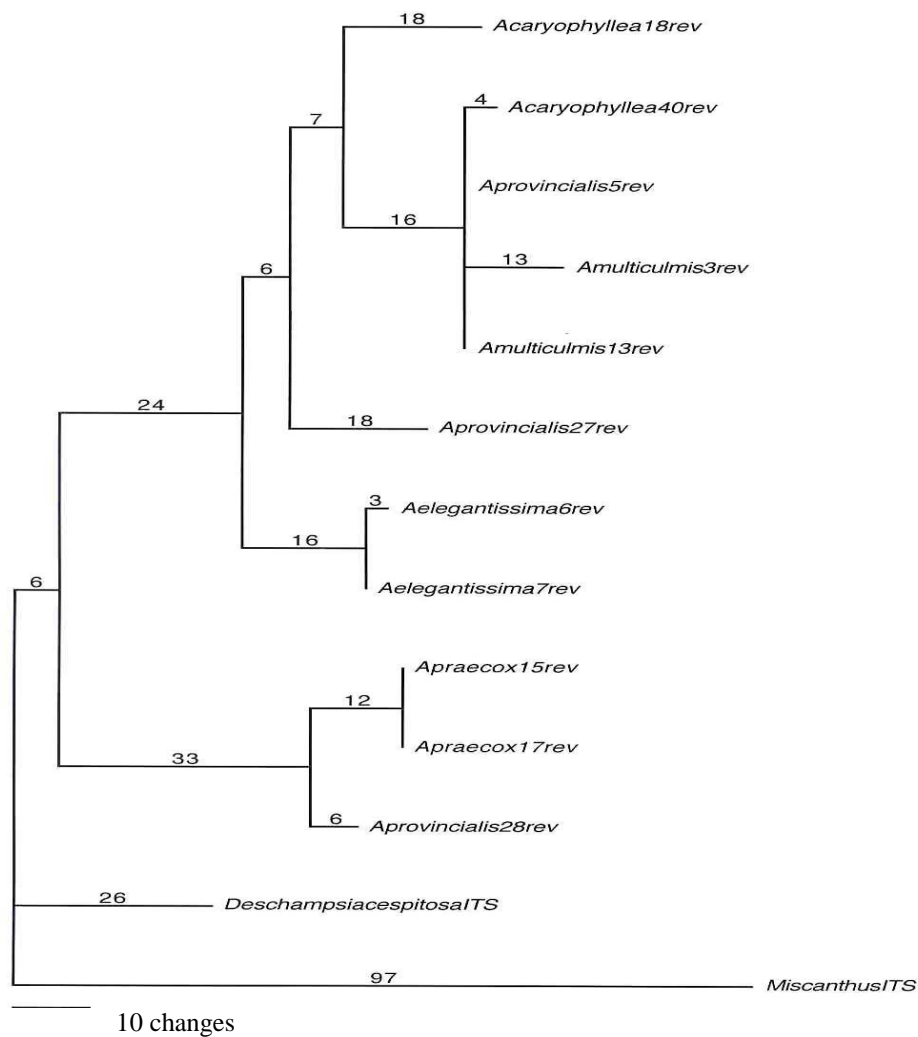


Abb. 3.36: Ein Phylogramm von den 40 MPTs. Länge = 251, CI = 0,892, RI = 0,797.



Aus diesen 40 MPTs wurde durch die Consensus-Methode der „50%-igen Mehrheitsregel“ („50% majority rule consensus tree“) ein Baum erstellt (Abb. 3.37).

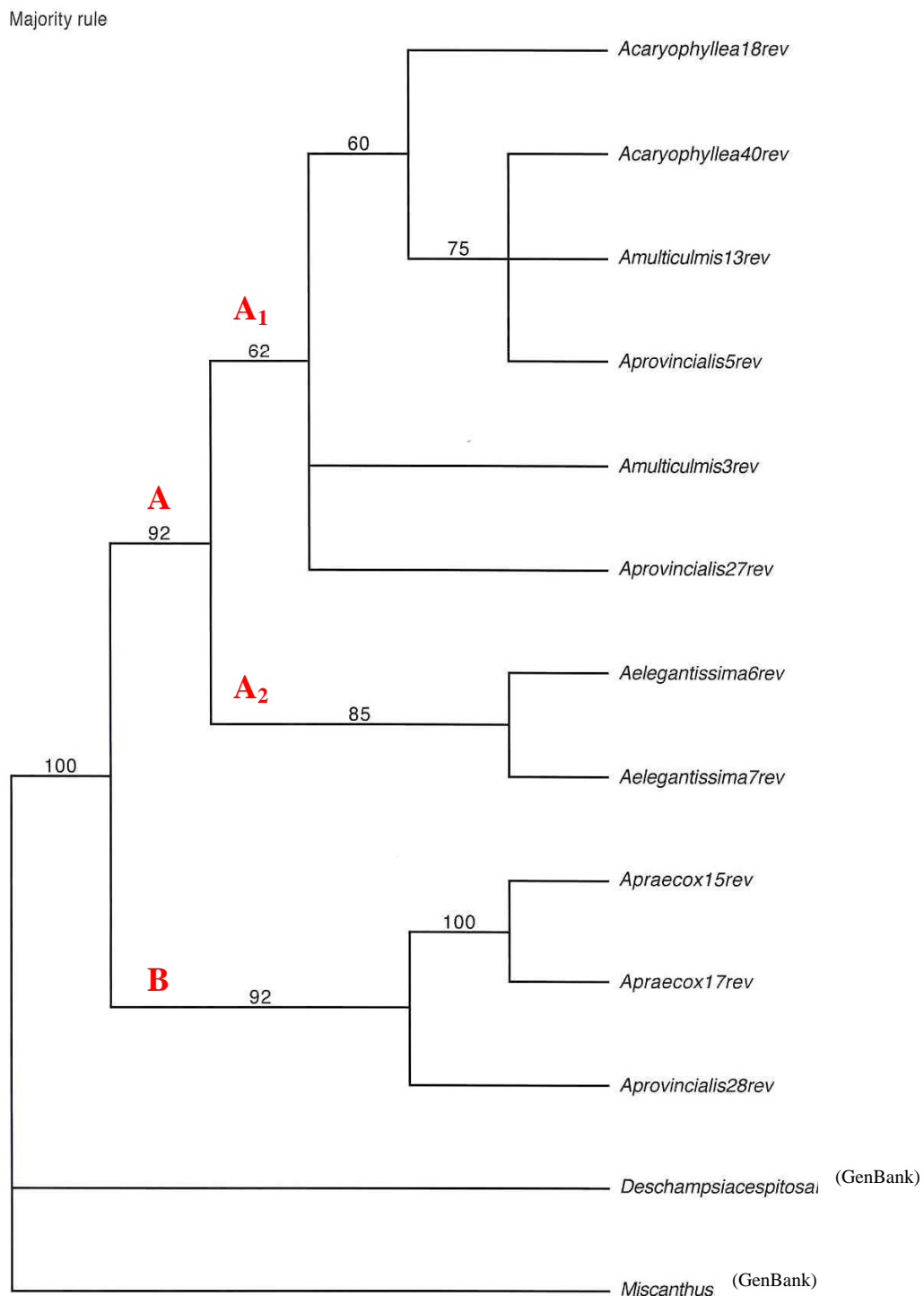


Abb. 3.37: Majority Rule Consensus-Baum von 40 MPTs. Mit 100 wird die Gruppierung der Arten bezeichnet, die bei allen 40 MPTs vorhanden ist.

Der *Majority Rule Consensus*-Baum (Abb. 3.37) repräsentiert ein Mehrheitsregel-Schema, in dem ein größerer Prozentsatz der Verwandtschaftsbeziehungen eindeutig bestimmt ist. Die Arten der Gattung *Aira* ordnen sich zusammen, und der hohe unterstützende Wert von 100% spricht für eine monophyletische Gruppierung. Es bilden sich die beiden Claden A und B, von denen die erste in zwei weitere Subcladen unterteilt werden kann.

Um die Verlässlichkeit des *Majority Rule Consensus*-Baumes zu überprüfen, wurde eine *Bootstrap*-Analyse (FELSENSTEIN 1985) auf Grundlage einer heuristischen Suche mit 1000 Replikaten sowie eine *JackKnife*-Analyse (FARRIS *et al.* 1996) mit 1000 Replikaten und 37% Charakter-Deletion pro Replikat durchgeführt (Abb. 3.38).

Wie man anhand des *Bootstrap*-Baumes in Abb. 3.38 erkennen kann, haben sich die zwei Claden A und B gebildet. *Deschampsia cespitosa* und *Miscanthus* bilden mit ihren Sequenzen aus der GenBank die *Outgroups*.

Die Clade A wird von relativ niedrigen *Bootstrap*- und *JackKnife*-Werten (51 bzw. 59%) unterstützt und kann in die zwei Subcladen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> unterteilt werden, zu denen *A. multiculmis* 3 ein Schwestertaxon darstellt. Es finden sich weitere Aufteilungen in dieser Gruppe, die jedoch selten von hohen Werten unterstützt werden. Dies spricht für eine eher geringe Stabilität der Äste.

Die Subclade A<sub>1</sub> besteht gänzlich aus tetraploiden Arten, dabei sowohl Angehörige des Karyotyps [AB] mit *A. caryophyllea* als auch Angehörige des Karyotyps [AA] mit *A. multiculmis* und *A. provincialis*.

Die beiden untersuchten Herkünfte der Art *A. elegantissima* bilden, von einem niedrigen *Bootstrap*-Wert unterstützt, die Subclade A<sub>2</sub>. Die Zugehörigkeit zu dieser Subclade läßt sich mit der engen Verwandtschaft der diploiden *A. elegantissima* zu den tetraploiden Arten der Subclade A<sub>1</sub> belegen. Man könnte eine Beteiligung des Genoms von *A. elegantissima* an den Genomen von *A. caryophyllea*, *A. multiculmis* sowie *A. provincialis* vermuten.

Die Clade B wird durch höhere *Bootstrap*- und *JackKnife*-Werte (67 bzw. 74%) unterstützt als die Clade A. Die Gruppierung der beiden Herkünfte der Art *A. praecox* wird mit 99 bzw. 100% belegt.

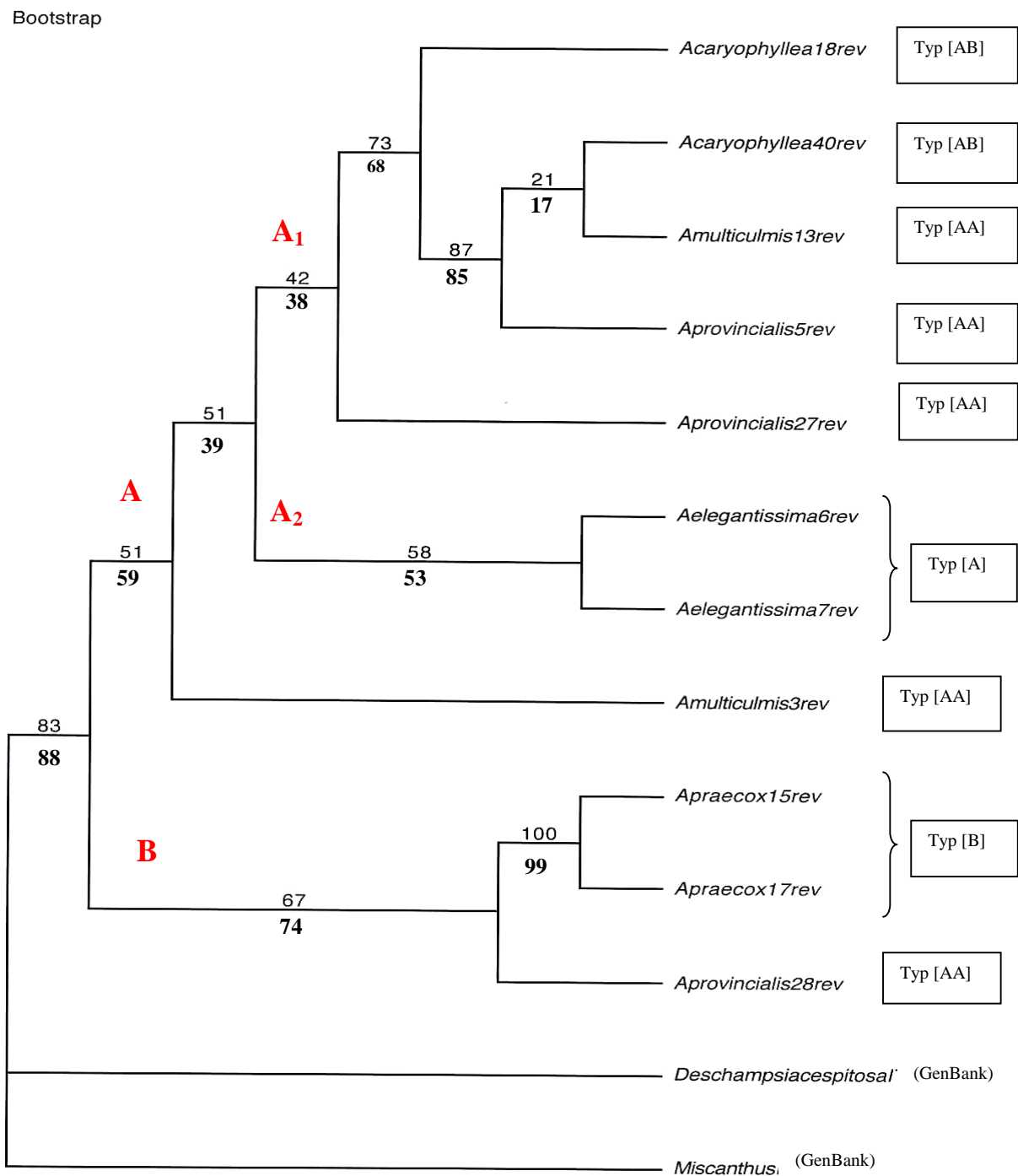


Abb. 3.38: ITS-Bootstrap-Baum. Die Zahlen über den Ästen entsprechen den *Bootstrap*-, die Zahlen unterhalb der Äste den *JackKnife*-Werten.

Die Zugehörigkeit von *A. provincialis* 28 zu der Clade B zusammen mit den beiden Taxa von *A. praecox* ist eher erstaunlich, da sie als tetraploide Art zu der Subclade A<sub>1</sub> gehören sollte wie die beiden untersuchten Herkünfte *A. provincialis* 5 und *A. provincialis* 27.

Eine karyologische Untersuchung von *A. provincialis* 28 (siehe 3.2.1.7) hat jedoch eindeutig die Zuordnung zu dem tetraploiden Karyotyp [AA'] ergeben, so dass eine mögliche Fehlbestimmung ausgeschlossen werden kann.

Letztendlich kann man sagen, dass die Ergebnisse der ITS-Untersuchungen bessere Informationen geliefert haben als die der *trnL*-F Region, was durch mehr Divergenzen im Alignment zu erklären ist. Dennoch sind die Ergebnisse der Sequenzierungen innerhalb der Gattung *Aira* nicht zufriedenstellend und lassen keine überzeugenden Rückschlüsse auf die Ausgangsfragen im Rahmen dieser Arbeit zu.

Wie bei der Analyse der *trnL*-F Region des Chloroplastengenoms wurde auch bei der ITS-Region zusätzlich zur *Maximum Parsimony*-Methode eine zweite kladistische Analyse mit dem *Optimality* Kriterium *Maximum Likelihood* durchgeführt.

Hier hat das Programm MODELTEST das Modell GTR+G (*General time-reversible model with rate heterogeneity: gamma shape parameter*, RODRÍGUEZ *et al.* 1990) vorgeschlagen, dessen Einstellungen in der nachfolgenden Tabelle 3.18 dargestellt sind.

Tabelle 3.18: ML-Einstellungen nach dem vorgeschlagenen Modell GTR+G (*General time-reversible model with rate heterogeneity: gamma shape parameter*)

Base Frequencies	Rate Matrix	-lnL = 2311.1758, mit L = <i>Likelihood</i> -Wert
freq A = 0.2123	R (a) [A – C] = 1.1283	G = 0.5302
freq C = 0.3000	R (b) [A – G] = 2.8252	
freq G = 0.3000	R (c) [A – T] = 1.8301	
freq T = 0.1877	R (d) [C – G] = 0.4897	
	R (e) [C – T] = 5.8983	
	R (f) [G – T] = 1.0000	

Die Analyse nach der *Maximum Likelihood*-Methode hat keine identische Topologie des *Majority Rule Consensus*-Baum (Abb. 3.39) ergeben, wie sie nach der *Maximum Parsimony*-Methode (Abb. 3.37) dargestellt wurde.

So kommt es zu einer leicht veränderten Gruppierung der Arten, die stets durch hohe Werte unterstützt wird.

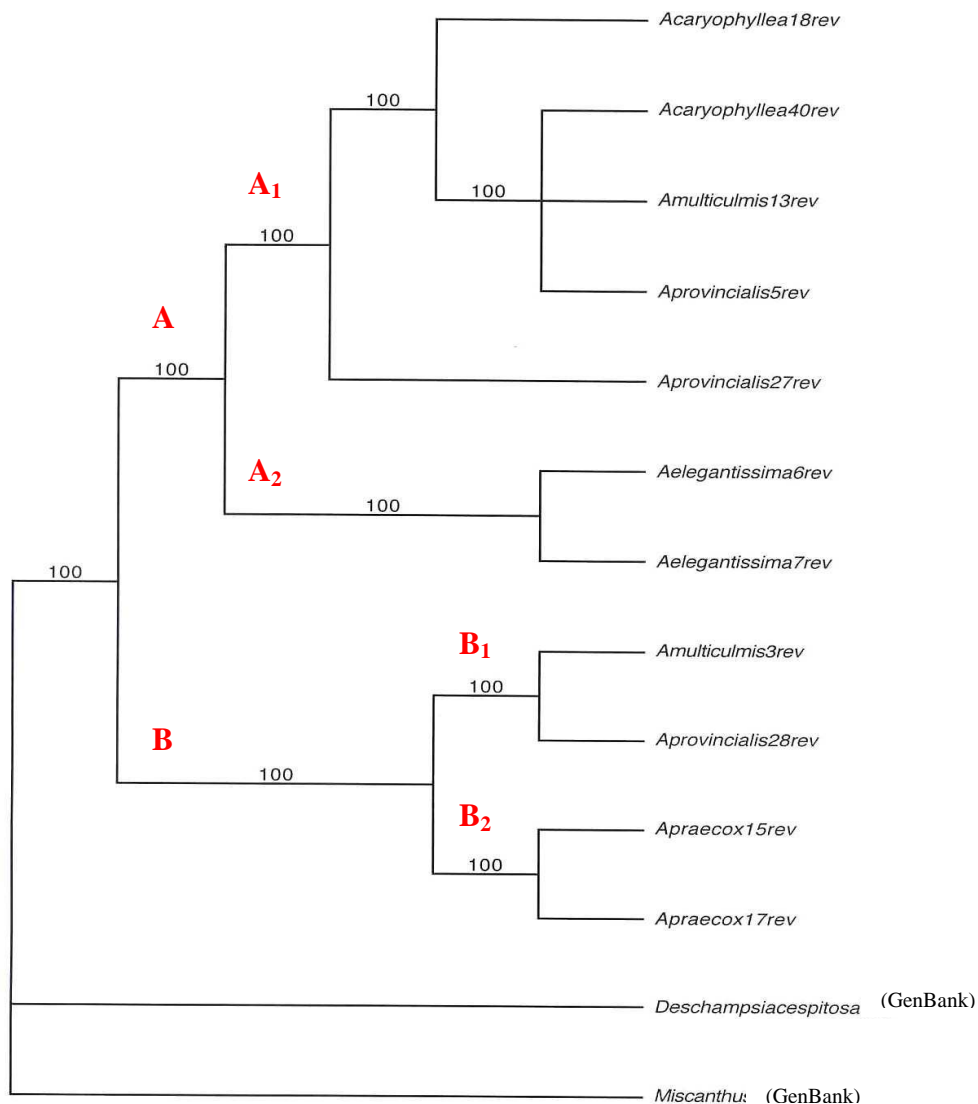


Abb. 3.39: *Majority Rule Consensus*-Baum nach der ML-Analyse.

Die Monophylie der Gattung *Aira* kann auch durch die ML-Analyse bestätigt werden. Die Unterteilung in die Claden A und B ist ebenfalls vorhanden. Die Zusammensetzung der Subclade A<sub>1</sub> ist mit Ausnahme von *A. multiculmis* 3 identisch. Dieses Taxon findet sich nach

der ML-Analyse jedoch in der Clade B, wo es zusammen mit *A. provincialis* 28 die Subclade B<sub>1</sub> bildet.

Um die Verlässlichkeit der Äste zu überprüfen, wurde eine *ML-Bootstrap-Analyse* durchgeführt. Das Kladogramm (Abb. 3.40) zeigt ebenfalls eine leicht veränderte Topologie zu dem Kladogramm der *MP-Bootstrap-Analyse* (Abb. 3.38).

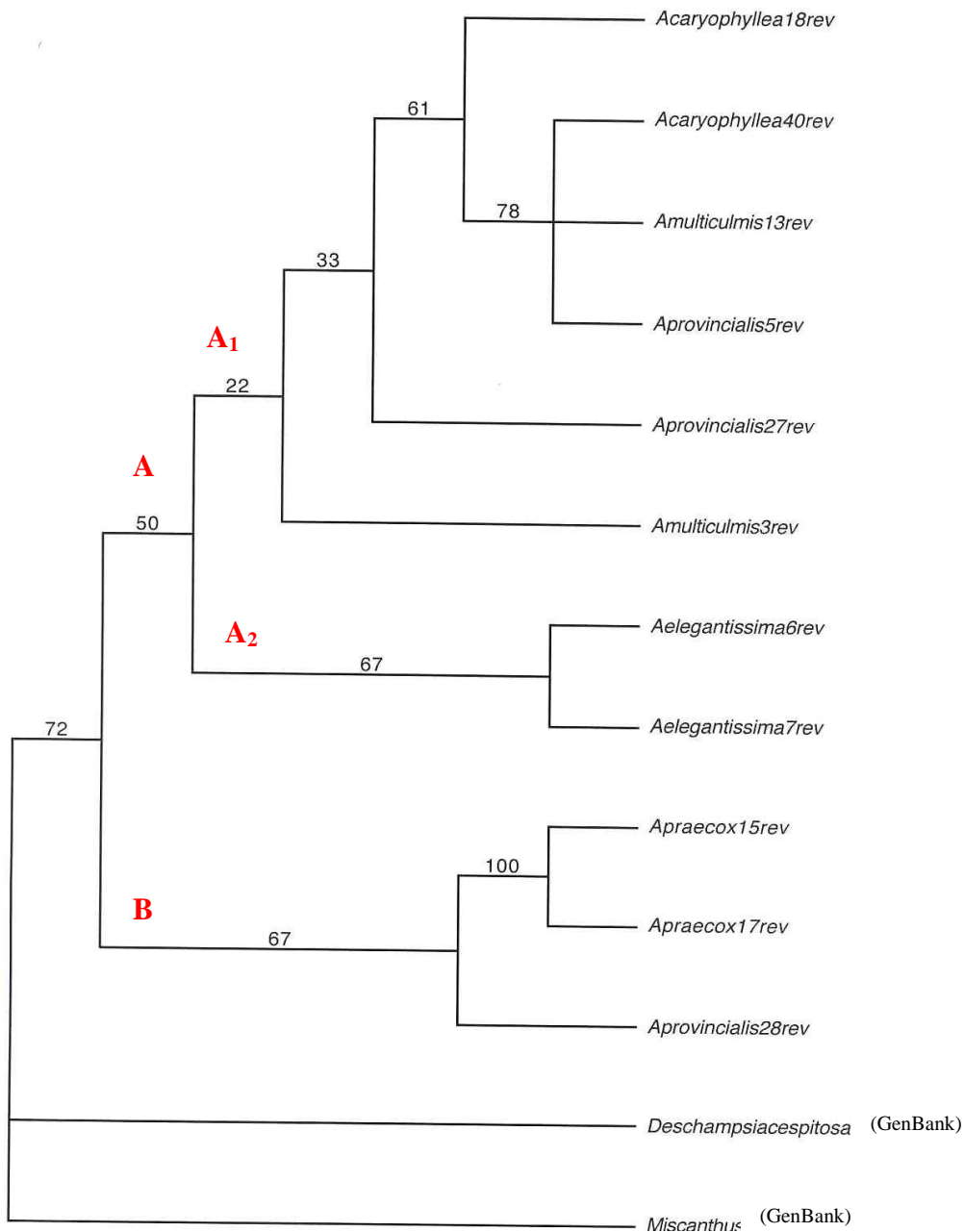


Abb. 3.40: *Bootstrap*-Baum nach der ML- Analyse

Im Gegensatz zu Abb. 3.39 findet sich die bekannte Aufteilung in die Claden A und B mit den Subcladen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> wie sie auch in Abb. 3.38 zu finden ist.

Die Clade B unterteilt sich in diesem Fall nicht weiter in Subcladen. Dennoch ist die Anordnung in der Subclade A<sub>1</sub> leicht verändert, da *A. multiculmis* 3 nun in diese integriert (Abb. 3.40) ist und nicht mehr ein Schwestertaxon zu den Subcladen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> darstellt (Abb. 3.38).

### 3.3.2 RAPD-Untersuchungen

Die RAPD-PCR (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) ist neben der DNA-Sequenzierung eine weitere Methode, die sich der PCR-Technik bedient. Mit ihrer Hilfe kann die Vielgestaltigkeit (Polymorphie) von Organismen aufgezeigt werden, indem man Unterschiede (Polymorphismen) im Bandenmuster zwischen z.B. Individuen, Populationen oder Arten vergleicht.

Dabei wird im Gegensatz zu Untersuchungen am Phänotyp eines Organismus im Rahmen der Morphologie oder Phänologie mit Hilfe der PCR-Methoden die Polymorphie des Genoms selbst analysiert.

Durch den Einsatz der RAPD-PCR werden Verteilungsmuster zufällig ausgewählter, kurzer DNA-Sequenzen auf dem Genom untersucht. Die Vervielfältigung von Zufallsfragmenten mit kurzen Primern ist insgesamt ein nützliches Verfahren der Phylogenetik, da sich gerade dieses Wissenschaftsgebiet mit der Evolutionsgeschichte und den Abstammungslinien der Arten und anderer systematischer Gruppen beschäftigt. Das Bandenmuster, das man nach der Elektrophorese der mit Zufallsprimern gewonnenen Fragmente gewinnt, spiegelt die Gesamtstruktur der Matrizen-DNA wider. Geht man von der gesamten Zell-DNA aus, erfährt man aus dem Bandenmuster etwas über die Organisation des Genoms. Mit der Zufallsprimer-PCR können also Unterschiede in den Genomen zweier Lebewesen nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob sie zu derselben Art oder verschiedenen Arten gehören. Bei zwei eng verwandten Individuen rechnet man im Bandenmuster mit mehr Ähnlichkeiten als bei solchen, die entwicklungsgeschichtlich weiter voneinander entfernt sind (BROWN 1996).

### 3.3.2.1 Primer-Auswahl

Nicht jeder Primer-Sequenz weist ein für die Untersuchung geeignetes Verteilungsmuster auf der DNA auf und ergibt damit ein informatives Bandenmuster.

Aus diesem Grund muss zuerst für die zu untersuchenden Arten eine geeignete Auswahl an Primern ermittelt werden, ein sogenanntes Primer-Screening.

Dafür ist exemplarisch die Art *Aira praecox* 16 mit 20 verschiedenen Primern unterschiedlicher Sequenz aus dem Primer-Set y01 – y20 der Firma Roth (Karlsruhe) getestet worden. Nach der Durchführung der PCR-Reaktion, durch die es zu einer Amplifikation kam, sind die Ergebnisse mittels einer Gelelektrophorese (siehe Abb. 3.41) nach den Kriterien beurteilt worden, ob die abgebildeten Banden auf dem Gel deutlich und eindeutig gegeneinander abgrenzbar abgebildet waren, und ob eine ausreichende Anzahl von Banden vorhanden war.

Das weitere wichtige Kriterium der Reproduzierbarkeit der Banden ist erst bei der eigentlichen Untersuchung berücksichtigt worden. Um eine hohe Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse zu gewährleisten, sind alle PCR-Reaktionen mindestens einmal wiederholt worden, und zwar in unabhängigen PCR-Durchgängen.

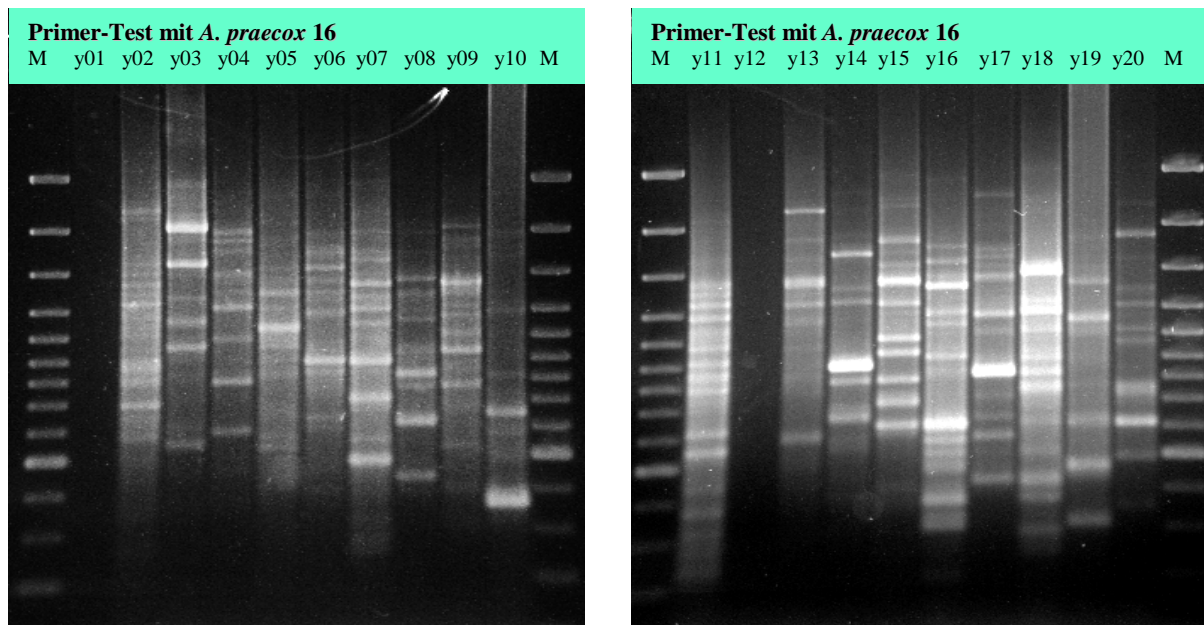


Abb. 3.41: Primer-Test mit *A. praecox* 16 und den Primern y01-y20 (Firma Roth)

M = 100 bp Marker



Die Vorversuche haben gezeigt, dass mit Ausnahme der Primer y01 und y12 durch alle weiteren Primer Polymorphismen mit charakteristischen und reproduzierbaren Bandenmustern erhalten wurden. Auf eine weitere Verwendung der beiden oben genannten Primer wurde verzichtet. Von den übrigen wurden die Primer y02, y03, y04, y05, y06, y07, y08, y14, y15 und y17 ausgewählt und für die folgende Analyse der Genotypen herangezogen.

### 3.3.2.2 RAPD-Gele

Die RAPD-Analysen erfolgten mit jeweils drei ausgesuchten Vertretern jeder Art sowie mit der Art *Deschampsia cespitosa* als Angehörige der Außengruppe. Die verwendeten Arten sind in der folgenden Tabelle 3.19 aufgelistet.

Tabelle 3.19: Verwendete Taxa für die RAPD-Analysen

Diploide Arten	Nummer	Tetraploide Arten	Nummer
Aira praecox	15	Aira caryophyllea	40
Aira praecox	16	Aira caryophyllea	18
Aira praecox	1	Aira caryophyllea	96
Aira elegantissima	4	Aira multiculmis	13
Aira elegantissima	32	Aira multiculmis	3
Aira elegantissima	43	Aira multiculmis	14
Aira cupaniana	31		
Aira cupaniana	68	<b>Außengruppe</b>	<b>Nummer</b>
Aira cupaniana	54	<i>Deschampsia cespitosa</i>	22
Aira tenorei	63		
Aira tenorei	62		
Aira tenorei	65		

Die einzelnen Amplifikationsprofile mit den ausgewählten Primern im Rahmen der durchgeführten RAPD-Analysen sind im Anhang unter Kapitel 7.4.1 (Abb. 7.1 bis 7.10) zu finden.

Die Auswertung der Bandenmuster und die Umsetzung in binäre Codes erfolgte manuell ohne die Verwendung eines Computerprogramms. Bei allen 10 Abbildungen, die durch die Verwendung der 10 ausgewählten Primer erhalten worden sind, wurden nur „bins“ (Banden gleicher Fragmentgröße) gewertet, für die bei allen Individuen eine klare Aussage über An- bzw. Abwesenheit der jeweiligen Bande getroffen werden kann. Wenn dies nicht der Fall war, z.B. aufgrund von undeutlichen Banden, so wurde die gesamte Fragmentklasse (*bin*) verworfen.

Insgesamt ergaben alle eingesetzten Primer zahlreiche Amplifikationsprodukte (Banden) mit den DNA-Proben der verschiedenen *Aira*-Arten. Es wurden 90 RAPD-Banden als Merkmale für die Auswertung herangezogen, die polymorph waren, d.h. nicht in allen zu untersuchenden Pflanzenproben amplifiziert wurden, so dass charakteristische und reproduzierbare Bandenmuster erhalten wurden.

Diese Banden traten überwiegend deutlich auf, so dass das Vorhandensein in der Tabelle mit einer „1“ registriert wurde, wohingegen nicht vorhandene Banden eine „0“ erhielten. Bei Unklarheit über An- bzw. Abwesenheit wurde dies mit einem „?“ bewertet.

Die Tabellen mit dem binären Code und damit der Auswertung aller Gel-Bilder ist im Anhang (7.4.2) zu finden.

### 3.3.2.3 Phylogenetische Auswertung

Die Daten aus der binären Datenmatrix wurden unter Verwendung der Beta Version 4.0b10 von PAUP (SWOFFORD 2002) phylogenetisch ausgewertet.

Dabei wurden zwei Dendrogramme mit unterschiedlichen Algorithmen erstellt. Zum einen wurde die Methode *Maximum Parsimony* verwendet, innerhalb der die *heuristic search*-Suchkriterien gewählt wurde. Eine „heuristische“ Suche, also eine Suche nach einem lokalen Sparsamkeitsmaximum (*local optimum*) war aufgrund der relativ großen Daten-Matrix erforderlich (RIEPEL 1999). Alle Charaktere, die sich aus dem Vorhandensein bzw. Fehlen der Banden oder Marker ergeben haben, wurden gleich gewichtet, d.h. in dieser Grundeinstellung zählte eine Veränderung in jedem dieser Merkmale immer als ein Schritt.

Insgesamt besteht die Datenmatrix aus 19 Taxa mit je 90 Charakteren. Von diesen ist ein Charakter konstant, wohingegen 4 variable Charaktere parsimony-uninformativ und 85 Charaktere parsimony-informativ sind.

Die Analyse dieser Datenmatrix resultierte nach der heuristischen Suche im Rahmen der *Maximum Parsimony*-Methode mit 100 Replikaten oder Wiederholungen in 12 gleichermaßen sparsamen Kladogrammen (*Most Parsimonious Trees* / MPTs) mit einer Baum-Länge von 250 Schritten, von denen jedes dieser Kladogramme eine mögliche phylogenetische Hypothese darstellt. Die MPTs haben die folgenden Werte: Consistency-Index (CI) = 0,356, Retention-Index (RI) = 0,602.

Aus diesen 12 gleichwertigen *Most Parsimonious Trees* als mögliche phylogenetische Hypothesen wurde von dem Programm anhand des strikten Consensus (*strict consensus tree*) oder des semistrikten Consensus (*semistrict consensus tree*) eine Art Mittelwert gebildet, denn diejenigen Gabelpunkte, die in allen gleich sparsamen Kladogrammen in gleicher Weise bestimmt sind, werden auch im strikten Consensus-Schema eindeutig bestimmt (RIEPPPEL 1999). Der *Semistrict Consensus*-Baum ist in Abb. 3.42 dargestellt. Eine weitere Consensus-Methode ist die der „50%-igen Mehrheitsregel“ (*50% majority rule consensus tree*), deren Baum in Abb. 3.43 zu finden ist. Es existieren in diesem Kladogramm insgesamt mehr Aufteilungen unter den Arten als sie beim *Semistrict Consensus*-Baum vorkommen.

Die Verlässlichkeit dieser Bäume und damit die Stabilität dieser Gruppierungen wurde durch statistische Programme wie z.B. die *Bootstrap*-Methode (FELSENSTEIN 1985) überprüft. Hier wurde eine heuristische Suche mit 1000 Replikaten durchgeführt. Bei der Bewertung des Baumes gelten die bereits beschriebenen Bedingungen für eine Unterstützung nach TOULOU MENIDOU (2001).

Bei der *JackKnife*-Methode (FARRIS *et al.* 1996), mit der ebenfalls die Zuverlässigkeit der Bäume überprüft werden kann, sind nur Werte über 63% für eine Gruppierung relevant. Bei dieser Analyse wurde das Suchkriterium *heuristic search* gewählt, um die Suche mit 1000 Replikaten (50% Charakter Deletion pro Replikat) durchzuführen.

Das *Bootstrap*-Kladogramm in Kombination mit den *JackKnife*-Werten ist in Abb. 3.44 dargestellt.

RAPD 17.11.2004  
Semistrict

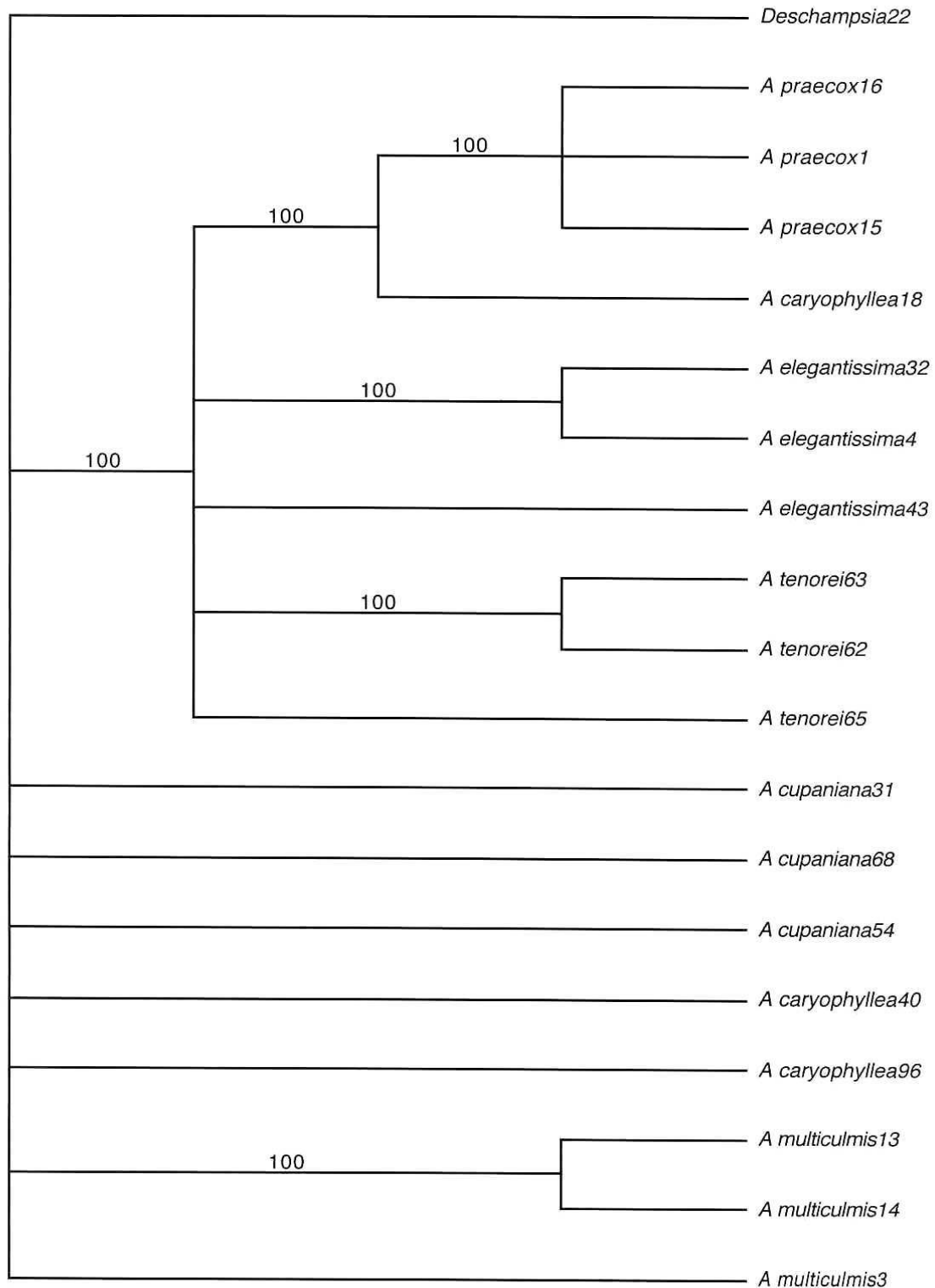


Abb. 3.42: *Semistrict Consensus*-Baum von 12 MPTs. Mit 100 wird die Gruppierung der Arten bezeichnet, die bei allen MPTs vorhanden ist.

RAPD 17.11.2004

Majority rule

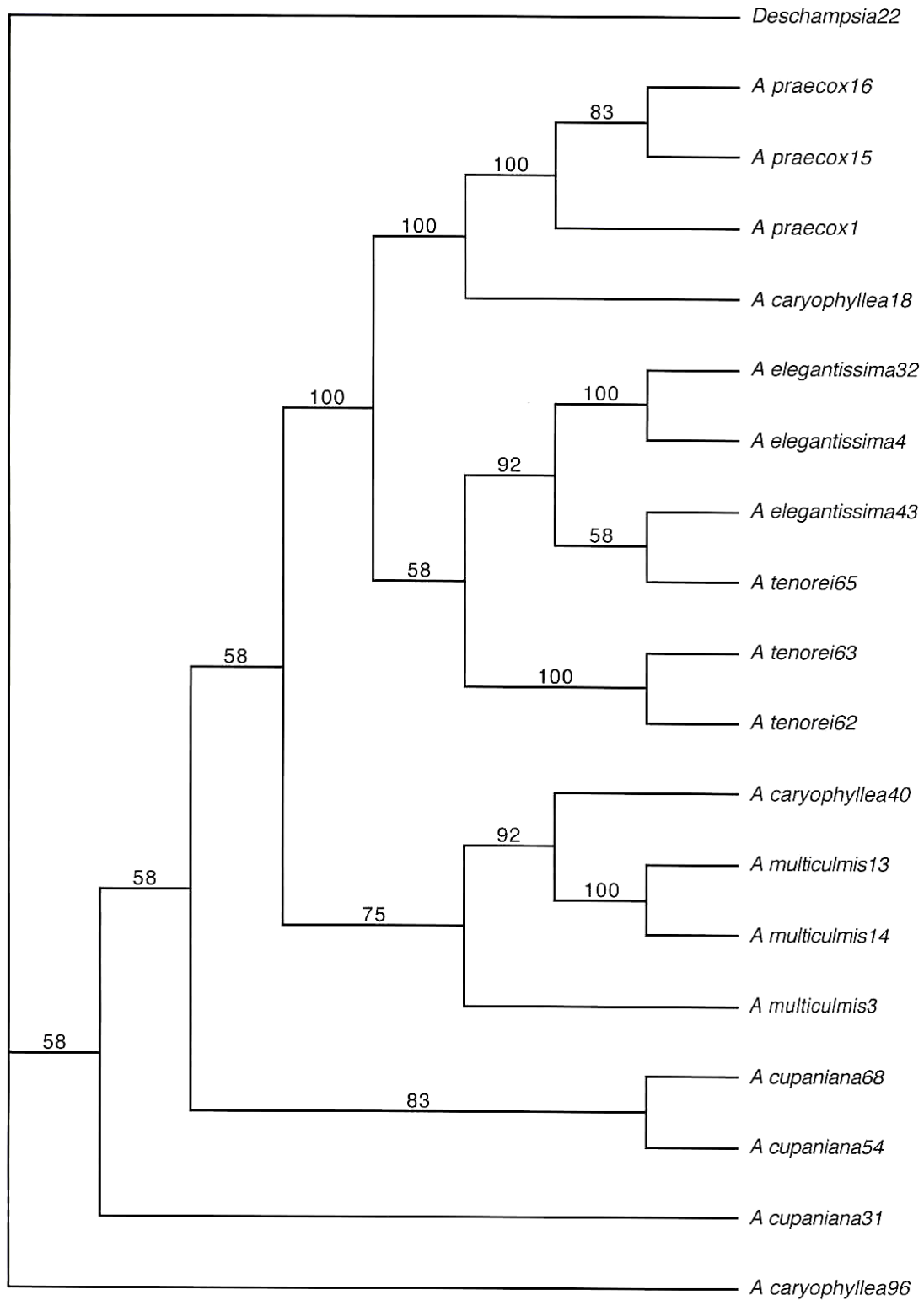


Abb. 3.43: *Majority Rule Consensus*-Baum von 12 MPTs. Mit 100 wird die Gruppierung der Arten bezeichnet, die bei allen MPTs vorhanden ist.



Der *Semistrict Consensus*-Baum (Abb. 3.42) zeigt eine eher geringe Aufteilung innerhalb der untersuchten Taxa der Gattung *Aira*. Eine größere Gruppe, bestehend aus den diploiden Arten *A. praecox*, *A. elegantissima*, *A. tenorei* sowie einem Vertreter von *A. caryophyllea*, hat sich gebildet. Ebenso eine kleine Gruppe aus 2 Taxa der Art *A. multiculmis*. Alle anderen Taxa zeigen keine weitere Unterteilung.

Das *JackKnife*-Kladogramm (Abb. 3.44) ist ausführlicher in seiner Darstellung, da es eine detaillierte Aufteilung innerhalb der Untersuchungsgruppe gibt.

Man kann zwei Claden erkennen, die jeweils schwach unterstützt werden. Außengruppe ist die Art *Deschampsia cespitosa*, aber auch das zur Untersuchungsgruppe gehörende Taxon *A. caryophyllea* 96 verhält sich aufgrund seiner Stellung im Kladogramm wie eine Außengruppe, was eine eindeutige Bestimmung dieses Taxons in Frage stellen muss.

Die Clade A besteht aus zwei Subcladen: Die Subclade A<sub>1</sub> wird aus zwei *A. tenorei*-Herkünften sowie einer Gruppe aus drei *A. praecox*-Vertretern und *A. caryophyllea* 18 gebildet. Die Subclade A<sub>2</sub> setzt sich aus drei Vertretern von *A. elegantissima* zusammen, zu denen *A. tenorei* 65 ein Schwestertaxon darstellt.

Die Clade B besteht ebenfalls aus zwei Subcladen: die Subclade B<sub>1</sub> beinhaltet drei Taxa von *A. cupaniana*, die Subclade B<sub>2</sub> enthält neben einer Gruppe aus zwei *A. multiculmis*-Herkünften sowie *A. caryophyllea* 40 auch *A. multiculmis* 3, die zu diesen ein Schwestertaxon darstellt. Im Falle der *A. caryophyllea* 40-Herkunft kann man eine Fehlbestimmung dieses Taxons vermuten, da *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* morphologisch große Ähnlichkeiten zeigen.

Mittels der binären Matrix werden auch Clusterverfahren zur Erstellung von weiteren Kladogrammen durchgeführt, um damit die verwandtschaftlichen Verhältnisse der untersuchten Individuen miteinander vergleichen und sie graphisch darstellen zu können. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Bäume wurde über 100 *Bootstrap*-Wiederholungen nach der *Bootstrap*-Methode (FELSENSTEIN 1985) überprüft. Als Clusterverfahren wurde das UPGMA-Verfahren (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*) nach SNEATH & SOKAL (1973) verwendet, bei dem die einzelnen Individuen nach den arithmetischen Mitteln der genetischen Distanzen einer OTU (*operational taxonomic unit*) miteinander kombiniert werden. Diese Darstellung findet sich in der Abbildung 3.45.





Der UPGMA-Baum (Abb. 3.45) gibt die Distanzen, d.h. die Veränderungen unter den Arten wieder. Er zeigt eine nur leicht veränderte Topologie im Vergleich zum *JackKnife*-Baum in Abb. 3.44.

Man kann sehr deutlich die Position von *A. caryophyllea* 96 als „Außengruppe“ erkennen, da sie sich zusammen mit der eigentlich als *Outgroup* definierten Art *Deschampsia cespitosa* 22 in eine Gruppe anordnet.

Die weitere Aufteilung in die zwei Claden A und B ist ebenfalls vorhanden, wobei die Anordnung der Arten in der Clade B in den beiden Abbildungen 3.44 und 3.45 identisch ist.

In der Clade A erkennt man zwei weitere Gruppierungen bzw. Subcladen: die Subclade A<sub>1</sub> besteht aus drei Taxa von *A. praecox* sowie aus der Herkunft *A. caryophyllea* 18, die ein Schwestertaxon zu den erst genannten darstellt.

Die Subclade A<sub>2</sub> besteht einerseits aus der Gruppe *A. tenorei* 63 und *A. tenorei* 62, und andererseits aus den beiden Gruppen *A. elegantissima* 32 und *A. elegantissima* 4 sowie *A. elegantissima* 43 und *A. tenorei* 65.

Insgesamt befinden sich in der Subclade A<sub>2</sub> nur Vertreter des Karyotyps [A], womit sie sich sehr deutlich von der Subclade A<sub>1</sub> mit Vertretern der asymmetrischen Karyotypen [B] / [AB] abgrenzt.

#### **3.3.2.4 RAPD-Analysen bei *A. caryophyllea* und *A. multiculmis***

Das Hauptaugenmerk der RAPD-Untersuchungen liegt auf der Klärung der verwandtschaftlichen Beziehungen der tetraploiden Arten *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* sowie ihrer jeweiligen potentiellen diploiden Elternarten. Aufgrund der karyologischen Befunde (siehe Kapitel 3.2) wird postuliert, dass *A. caryophyllea* durch allopolyploide Bildung aus den diploiden Arten *A. praecox* und *A. elegantissima* entstanden ist. Weiterhin kann man davon ausgehen, dass *A. elegantissima* an der Bildung des Genoms von *A. multiculmis* beteiligt zu sein scheint.

Die RAPD-Untersuchungen sollen weitere Daten zur Bestätigung dieser bisherigen Ergebnisse liefern, sowie zusätzliche Hinweise auf die vermutlich neben *A. elegantissima* zweite diploide Ausgangsart bei *A. multiculmis* geben.

Aus diesem Grund werden einzelne Abbildungen der RAPD-Amplifikationsprodukte verschiedener Primer genauer untersucht.

### 3.3.2.4.1 *A. caryophyllea*

Durch den Einsatz des Primer y04 der Firma Roth (Karlsruhe) kann man in dem Amplifikationsprofil (Abb. 3.46) mehrere übereinstimmende Banden (weiße Pfeile) bei der diploiden Art *A. praecox* 16 sowie der tetraploiden Art *A. caryophyllea* 18 feststellen.

Dies zeigt die Beteiligung von *A. praecox* am Genom von *A. caryophyllea*.

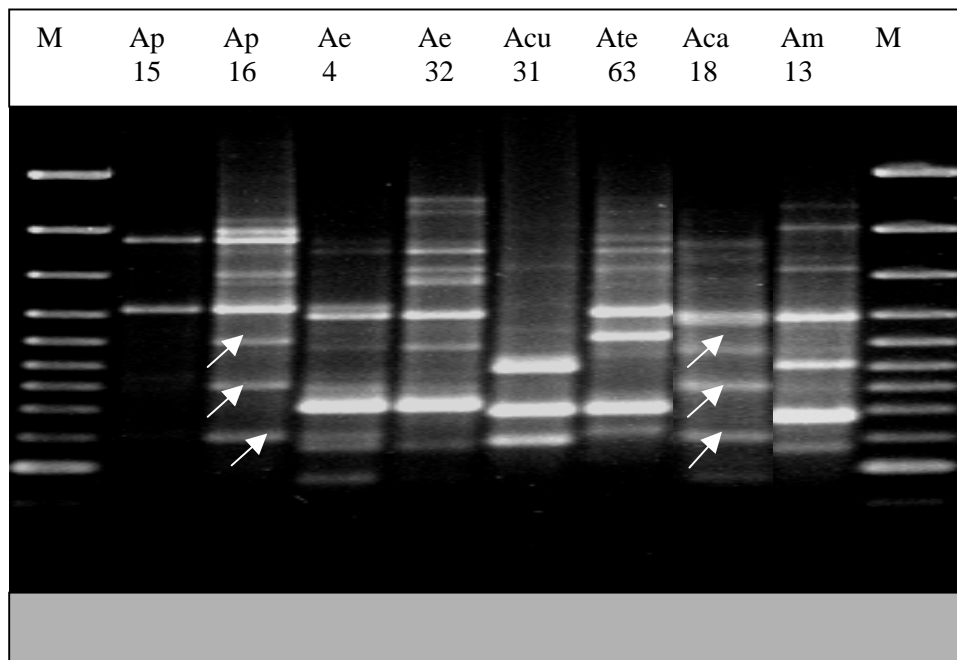


Abb. 3.46: RAPD-Amplifikationsmuster mit Primer y04 bei unterschiedlichen *Aira*-Arten

Primer y 04 (Primer Kit, Roth).  
 M: 100-bp DNA ladder  
 Lane 2-3: *A. praecox*  
 Lane 4-5: *A. elegantissima*  
 Lane 6: *A. cupaniana*  
 Lane 7: *A. tenorei*  
 Lane 8: *A. caryophyllea*  
 Lane 9: *A. multiculmis*

Durch den Einsatz von Primer y08 zeigt das RAPD-Amplifikationsprofil (Abb. 3.47) im Fall von *A. caryophyllea* zum einen Banden bzw. Marker, die von *A. praecox* (rote Pfeile) stammen, und zum anderen Banden, die von der ebenfalls diploiden Art *A. elegantissima* (weiße Pfeile) stammen.

Gleichzeitig teilen die drei untersuchten Arten auch gemeinsame Marker (= monomorph), die auf eine enge Verwandtschaft hindeuten.

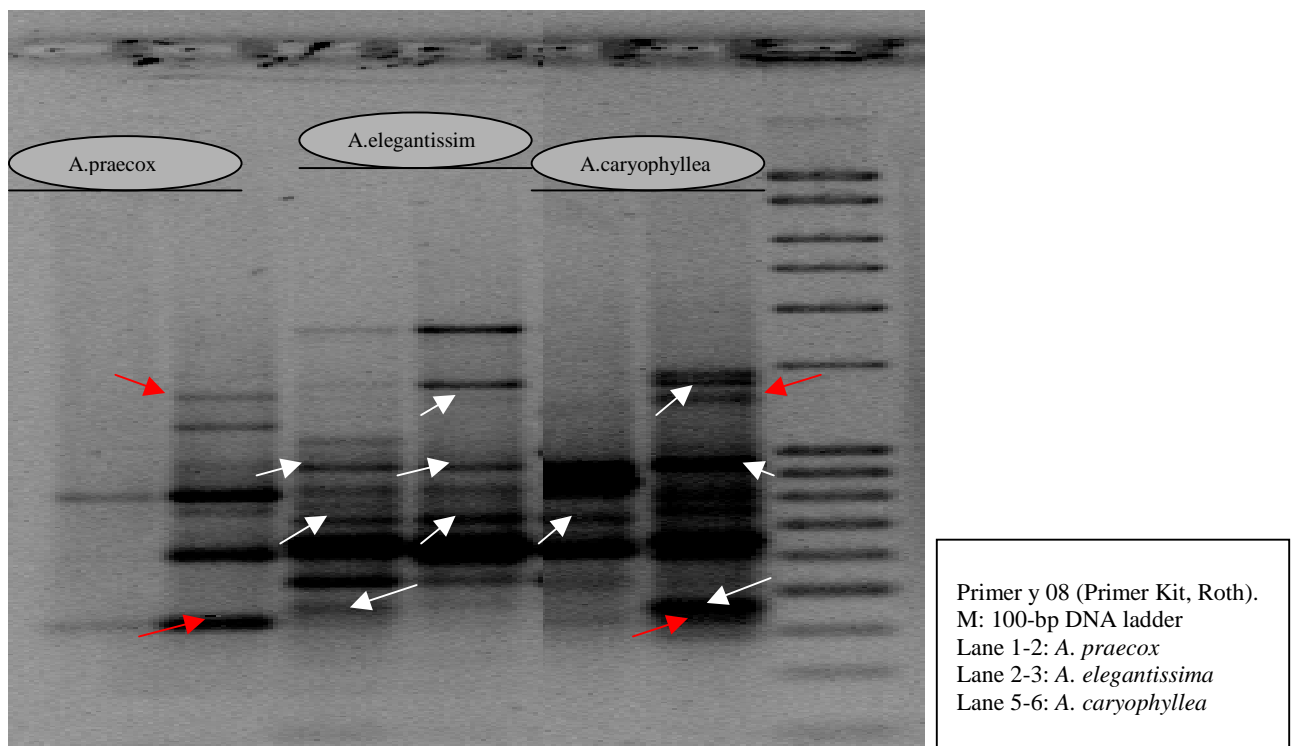


Abb. 3.47: RAPD-Amplifikationsmuster von den drei *Aira*-Arten

*A. praecox* (1+2), *A. elegantissima* (3+4) und *A. caryophyllea* (5+6).

Im Fall der tetraploiden Art *A. caryophyllea* mit dem Karyotyp [AB] bestätigen die RAPD-Analysen insgesamt die durch die karyologischen Untersuchungen aufgestellten Vermutungen, dass an der allopolyploiden Bildung der Art die beiden diploiden Arten *A. praecox* mit dem Karyotyp [B] und *A. elegantissima* mit dem Karyotyp [A] beteiligt sind.

### 3.3.2.4.2 *A. multiculmis*

Im Fall von *A. multiculmis* kann durch den Einsatz verschiedener Primer gezeigt werden, dass aufgrund der unterschiedlichen Bandenmuster eher die diploide Art *A. cupaniana* Übereinstimmungen mit der tetraploiden Art *A. multiculmis* zeigt als die ebenfalls dem Karyotyp [A] angehörende Art *A. tenorei*.

Beide Arten kommen neben der als relativ sicher anzusehenden *A. elegantissima* als weitere Elternart für *A. multiculmis* in Frage, da das Genom von *A. multiculmis* auf eine Verdopplung zweier Arten des Karyotyps [A] zurückgeht.

Die folgende Abbildung 3.48 zeigt das RAPD-Amplifikationsprofil durch die Verwendung des Primers y02. Die Pfeile demonstrieren die Marker (Banden), die übereinstimmend bei *A. cupaniana* und *A. multiculmis* auftreten. Wie man erkennen kann, finden sich diese markierten Banden nicht bei der ebenfalls potentiellen Ausgangsart *A. tenorei*.

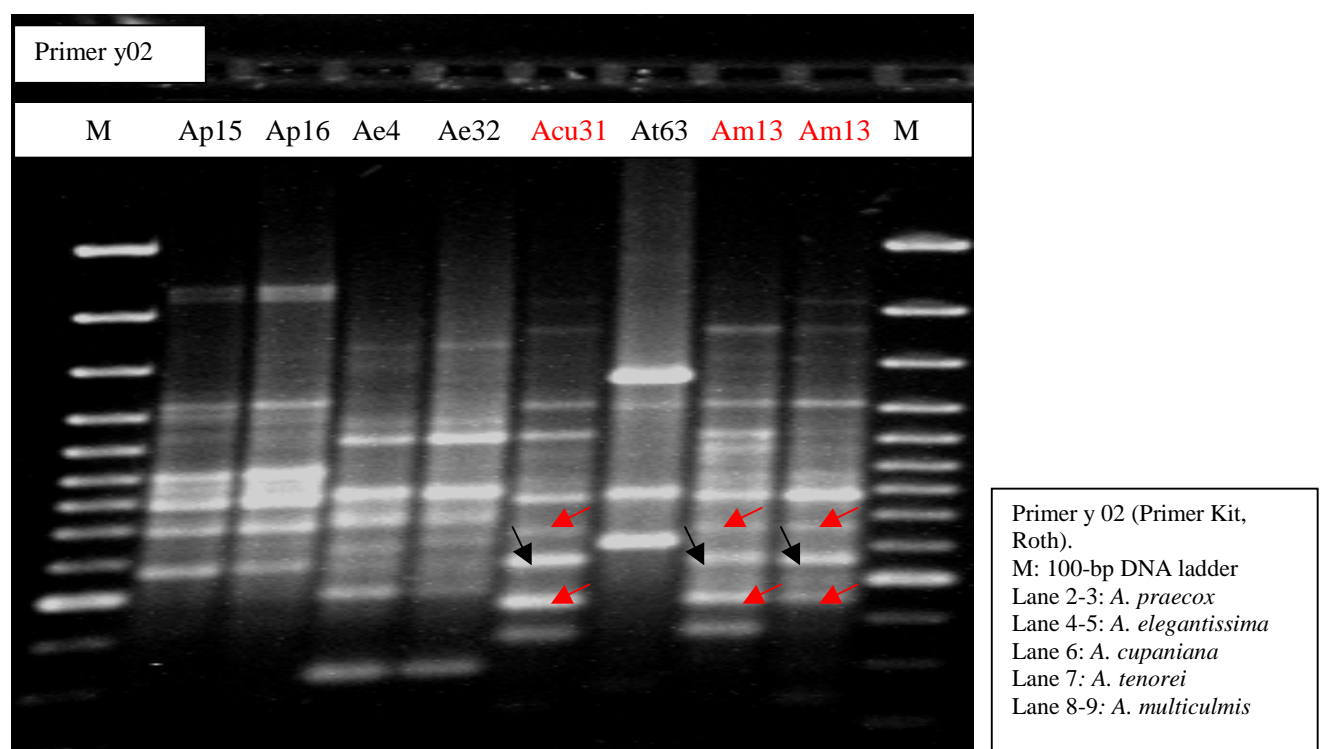


Abb. 3.48: RAPD-Amplifikationsmuster mit Primer y02 bei unterschiedlichen *Aira*-Arten.

Durch den Einsatz des Primers y03 findet man auf dem RAPD-Amplifikationsprofil (Abb. 3.49) bei ca. 1150bp eine sehr eindeutige Bande, die sich nur bei *A. cupaniana* sowie der tetraploiden Art *A. multiculmis* findet.

Ähnlich sieht es bei dem RAPD-Amplifikationsprofil des Primers y04 aus (Abb. 3.50), bei dem bei ca. 900bp eine sehr eindeutige Bande sowohl bei *A. cupaniana* als auch bei *A. multiculmis* zu finden ist, die sonst bei keiner der untersuchten Arten auftaucht.

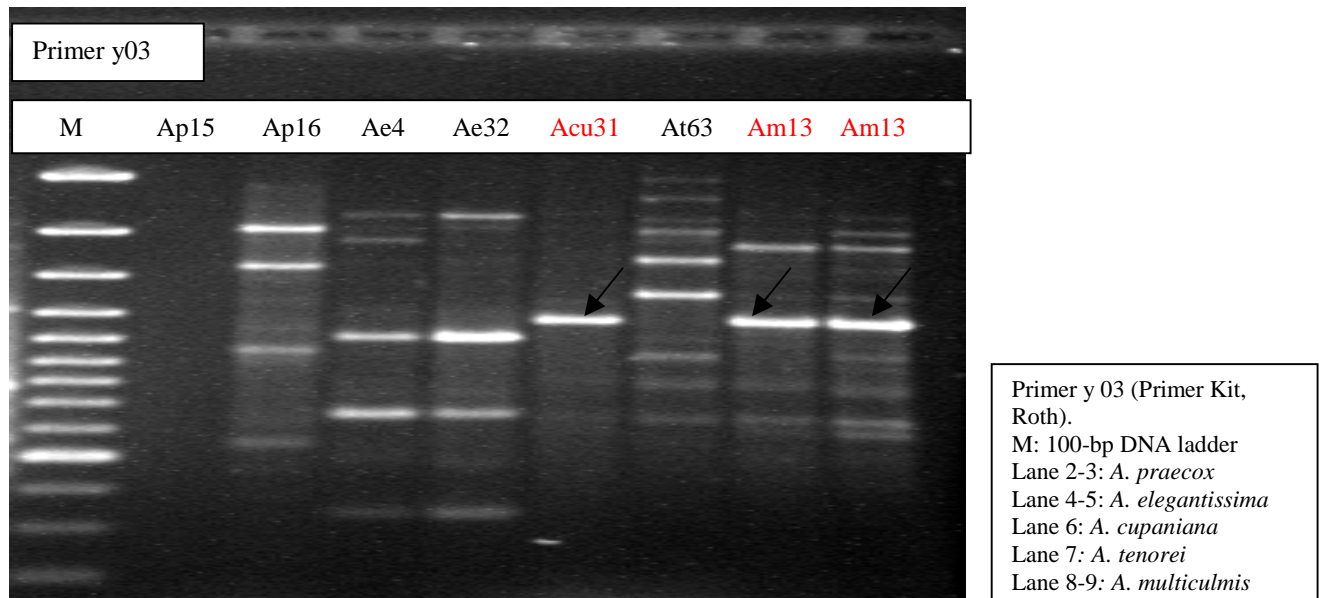


Abb. 3.49: RAPD-Amplifikationsmuster mit Primer y03 bei unterschiedlichen *Aira*-Arten

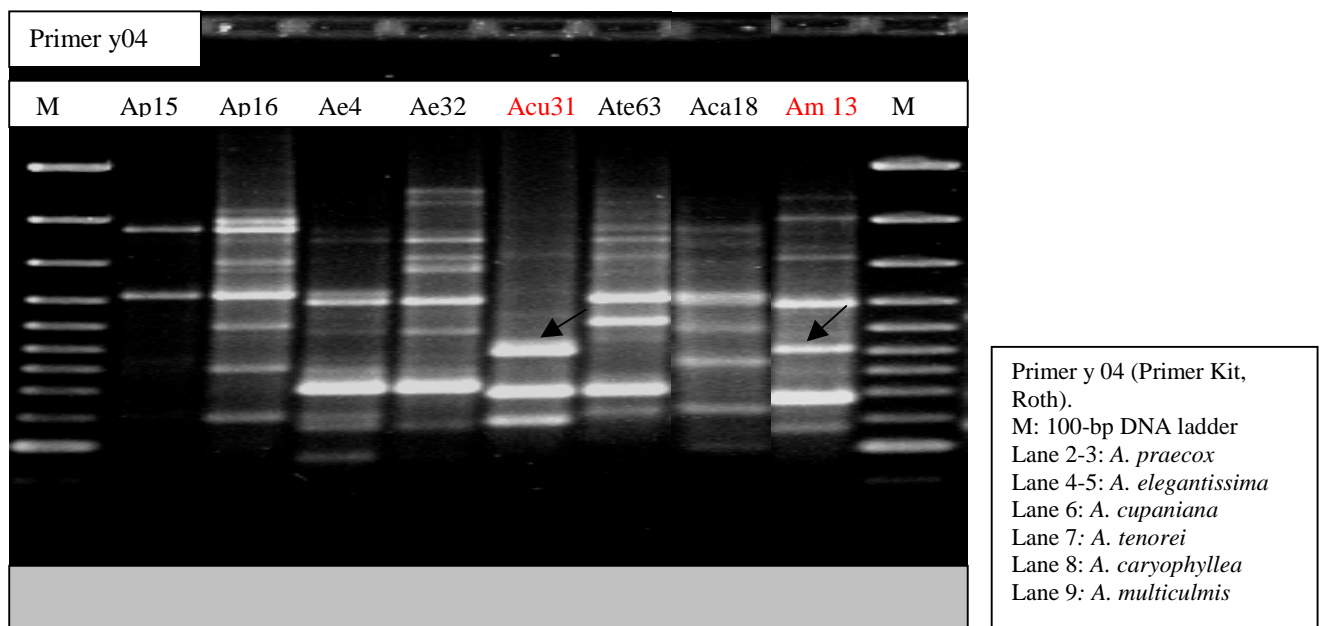


Abb. 3.50: RAPD-Amplifikationsmuster mit Primer y04 bei unterschiedlichen *Aira*-Arten

Für *A. multiculmis* gilt, dass durch die RAPD-Analysen weitere konkrete Hinweise auf die parentalen Ausgangsarten hervorgetreten sind. Neben der durch die karyologischen Untersuchungen bereits als sicher anzusehenden beteiligten Art *A. elegantissima* kristallisiert sich *A. cupaniana* als weitere parentale Ausgangsart heraus, da diese Art deutliche Übereinstimmungen im Bandenmuster mit *A. multiculmis* zeigt.

Um die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den drei diploiden Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei* und *A. cupaniana*, die allesamt dem Karyotyp [A] angehören, sowie der tetraploiden Art *A. multiculmis* mit dem Karyotyp [AA] zu untersuchen, wurden deren entsprechende Daten der binären Matrix unter Verwendung der Beta Version 4.0b10 von PAUP (SWOFFORD 2002) phylogenetisch ausgewertet.

Die Analyse folgte der bereits unter 3.3.3.3 beschriebenen Methode, die hier nicht weiter erläutert wird.

Die Datenmatrix besteht aus 13 Taxa mit jeweils 90 Charakteren, von denen 8 Charaktere konstant sind, wohingegen 10 variable Charaktere parsimony-uninformativ und 72 Charaktere parsimony-informativ sind.

Die heuristische Suche im Rahmen der *Maximum Parsimony*-Methode ergibt in diesem Fall nur einen Baum mit einer Baum-Länge von 161 Schritten. Der Consistency-Index (CI) dieses Baumes liegt bei 0,509, der Retention-Index (RI) beträgt 0,644.

Die Verlässlichkeit dieses Baumes und damit die Stabilität der Gruppierungen wird wiederum durch statistische Programme wie der *Bootstrap*-Methode (FELSENSTEIN 1985) und der *JackKnife*-Methode (FARRIS *et al.* 1996) überprüft. Beide Methoden werden als heuristische Suche mit je 100 Replikaten durchgeführt. Der daraus resultierende *Bootstrap*-Baum, in den die erhaltenen *JackKnife*-Werte integriert sind, ist in Abbildung 3.51 dargestellt.

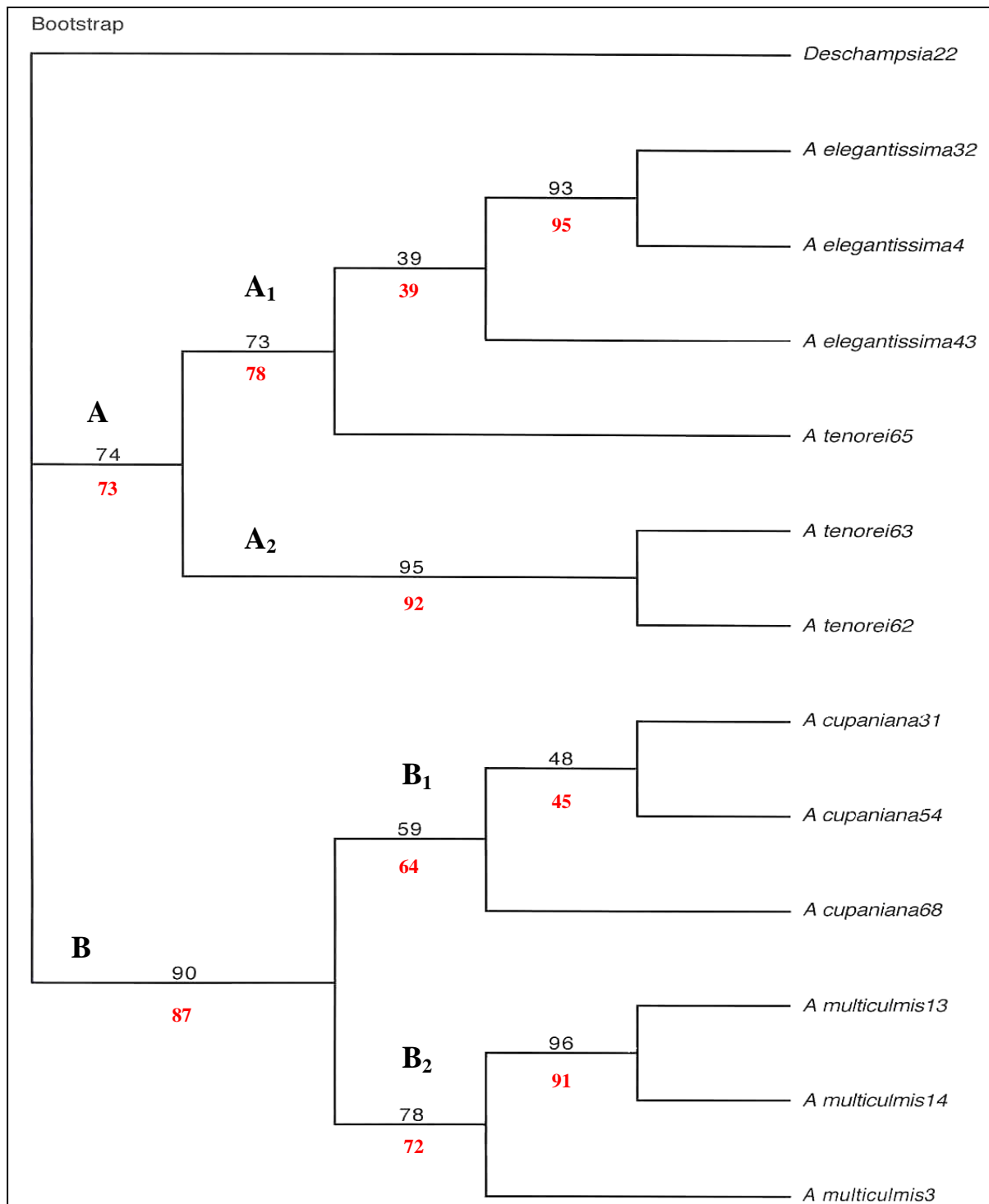


Abb. 3.51: *Bootstrap*-Kladogramm der RAPD-Daten.

Die Zahlen über den Ästen entsprechen den *Bootstrap*-Werten.

Die roten Zahlen unterhalb der Äste entsprechen den *JackKnife*-Werten.

Anhand des Bootstrap-Kladogrammes in Abb. 3.51 erkennt man zwei Claden, von denen die Clade B durch ihren hohen *Bootstrap*-Wert von 90 eine starke Unterstützung erfährt, wohingegen die Clade A mit ihrem *Bootstrap*-Support von 74 eine schwächere Unterstützung besitzt.

*Outgroup* zu diesen beiden Claden ist *Deschampsia cespitosa* 22.

In der Clade A findet man zwei Subcladen. Die Subclade A<sub>1</sub> setzt sich aus drei untersuchten Vertretern von *A. elegantissima* zusammen, zu denen *A. tenorei* 65 ein Schwestertaxon darstellt. Die Subclade A<sub>2</sub> besteht aus den zwei Taxa *A. tenorei* 63 und *A. tenorei* 62 und wird sehr stark unterstützt (95 bzw. 92%).

In der Clade B finden sich ebenfalls zwei Subcladen, von denen die Subclade B<sub>1</sub> die einzelnen Aufsammlungen der Art *A. cupaniana* beinhaltet und die Subclade B<sub>2</sub> die Vertreter der Art *A. multiculmis*.

Diese phylogenetische Untersuchung wurde unternommen, um möglicherweise weitere Informationen über die Elternarten von *A. multiculmis* zu erhalten, da bei dieser Art bisher nur aus karyologischer Sicht (siehe Kapitel 3.2) *A. elegantissima* relativ sicher als eine der beiden Elternarten identifiziert werden kann.

Diese Analyse zeigt eine sehr enge Verwandtschaft der Arten *A. cupaniana* mit dem Karyotyp [A] und *A. multiculmis* mit dem Karyotyp [AA], so dass an dieser Stelle eine Beteiligung von *A. cupaniana* am Genom von *A. multiculmis* in Betracht gezogen werden muss.



### **3.4 Genomische *in situ*-Hybridisierung**

Die Methode der Genomischen *in situ*-Hybridisierung (GISH) wird zur weiteren Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Aira* angewendet, da sie ein sehr nützliches „Werkzeug“ für Untersuchungen der Genom-Homologie zwischen polyploiden Arten und ihren diploiden Vorfahren darstellt.

Sie eignet sich für die Identifizierung von Fremd-Chromatin, in diesem Fall bei Chromosomen-Spreitungen von tetraploiden Arten der Gattung *Aira* L., und damit für die Entdeckung von parentalen Genomen in Hybriden oder Allopolyploiden.

Die Genomische *in situ*-Hybridisierung vereint konventionelle Cytogenetik mit DNA:DNA - *In situ* - Hybridisierungstechniken, so dass Chromatin von verschiedenen Eltern oder Vorfahren unterschieden werden kann (LEITCH & BENNETT 1997).

Das Prinzip beruht auf der Verwendung markierter genomischer DNA, d.h. der gesamten Kern-DNA einer Elternart und deren bevorzugte Anlagerung an homologe Sequenzen in Chromosomen der Untersuchungsart.

Da die Untersuchungen *in situ*, also direkt an den Chromosomen der Metaphase erfolgen, ergänzt diese Methode die bisherigen karyologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 3.2).

Durch die Anwendung dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die untersuchte tetraploide Art *A. caryophyllea* mit dem Karyotyp [AB] einen allopolyploiden Ursprung zeigt. Dies konnte bereits in den vorangegangenen Kapiteln durch die Karyologie und die RAPD-Analysen dokumentiert werden.

Die Genomische *in situ*-Hybridisierung hat im Rahmen der mikroskopischen Auswertung eindeutig gezeigt, dass die beiden Arten *A. praecox* mit dem Karyotyp [B] und *A. elegantissima* mit dem Karyotyp [A] am Genom von *A. caryophyllea* beteiligt sind.

Ein Chromosomen-Präparat der tetraploiden Art wurde mit einer mit Biotin-markierten Sonde von *A. elegantissima* behandelt. Man konnte erkennen, dass 14 Chromosomen im Kern rötlich-orange angefärbt waren, da eine Hybridisierung mit der Sonde stattgefunden hat.

Ähnliches gilt für ein weiteres Präparat von *A. caryophyllea*, welches mit einer mit Digoxigenin-markierten Sonde von *A. praecox* nach der Hybridisierung 14 grün angefärbte Chromosomen zeigt (Abb. 3.52). Dies deutet auf die Beteiligung dieser Art am Genom von *A. caryophyllea* hin.

Es wird deutlich, dass der Einsatz der Art *A. praecox* als Digoxigenin-markierte Sonde mit einem Überschuß an unmarkierter Blocking-DNA von *A. elegantissima* im Genom von *A. caryophyllea* Bereiche aufweist, die intensiver fluoreszieren und auf die Hybridisierung mit der Sonde zurückzuführen sind.

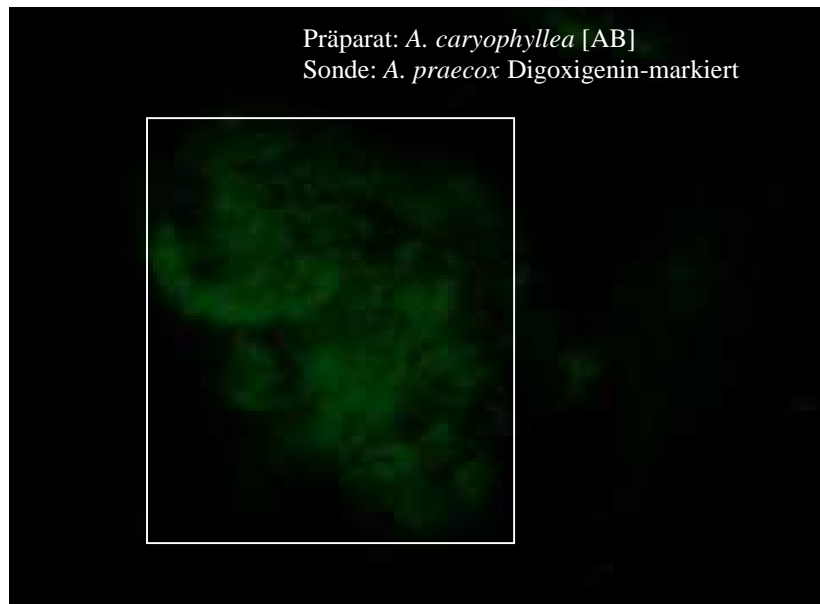


Abb. 3.52: Chromosomenspreitung von *A. caryophyllea*.  
Digoxigenin-markierte Sonde von *A. praecox*

In einem Zweifach-Nachweis wurden gleichzeitig eine Digoxigenin-markierte Sonde von *A. praecox* sowie eine Biotin-markierte Sonde von *A. elegantissima* auf einem Chromosomen-Präparat von *A. caryophyllea* eingesetzt. Dies zeigt erneut 14 grün-gefärbte Chromosomen, die von *A. praecox* stammen, sowie 14 rot gefärbte Chromosomen, die durch die Biotin-Markierung eindeutig der Art *A. elegantissima* zugeordnet werden konnten.

Die unterschiedliche Anfärbung der Chromosomen und damit die positive Hybridisierung mit den eingesetzten Sonden läßt sich anhand der Abb. 3.53 nachvollziehen.

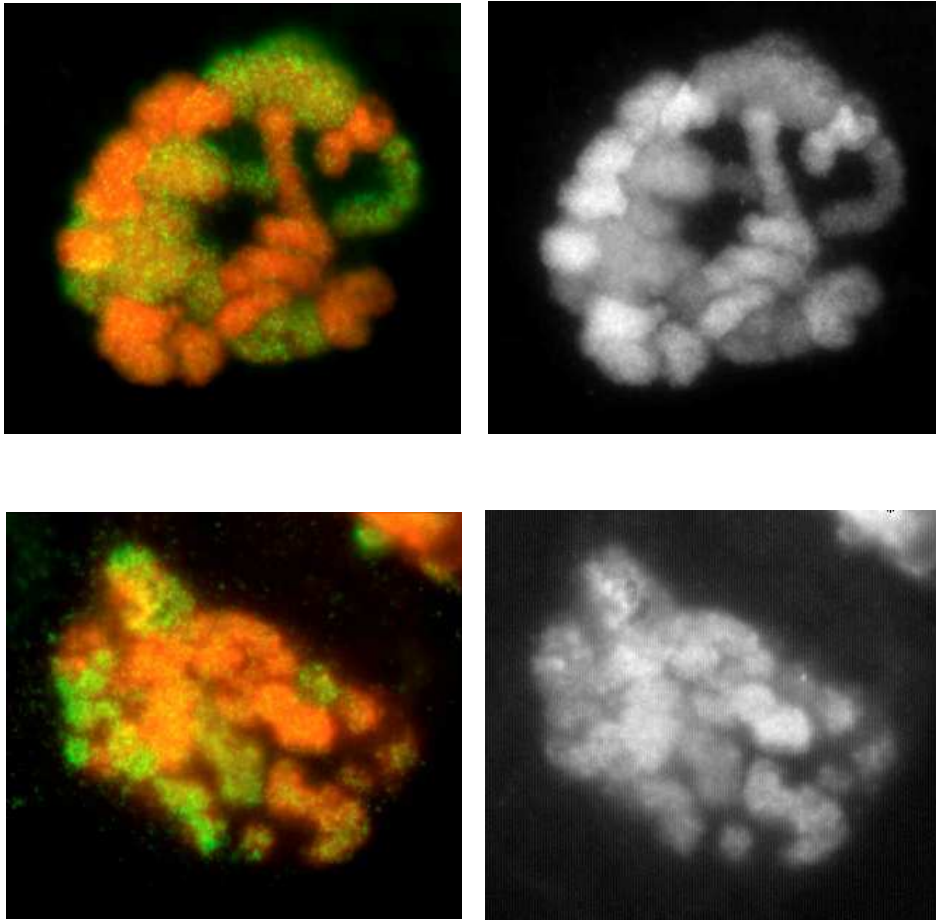


Abb. 3.53: Zwei verschiedene Chromosomenspreitungen von *A. caryophyllea*.  
Rot = Chromosomen von *A. elegantissima*, markiert mit Biotin.  
Grün = Chromosomen von *A. praecox*, markiert mit Digoxigenin.  
(rechts: Bilder jeweils ohne die entsprechende Färbung)

Die Präparate wurden – wie bereits im Vorfeld erwähnt – mit DAPI gegengefärbt, wodurch ein einfacheres Auffinden im Fluoreszenzmikroskop ermöglicht wurde. Von den oben dargestellten Chromosomenspreitungen wurden auch Aufnahmen mit der DAPI-Färbung gemacht, die zusammen mit denen der markierten Chromosomen in der Abb. 3.54 zu finden sind.

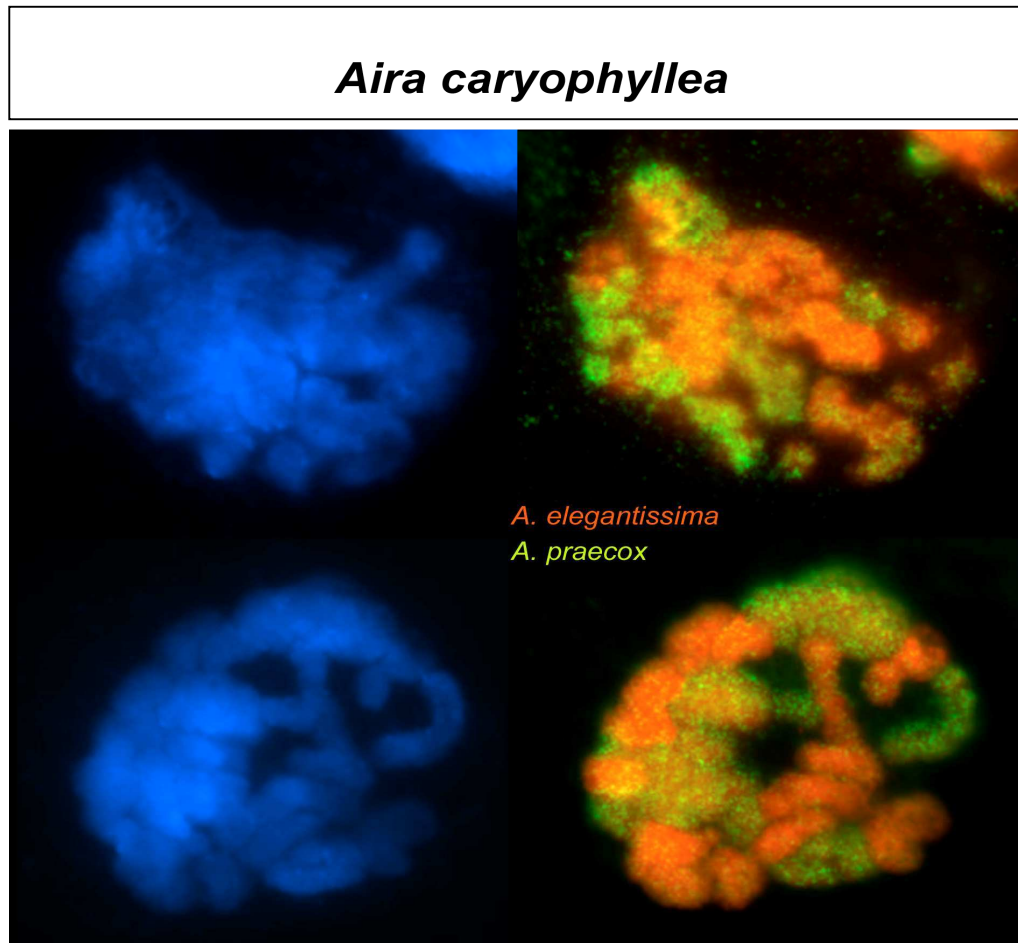


Abb. 3.54: Zwei unterschiedliche Chromosomenspreitungen von *A. caryophyllea*.

Linke Seite: DAPI-gefärbt

Rechte Seite: durch die markierten Sonden gefärbt

Insgesamt konnten durch den Einsatz der Genomischen *in situ*-Hybridisierung die karyologischen Ergebnisse zur allopolyploiden Bildung der tetraploiden Art *A. caryophyllea* bestätigt werden. Alle karyologischen Charaktere lassen sich auf die vermuteten Ausgangsarten *A. praecox* und *A. elegantissima* zurückführen, was durch die GISH (Abb. 3.53 und Abb. 3.54) dokumentiert werden kann.

Im Falle der ebenfalls tetraploiden Art *A. multiculmis*, deren Ursprung geklärt werden sollte, konnten durch die bisherigen Untersuchungen mit der Genomischen *in situ*-Hybridisierung nur 14 Chromosomen festgestellt werden, die von *A. elegantissima* stammen. Nach dem Einsatz einer Biotin-markierten Sonde aus genomischer DNA von *A. elegantissima* konnte eine Hybridisierung im Genom von *A. multiculmis* beobachtet werden (ohne Abbildung).

Aufgrund der RAPD-Analysen kann eine Beteiligung von *A. cupaniana* mit dem Karyotyp [A] an dem Genom von *A. multiculmis* in Betracht gezogen werden (siehe Kapitel 3.3.2.4.2).

Der Nachweis darüber steht trotz intensiver Bemühungen noch aus.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Untersuchung des Verwandtschaftskomplexes der Gattung *Aira* angewendet. Diese werden den einzelnen Ergebnisteilen entsprechend diskutiert. Abschließend werden die Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, um Aussagen über die phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb der Gattung treffen zu können.

### 4.1 Morphologie

#### 4.1.1 Arten-Überblick

Die Einteilung der Gattung *Aira* L., die innerhalb der großen Familie der Poaceae zum Tribus *Aveneae* und darunter zum Subtribus *Airinae* gehört, ist anfangs einzig aufgrund morphologischer Merkmale in verschiedene Sektionen vorgenommen worden. Diese Einteilung beruht prinzipiell auf der Arbeit von ASCHERSON & GRAEBNER, die bereits 1899 die verschiedenen Arten der Gattung *Aira* entsprechend ihrer Rispenform und Ährchenstiellänge den drei Sektionen *Trichodaera*, *Euaera* (= *Aira*) und *Pycnaera* zugeordnet haben.

ALBERS & BUTZIN haben 1977 eine neue Einteilung innerhalb der Gräser vorgenommen, indem sie den von HOLUB (1958) vorgeschlagenen Entwurf aufgrund seiner Unzulänglichkeit sowie seiner nach den Nomenklaturregeln nicht gültigen Veröffentlichung verworfen haben. Unter Beibehaltung des gesamten Inhalts sind an Stelle einer Subtribus bei HOLUB nun zwei Subtriben geschaffen worden: die Subtribus *Aristaveninae* Albers & Butzin und die Subtribus *Airinae* Fries emend. Albers & Butzin.

Dadurch sind die Verwandtschaftsverhältnisse dieser Gruppe auf eine wesentlich sichere Grundlage gestellt worden, da zusätzlich anatomische und karyologische Gesichtspunkte in die Systementwürfe einfließen, ohne dass die Ergebnisse der Morphologie im floralen Bereich in ihrer Bedeutung zurückgesetzt worden sind. Dies bedeutet auch, dass sich an der bisherigen Einteilung der *Aira*-Arten in die jeweiligen Sektionen nichts geändert und die Zuordnung anhand des Charakters der Rispe in Verbindung mit der Ährchenstiellänge weiter Gültigkeit hat.

Die Sektion *Euaera* (= *Aira*) mit 7 Vertretern bildet die größte der drei Sektionen, gefolgt von der Sektion *Trichodaera* mit 5 *Aira*-Arten und letztlich der Sektion *Pycnaera*, die einzig die Art *A. praecox* beinhaltet.

Die Gattung *Aira* trägt als Gesamtblütenstand gewöhnlich eine locker ausgebreitete, breit eiförmige Rispe, die jedoch bei *A. praecox* durch eine Verkürzung der Rispenäste stark zusammengezogen ist (ALBERS 1980). Diese Art unterscheidet sich von allen anderen Arten durch ihre kompakte Rispenform und die Zweige, die kaum länger sind als die Ährchen (ALBERS 1975b), wodurch sich ihre Sonderstellung erklären läßt.

Als Beispiel für die eingangs erwähnte Einteilung nach morphologischen Charakteren hat dieser einzigartige Rispencharakter bei *A. praecox* zu einer Zuordnung als einziger Vertreter der Sektion *Pycnaera* geführt. Karyologische Gesichtspunkte haben diesbezüglich noch keine Rolle gespielt.

Die Gattung *Aira* besteht einzig aus annuellen Arten und stellt im Bereich der Subtribus *Airinae* ein phylogenetisch jüngeres Taxon dar, wobei sie aber durch ihre Entwicklungsdynamik starken Veränderungen unterworfen ist (ALBERS 1976).

Einige Arten sind morphologisch sehr gut voneinander zu unterscheiden, wie z.B. *A. praecox* mit ihrer kleinwüchsigen Gestalt und ährenförmig zusammengezogenen Rispe. Vergleichbares existiert nur in der Gattung *Aiopsis*, die ebenfalls der Tribus *Airinae* angehört und in der die Arten eine ährenförmige Rispe besitzen. Hier geht mit dem Zusammenziehen der Rispe eine Verkürzung der Ährchenstiele einher (ALBERS 1980).

Andere Arten wiederum lassen sich morphologisch nur schwer voneinander unterscheiden.

*A. elegantissima* und *A. tenorei* ähneln sich im Habitus sehr (Abb. 3.2 und 3.3), unterscheiden sich aber hinsichtlich der Ährchenmorphologie deutlich voneinander (STEINERT 1988).

Die Längen der Hüll- und Deckspelzen bei beiden Arten sind verschieden. Während sie bei *A. tenorei* eine eher abgerundete Form haben, sind sie bei *A. elegantissima* sehr spitz und die Deckspelzen sind in zwei Zipfeln ausgezogen (STEINERT 1988).

Ein weiteres sicheres Unterscheidungsmerkmal sind die Antheren, die bei *A. elegantissima* nur halb so groß sind wie bei *A. tenorei*. Dies korreliert mit der Tatsache, dass *A. elegantissima* die kleinsten Ährchen in der Gattung besitzt (ALBERS 1975b). Die Verkleinerung von Antheren bei einjährigen Arten der *Airinae*, wie auch bei der Gattung *Aira*, ist mit der Veränderung des Bestäubungsmechanismus verknüpft, denn nur die

autogamen annuellen Pflanzen können sich diese ökonomischere Pollenproduktion leisten (ALBERS 1980).

Normalerweise tragen die Deckspelzen der zu der Gattung *Aira* zählenden Arten eine gekniete Granne, deren Ansatzstelle häufig bis zur Deckspelzenmitte verschoben ist (Abb. 3.1). Diese Grannen zeigen morphologisch und anatomisch ein sehr einheitliches Bild und unterscheiden sich nur durch Länge und Durchmesser voneinander (ALBERS 1976).

Im Vergleich zu den Ährchen anderer *Aira*-Arten ist das Fehlen der Grannen bei *A. tenorei* sehr charakteristisch, denn STEINERT (1988) hat dies bei 90% der Vertreter von *A. tenorei* beobachtet.

Auf der Ebene der beiden Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* hat sich neben der Morphologie der Deck- und Vorspelze (nach BUSCHMANN 1948, PAUNERO 1955) die unterschiedliche Beschaffenheit der Grannen dieser Subtriben als wertvolle Hilfe zur Charakterisierung der Gattungen *Aristavena*, *Deschampsia*, *Corynephorus* und *Vahlodea* einerseits und als übergreifendes Indiz für die Zusammengehörigkeit der Gattungen *Aira*, *Periballia* und *Avenella* andererseits erwiesen (ALBERS 1980).

Dass die Gattung *Aira* als ein phylogenetisch jüngeres Taxon durch ihre Entwicklungsdynamik starken Veränderungen unterworfen ist, spiegelt sich auch bei der Ausbildung der Granne wider, denn in diesem Bereich weist die Entwicklungsrichtung eindeutig auf Reduktion und Funktionslosigkeit der Granne hin (ALBERS 1976). Unbewehrte Deckspelzen, d.h. ohne Grannen, sind nur bei verschiedenen einjährigen Gattungen zu beobachten, und deuten wahrscheinlich auf eine Anpassung an veränderte Ausbreitungsvoraussetzungen hin (ALBERS 1980).

Neben *A. tenorei* kann auch bei *A. cupaniana* an der Deckspelze der unteren Blüte die Granne reduziert sein oder ganz fehlen (ALBERS 1976). Vergleichbar mit der Art *A. tenorei* wachsen bei *A. cupaniana* die dünnen Stengel oft in Büscheln (siehe Abb. 3.4), wohingegen sie bei *A. elegantissima* gebüschelt oder einzeln wachsen können. *A. cupaniana* besitzt eine Antherenlänge von durchschnittlich 0,23 mm, was annähernd der Antherengröße von *A. elegantissima* entspricht. Da das Verhältnis der Ährchenlängen zu den Längen der Ährchenästen deutlich geringer ist, macht die Rispe einen mehr zusammengezogenen Eindruck (STEINERT 1988). ALBERS (1975b) hat schon früher die These geäußert, dass die



Arten *A. cupaniana*, *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* bereits als Keimlinge auseinander gehalten werden können, da sich von einer *A. cupaniana*-Karyopse selten mehr als ein Halm entwickelt. Demgegenüber formen die beiden anderen Arten kleine Schopfe, welche bei *A. caryophyllea* höher, bei *A. multiculmis* dagegen eher flacher und mit vielen Halmen versehen sind.

Diese Aussage muss auf eine habituelle Ähnlichkeit zwischen den drei Arten zurückgeführt werden, die augenscheinlich existiert. In der schwierigen morphologischen Abgrenzung zwischen *A. cupaniana* gegen *A. multiculmis* haben sich innerhalb gewisser Variationsbreiten die Ährchen-, Antheren- und Karyopsenlängen als konstante Differentialmerkmale erwiesen (ALBERS & ALBERS 1973).

Die beiden Arten *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* zeigen auf morphologischer Basis große Ähnlichkeiten, wodurch sie schwer voneinander zu unterscheiden sind. Manchmal kann man sie nur anhand der Ährchengröße auseinander halten, die bei *A. caryophyllea* zwischen 2,5-3,5 mm und bei *A. multiculmis* zwischen 2-2,5 mm liegt (DONNERMEYER 1986). So hat sich die Größe der Ährchen als ein wichtiges Bestimmungsmerkmal innerhalb der Gattung *Aira* herausgestellt.

PALATINI (1991) hat jedoch festgestellt, dass das Merkmal der Ährchenlänge für *A. multiculmis* wesentlich weiter gefaßt werden muss, so dass seiner Meinung nach dieses Merkmal für die Differenzierung zwischen den beiden Arten keine Bedeutung mehr hat. Ährchen, für die 2,5-3,5 mm bei *A. caryophyllea* und 2-2,5 mm bei *A. multiculmis* angegeben sind, können nur sehr schwer eindeutig auseinander gehalten werden. Wenn man sich also nur auf dieses Bestimmungsmerkmal verläßt, kommen sicherlich auch Verwechslungen vor.

Es gibt jedoch noch ein weiteres, manchmal nur undeutlich erkennbares Merkmal zwischen den beiden Arten. So kann man innerhalb der Sektion *Euaera* (= *Aira*) die früher häufig als Unterart von *A. caryophyllea* betrachtete Art *A. multiculmis* durch eine knickig hin- und hergebogene Rispenachse (Abb. 4.1) unterscheiden, wobei sich in den Verzweigungspunkten der Äste an der Hauptachse häufiger als bei anderen Arten sterile Rispenäste befinden.

Erst durch karyologische Untersuchungen ist eine eindeutige Bestimmung möglich, denn hier zeigen beide Arten einen deutlich abweichenden Karyotyp zueinander. Dies wird im anschließenden Diskussionsteil zur Karyologie ausführlicher zur Sprache kommen.

Wenn man von *A. multiculmis* spricht, muss man auch die tetraploide Art *A. armoricana* mit dem symmetrischen Karyotyp [AA] betrachten.

*A. armoricana* ist 1979 von ALBERS als neue Art beschrieben worden und nach bisherigen Erkenntnissen auf Nordwest-Frankreich und auf Cornwall (England) beschränkt. Sie zeigt habituelle Ähnlichkeiten mit der Art *A. multiculmis*, ist aber durch die größeren Ährchen deutlich von dieser abgetrennt.

ALBERS (1980) vermutet, dass sich *A. armoricana* aus Ökotypen von *A. multiculmis* entwickelt hat. Unterstützt wird diese Hypothese

durch Beobachtungen über ein gehäuftes Vorkommen sehr hochwüchsiger Populationen in hoher und relativ dichter Vegetation (*A. multiculmis*), sowie eine Häufung niedrigwüchsiger Formen in küstennahen, windexponierten und sehr offenen Flächen (*A. armoricana*). Dies deutet auf eine unterschiedliche ökologische Differenzierung von *A. multiculmis* und *A. armoricana* hin.

Ähnliches existiert in der nah verwandten Gattung *Deschampsia*. Untersuchungen an dem *Deschampsia cespitosa*-Komplex (CHIAPELLA 2000) konzentrierten sich auf die Beziehung zwischen der morphologischen Variabilität und der Umgebung, und haben gezeigt, dass die Taxa ein hohes Maß an morphologischer Ähnlichkeit zeigen, es aber Anpassungen an besondere Umgebungen gibt, die oft in der Bildung von Ökotypen resultieren und die beginnende Artbildung darstellen.

Bereits 1978 hat ALBERS festgestellt, dass die Arten *A. armoricana*, *A. multiculmis* und *A. caryophyllea* sehr deutlich durch ein bestimmtes Längenverhältnis der Ähren und Antheren charakterisiert sind. Diese deutliche Abgrenzung allein aufgrund der Ährchenlänge wird von PALATINI (1991) jedoch nicht so gesehen, denn der Autor hat eher fließende Übergänge bei der Ährchenlänge, aber bezüglich der Antherenlänge eine bessere Unterscheidung der beiden Arten im Vergleich zu *A. caryophyllea* feststellen können.

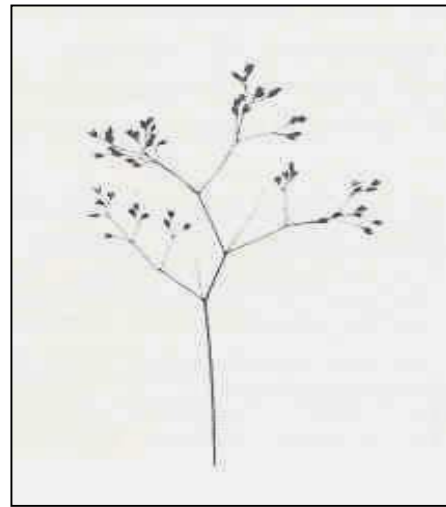


Abb. 4.1: Rispe bei *A. multiculmis*

Zahlreiche morphologische Untersuchungen haben gezeigt, dass zwischen Pflanzen derselben Art, die an verschiedenen Standorten vorkommen, Unterschiede im Habitus, in der Ährchengröße, der Keimzeit und auch der Anthesezeit bestehen können. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Karyotyp der Pflanze einen gewissen Anpassungszustand an Umweltbedingungen darstellt (DONNERMEYER 1986).

Ähnliches in Bezug auf die Anthesezeit ist von ALBERS & ALBERS (1973) an diploiden und tetraploiden Sippen von *Aira* im Massif des Maures in der Provence (Frankreich) festgestellt worden, als eine Abhängigkeit der Blütezeit von der geographischen Lage des Fundortes nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der offensichtlich existierenden ökologischen Differenzierung können sämtliche Arten nebeneinander am gleichen Standort vorkommen.

Ebenso können Pflanzen mit nah beieinander liegenden Standorten deutliche morphologische und auch karyologische Unterschiede zeigen, was von DONNERMEYER (1986) an der Art *A. multiculmis* speziell auf karyologischer Ebene untersucht worden ist.

Insgesamt kann auf morphologischer Ebene herausgestellt werden, dass sich die Arten der Gattung *Aira* untereinander zum Teil sehr stark ähneln und viele Gemeinsamkeiten zeigen. Dies hat im Laufe der Zeit zu Hybridisierung der Arten untereinander und damit zur Bastardierung geführt. Nennen kann man hier als Beispiele *A. intermedia*, *A. caryophyllea*, *A. multiculmis* und *A. provincialis*.

Bei *A. intermedia* wird vermutet, dass sie aus der Verbindung von *A. tenorei* und *A. cupaniana* hervorgegangen sein könnte, denn basierend auf morphologischen Befunden zeigt die Art einen intermediären Charakter aus eben diesen Arten (ALBERS 1978).

Bei *A. caryophyllea* wird eine Bastardierung aus den Arten *A. elegantissima* und *A. praecox* vorausgesetzt, was jedoch nicht mit morphologischen Befunden belegt werden kann. Bei *A. multiculmis* wird bei Betrachtung aller Ergebnisse eine Bastardierung aus *A. elegantissima* und *A. cupaniana* vermutet. Aber auch dies kann nicht mit morphologischen Befunden gesichert werden.

Obwohl Hybridisierungen in der Gattung bereits stattgefunden haben, gibt es dennoch gewisse Kreuzungsbarrieren unter den Arten. Bei der genetischen Barriere bilden die parallel mit einigen diploiden Arten blühenden tetraploiden Arten durch ihre Karyotypen eine unüberwindbare genetische Barriere, die auch ein Vermischen der Arten *A. caryophyllea* und

*A. provincialis* in einem zum Teil überlappenden Verbreitungsgebiet verhindert. So setzt beispielsweise wenige Tage, nachdem die diploide *A. cupaniana* zu blühen beginnt, auch die Anthese bei der tetraploiden Art *A. caryophyllea* ein. Gleiches gilt für die im späten April blühend anzutreffende tetraploide Art *A. provincialis*, sehr bald folgend von der diploiden *A. tenorei*.

Durch die am natürlichen Standort sehr kurzen (wenige Tage bis maximal zwei Wochen bei schlechter Witterung) Blütezeiten wird eine Bastardierung zwischen den diploiden und tetraploiden Arten weniger wahrscheinlich (STEINERT 1988), was auf eine zeitliche Kreuzungsbarriere hindeutet. Die aufeinander folgende Entwicklung der Blütezeiten in Kombination mit den unterschiedlichen Karyotypen demonstriert einen gut funktionierenden Isolationsmechanismus bei der windbestäubten Gattung *Aira* (ALBERS 1979).

Die zeitliche Kreuzungsbarriere soll besonders bei den diploiden Arten, die einen ähnlichen, aber nicht identischen Karyotyp [A] haben, eine Bastardierung verhindern. Eine Betrachtung der Anthesezeiten zeigt deutlich voneinander abgesetzte Blütezeiten (ALBERS & ALBERS 1973). Bei verschiedenen tetraploiden Arten hat PALATINI (1991) herausgestellt, dass die Anthesezeiten bei Freilandkulturen ebenfalls eine abgestufte Blühabfolge zeigen, wobei Witterungsschwankungen nicht berücksichtigt wurden. So blüht *A. armoricana* mit dem Karyotyp [AA] am frühesten, was nach PALATINI (1991) auf die klimatisch begünstigten Küstenregionen, an denen die Art vorkommt, zurückzuführen ist. Etwa zeitgleich mit *A. armoricana* blüht auch *A. caryophyllea*. Da diese Art jedoch mit [AB] einen anderen Karyotyp besitzt, liegt zwischen beiden Arten eine genetische Barriere vor. Die hochwüchsige *A. multiculmis*, die den gleichen Karyotyp wie *A. armoricana* besitzt, kommt dagegen erst später zur Blüte.

Insgesamt haben sich die Beobachtungen über den Zeitpunkt der Anthese, besonders bei sympatrischem Vorkommen nah verwandter annueller Arten der Gattung *Aira*, als sehr wichtig herausgestellt. Gleichzeitig gestalten sie sich als schwierig, da die auf die Mediterraneis beschränkten sympatrischen Arten im Freiland zu sehr auswintern und sich so nur Provenienzen vergleichend betrachten lassen, die in einem engen Areal vorkommen, weil ihre Entwicklungsdauer von Süden nach Norden außerordentlich zunimmt (ALBERS 1980).

Da sich im Laufe der Evolution die Rahmenbedingungen mehrfach dramatisch geändert haben, wurden durch diese Änderungen der Umweltbedingungen auch die

Selektionsrichtungen manchmal mehrfach geändert. Kreuzungsexperimente mit nah verwandten Arten haben gezeigt, dass sich Kreuzungsbarrieren rascher und deutlicher bei Sippen entwickeln, die das gleiche Areal besiedeln, als bei Sippen, die nie miteinander in Kontakt geraten.

#### 4.1.2 Morphologische Merkmalsmatrix

Für die Zusammenstellung einer morphologischen Merkmalsmatrix sind in der einschlägigen Literatur und zum Teil durch eigene Beobachtungen Merkmale herausgesucht worden, die für eine Analyse geeignet schienen. Diese entstammen dabei nicht nur der Morphologie, sondern sind auch dem karyologischen Bereich entnommen.

Insgesamt sind 13 Charaktere (siehe Ergebnisteil) bei den Arten der Gattung *Aira* mit der *Outgroup* *Poa pratensis* verglichen worden. Im Endeffekt muss man sagen, dass diese Analyse keine neuen Erkenntnisse zu Tage gebracht hat. Da im vorangegangenen Kapitel viel über die morphologischen Ähnlichkeiten einiger Arten zueinander gesprochen worden ist, scheint dies nicht weiter verwunderlich.

Von den 13 Charakteren fallen bereits 4 (u.a. die ährenförmige Rispenform bei *A. praecox* und die Knickung der Rispenachse bei *A. multiculmis*) als parsimony-uninformativ heraus, da sie jeweils nur für eine der Arten autapomorph sind. Das bedeutet, es handelt sich bei diesem Charakter um ein abgeleitetes Merkmal, welches nur bei einem bestimmten Taxon vorkommt (WAGENITZ 1996). Damit ein Charakter Gewicht haben kann und aussagekräftig ist, muss er mindestens bei zwei Arten vorkommen, wie z.B. der Charakter des asymmetrischen Karyotyps, der bei *A. praecox* und *A. caryophyllea* vorkommt. Dennoch waren die übrigen 9 als parsimony-informativ eingestuften Charaktere nicht ausreichend, um eine umfangreiche Unterteilung zu bewirken.

Das dargestellte Kladogramm (Abb. 3.8) zeigt ein polytomes Muster, in dem einzig zwei Gruppierungen mit nur schwachen *Bootstrap*-Werten vorkommen. Nicht einmal die Art *Poa pratensis* tritt in diesem Muster als *Outgroup* hervor. Die Subclade I besteht aus vier diploiden Arten mit dem symmetrischen Karyotyp [A], die sich durch morphologische Ähnlichkeiten auszeichnen. Demgegenüber hat sich die Subclade II, bestehend aus *A. praecox* und *A. caryophyllea*, hauptsächlich aufgrund ihres gemeinsamen asymmetrischen Karyotyps zusammengefunden, der sonst bei keinem weiteren Vertreter innerhalb der Gattung *Aira* auftritt.

Besonders die tetraploiden Arten, die mit Ausnahme von *A. caryophyllea* allesamt dem gleichen Karyotyp [AA] zuzuordnen sind, können in dieser Analyse zu keiner weiteren Clade gruppiert werden. Es scheinen somit morphologische Unterschiede zwischen diesen Arten vorzukommen, die vermutlich durch die Anpassung an unterschiedliche Verbreitungsgebiete hervorgerufen wurden, aber nicht durch die ausgewählten Charaktere in dieser Matrix erfaßt sind.

Man kann letztendlich anhand des Kladogramms keine weiteren Erkenntnisse über die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Arten der Gattung *Aira* feststellen. Einzig die bereits vorhandene Unterteilung bzw. Einteilung der Arten kann wiedergegeben werden.

## **4.2 Karyologie und Verbreitung**

### **4.2.1 Karyologie**

Karyotypanalysen haben wesentlich zum Verständnis von Evolutionsprozessen beigetragen. Durch die Analyse von Karyotypen, bei gleichzeitiger Untersuchung der geographischen Verbreitung und der ökologischen Ansprüche nah verwandter Arten, kann man einen bedeutenden Schritt auf dem Wege zur Aufklärung phylogenetischer Zusammenhänge machen. Die Verbreitung der Arten wird im folgenden noch besprochen. Es ist ersichtlich, dass die Entwicklung der unterschiedlichen Karyotypen innerhalb der Gattung *Aira* nur durch die gemeinsame Betrachtung der karyologischen und geographischen Aspekte geklärt werden kann.

Das Ziel der karyologischen Untersuchungen, insbesondere durch Chromosomenanalysen unterschiedlicher diploider und tetraploider Arten, liegt darin einen Versuch zur Rekonstruktion der phylogenetischen Entwicklung innerhalb der Gattung vornehmen zu können. Da übereinstimmende Chromosomenzahlen bei nah verwandten Sippen für die Systematik und Phylogenie nicht immer sehr informativ sind, wurde bereits früher versucht, auch Befunde über die Chromosomenmorphologie für die Verwandtschaftsforschung heranzuziehen (ALBERS 1980a). Chromosomenmorphologische Ähnlichkeiten sind zwar kein Beweis für strukturelle Ähnlichkeiten, aber ein Vergleich von Karyotypen innerhalb begrenzter Verwandtschaftskreise ist sinnvoll, da charakteristische „Marker“-Chromosomen

art- und gattungsübergreifende Hinweise auf phylogenetische Zusammenhänge liefern können (ALBERS 1980a).

Seit WULFF (1937) und HAGERUP (1939) sind die beiden in der Gattung *Aira* vorkommenden Chromosomenzahlen 14 und 28 bekannt, wobei die auftretende Basiszahl von  $x = 7$  auch bei anderen Gattungen der Subtribus *Airinae* vorherrschend ist. Die einzelnen Arten wurden bereits früher von ALBERS (1978a, 1978b, 1980, 1980a, 1980b), DONNERMEYER (1986) und STEINERT (1988) untersucht, so dass in vielen Fällen ein Vergleich der Daten vorgenommen werden kann.

Die Untersuchungen der Metaphase-Platten fanden an den ausgewählten Arten *A. elegantissima* [Karyotyp A], *A. praecox* [B], *A. multiculmis* [AA] und *A. caryophyllea* [AB] statt. Ebenfalls mit einbezogen wurden *A. tenorei* [A] und *A. cupaniana* [A], denen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der tetraploiden Karyotypen zugesprochen wird.

Die Ergebnisse entsprechen überwiegend den Literaturwerten, wobei kleinere Abweichungen bei der Auswertung festgestellt werden können. Diese sind u.a. darauf zurückzuführen, dass bei Chromosomenuntersuchungen bereits bei der Suche nach homologen Chromosomen eine mehr oder weniger subjektive Zuordnung vorgenommen werden muss (PALATINI 1991). Die Chromosomengesamtlänge wie auch das Verhältnis von kurzem zu langem Chromosomenarm können sehr unterschiedlich sein (BENTZER *et al.* 1971), so dass abweichende Karyotypen öfter beobachtet werden und auch innerhalb einer einzelnen, morphologisch sehr homogenen Population auftreten können.

Beginnend mit der Genomgesamtlänge von 43,23 $\mu\text{m}$  bei der diploiden Art *A. elegantissima* findet sich bei STEINERT (1988) ein Wert von 67,91 $\mu\text{m}$ , der somit deutlich höher ist. Demgegenüber haben sowohl ALBERS (1980a) mit 49,5 $\mu\text{m}$  als auch DONNERMEYER (1986) mit 50 $\mu\text{m}$  ähnliche Werte ermittelt.

Dies zeigt sich auch bei der Chromosomengrößenvariation. Bei STEINERT (1988) variieren die Chromosomenlängen zwischen 3,9 und 5,5 $\mu\text{m}$ , wohingegen sie sowohl bei ALBERS (1980a) als auch bei DONNERMEYER (1986) zwischen 2,9 und 4,2 $\mu\text{m}$  liegen. Auch hier stimmen die ermittelten Daten von 2,2 bis 4,01 $\mu\text{m}$  eher mit denen der letztgenannten Autoren überein.

Der Karyotypsymmetrie-Index ist mit 54,72 etwas geringer, als er bei STEINERT (1988) mit 56,15 bzw. bei ALBERS (1980a) und DONNERMEYER (1986) mit 57,57 bzw. 56,6 angegeben

wird. Da ALBERS (1980a) und DONNERMEYER (1986) bezüglich der Beschreibung der Chromosomen jeweils ein Chromosomenpaar mit submedianer Centromerlage und sechs Chromosomenpaare mit medianer Centromerlage beschrieben haben, erklärt dies den etwas höheren Index der Karyotypsymmetrie.

In Einklang mit STEINERT (1988) kann man für *A. elegantissima* einen sehr homogenen Karyotyp feststellen, da alle Chromosomen nur mediane Centromerpositionen besitzen. Das Vorhandensein eines Chromosomenpaares mit Satelliten wird von allen Autoren bestätigt. Eine zusätzliche sekundäre Einschnürung bei zwei Chromosomen konnte nicht ermittelt werden, wird jedoch als vereinzelt Auftreten bei ALBERS (1980a), DONNERMEYER (1986) und STEINERT (1988) beobachtet.

Der Karyotyp dieser Art mit überwiegend bis ausschließlich isobrachialen Chromosomen wird nach BAUMBERGER (1970) als Basis-Karyotyp [A] angesehen, wobei aber nach ALBERS (1980a) bereits der schon von LEWITZKY (1931) beschriebene allgemeine Trend zur Asymmetrie sichtbar sein soll.

Die diploide Art *A. tenorei* zeichnet sich durch eine Genomgesamtlänge von 57,64µm aus, die deutlich geringer ist als die bei STEINERT (1988) angegebene Karyotyplänge von 72,8µm. Bezüglich der Chromosomengrößenvariation sowie des Karyotypsymmetrie-Index lassen sich die Werte in Einklang bringen.

Das Vorhandensein eines Satelliten konnte ebenfalls beobachtet werden, aber während STEINERT (1988) unregelmäßig sekundäre Einschnürungen finden konnte, traten diese in den Untersuchungen nicht auf. Ein weiterer Unterschied besteht in der Tatsache, dass alle 14 vorhandenen Chromosomen eine mediane Centromerposition besitzen und somit als metacentrisch zu bezeichnen sind, wohingegen STEINERT (1988) ein Chromosomenpaar mit submedianer Centromerlage identifizieren konnte. Dennoch zeigt ein Blick auf die beiden Idiogramme von *A. elegantissima* und *A. tenorei* (Abb. 3.10 und 3.16) die Ähnlichkeit beider Arten. So scheint auch eine Zuordnung von *A. tenorei* zu dem Grundkaryotyp [A] nach ALBERS (1978a) außer Frage zu stehen.

Für die diploide Art *A. cupaniana* wurde mit 50,85µm ein deutlich niedriger Wert bezüglich der Genomgesamtlänge ermittelt als laut Literatur (STEINERT 1988) zu erwarten war. Die Chromosomen sind mit einer Länge zwischen 2,57 und 4,59µm insgesamt kleiner als bei



STEINERT (1988), der eine Variation von 3,8 bis 5,8 $\mu$ m feststellen konnte. Dies spiegelt sich auch in dem Größengradienten (56,09) wider, der bei STEINERT (1988) mit 51,35 angegeben ist.

Der Index der Karyotypsymmetrie stimmt mit dem erwarteten Wert überein. Auch das Fehlen von Satelliten und sekundären Einschnürungen kann bestätigt werden. Bezüglich der Beschreibung der Chromosomen gibt es eine kleine Abweichung, da nur metacentrische Chromosomen gefunden wurden, wohingegen bei STEINERT (1988) ein Chromosomenpaar eine submedianer Centromerposition zeigt.

Bezüglich des Index der Karyotypsymmetrie stimmen die drei Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei* und *A. cupaniana* mit ihren fast identischen Werten und ihren isobrachialen Chromosomensätzen mit ausschließlich medianem Centromer überein. So kann trotz des Fehlens von Satelliten auch *A. cupaniana* dem Grundkaryotyp [A] nach ALBERS (1980b) zugeordnet werden.

*A. praecox* kann aufgrund ihres abweichenden asymmetrischen Karyotyps nicht mehr dem bisher besprochenen Typ [A] zugeschrieben werden, sondern gehört als einzige Art dem Grundkaryotyp [B] an. ALBERS (1978b) hat diesbezüglich erwähnt, dass der asymmetrische Karyotyp von *A. praecox* bei nahezu unveränderter Genomgesamtlänge aus dem Karyotyp von *A. elegantissima* hervorgegangen ist, und die strukturellen Veränderungen durch perizentrische Inversion und/oder ungleiche Translokation an isobrachialen Chromosomen zustande gekommen ist.

Die Art besitzt eine durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes von 53,49 $\mu$ m mit einer Chromosomengrößenvariation von 2,7 bis 4,8 $\mu$ m. Damit ist die Karyotyplänge kürzer als bei DONNERMEYER (1986) mit 58,8 $\mu$ m angegeben, jedoch länger bei ALBERS (1980a) mit 46,6 $\mu$ m. Der Index der Karyotypsymmetrie ist mit 59,64 deutlich niedriger als bei DONNERMEYER (1986) mit 75,28. Dort ist er aufgrund seines hohen Wertes eindeutig als asymmetrisch zu bezeichnen, wohingegen der Karyotypsymmetrie-Index nach den vorliegenden Analysen nur durch den Vergleich mit den bereits besprochenen Arten des Karyotyps [A] als asymmetrisch zu erkennen ist.

Der geringe Wert lässt sich anhand der 5 metacentrischen Chromosomenpaare mit medianer Centromerposition und den zwei Chromosomenpaaren mit submedianer Centromerposition erklären. Sowohl ALBERS (1980a) als auch DONNERMEYER (1986) haben zwei Paare mit

medianem Centromer sowie 5 Chromosomenpaare mit subterminaler bis terminaler Centromerposition beschrieben. Gleichbleibend feststellen kann man das Vorhandensein eines Satelliten an einem Chromosomenpaar, sowie das überwiegende Vorkommen von einer zusätzlichen sekundären Einschnürung an einem Paar.

Insgesamt entspricht die Auswertung für *A. praecox* nicht den Erwartungen aus der bisherigen Literatur. Aber durch den Vergleich mit den anderen diploiden Arten des Typs [A] sowie durch ihre einzigartige Rispenform kann sie dem abgewandelten Typ [B] zugeordnet werden.

Die tetraploide Art *A. caryophyllea* mit der Chromosomenzahl  $2n = 28$  besitzt eine durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes von  $89,52\mu\text{m}$ . Die Karyotyplänge ist damit deutlich geringer als sie bei ALBERS (1980a) mit  $103,1\mu\text{m}$  sowie bei STEINERT (1988) mit  $119,1\mu\text{m}$  angegeben wird.

Die einzelnen Chromosomenlängen liegen zwischen  $2,13$  und  $4,17\mu\text{m}$ . Dadurch ergibt sich ein Größengradient-Index von  $50,9$ . Bei STEINERT (1988) variiert die Länge der Chromosomen zwischen  $3,4$  und  $5,4\mu\text{m}$ , wodurch ein Größengradient-Index von  $67,4$  festgestellt werden kann. Dieser weicht deutlich von dem ermittelten Wert ab.

Da stets 10 bis 12 Chromosomenpaare mit medianer Centromerposition und dementsprechend nur zwei bis 4 Paare mit submedianem Centromer zu finden waren, ergibt dies nur einen Karyotypsymmetrie-Index von  $56,78$ . Dieser Wert ist im Vergleich zur Literatur ( $61,1$  bei STEINERT 1988) zu niedrig, erklärt sich aber dadurch, dass der Autor neben 10 Chromosomenpaaren mit medianem Centromer ein submetacentrisches Paar sowie 3 Paare mit subtelozentrischer Centromerposition gefunden hat.

In den meisten Fällen konnten zwei Satelliten beobachtet werden, jedoch wurden keine weiteren sekundären Einschnürungen gefunden, die bei STEINERT (1988) und ALBERS (1980a) zumindest teilweise erwähnt werden. Die tetraploide Art *A. caryophyllea* ist vermutlich durch Hybridisierung verschiedener Cytotypen entstanden, so dass sich ihr Genom aus der Summierung zweier unterschiedlicher Genome ergibt.

Bereits 1973 wurde von ALBERS die amphidiploide Entstehung von *A. caryophyllea* diskutiert, und das Augenmerk auf die beiden diploiden Arten *A. elegantissima* und *A. praecox* gelenkt. Tatsächlich erscheint der abgeleitete Karyotyp von *A. praecox* in dem von *A. caryophyllea* wieder. Beide Arten zeichnen sich durch einen asymmetrischeren Karyotyp aus,

im Gegensatz zu den Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei* und *A. cupaniana* mit dem Typ [A]. Dies spiegelt sich zwar in einem nur mäßig erhöhten Karyotypsymmetrie-Index wider, aber *A. praecox* zeigt von allen diploiden Arten das stärkste Vorkommen an submetacentrischen und z.T. subtelocentrischen Chromosomen, die typisch für einen asymmetrischen Karyotyp sind. Diese Tendenz ist bei *A. caryophyllea* wiederzufinden, so dass eine Beteiligung von *A. praecox* mit seinem abgewandelten Karyotyp [B] an dem tetraploiden Genom [AB] als sicher ansehen ist.

Schwieriger ist die Antwort auf die Frage nach der beteiligten diploiden Art mit dem Karyotyp [A]. Ersten Vermutungen zufolge könnte es sich dabei um *A. elegantissima* handeln (ALBERS 1973), denn die Centromerlagen der *A. elegantissima*- und der *A. praecox*-Chromosomen stimmen mit denen von *A. caryophyllea* weitgehend überein (ALBERS 1978b). Geht man davon aus, dass die Art ein Chromosomenpaar mit Satelliten besitzen muss, würde dies die Suche auf *A. elegantissima* und *A. tenorei* eingrenzen, denn *A. caryophyllea* bekommt von *A. praecox* nur eines ihrer zwei Satelliten-Paare.

DARLINGTON (1941) fiel jedoch auf, dass bei polyploiden Karyotypen Unterschiede in der Zahl der zu erwartenden SAT-Chromosomen auftreten können. Damit beruft er sich auf NAWASHIN, der bereits 1928 diese möglichen Veränderungen eines Karyotyp nach einer Hybridisierung durch Studien an *Crepis*-Chromosomen mit dem Begriff „Amphiplastie“ beschrieben hat. NAWASHIN unterscheidet die differenzielle Amphiplastie, bei der einzelne Chromosomen z.B. durch das Verschwinden von Satelliten betroffen sind, von der neutralen Amphiplastie, bei der es zu einer Verlängerung oder Verkürzung aller Chromosomen einer Art im Genom des Hybriden kommt.

ALBERS (1980a) bezeichnet mit dem Begriff „differenzierende Amphiplastie“ die fehlenden Einschnürungen an den Chromosomen bei einem der beteiligten Genome in einem interspezifischen Hybrid, sowie die Tatsache, dass ein Satellit durch die fehlende Einschnürung nicht mehr als solcher erkannt werden kann.

Da im Gegensatz zu ALBERS (1980a) bei *A. caryophyllea* zwei SAT-Chromosomenpaare gefunden wurden, scheint keines verloren gegangen zu sein, so dass beide Ausgangsarten jeweils ein Satelliten-Paar besitzen müssen.

Bei Betrachtung der Genomgesamtlänge der beiden potentiellen Elternarten *A. praecox* und *A. elegantissima* erkennt man, dass eine Addition beider Werte etwa der durchschnittlichen Genomgesamtlänge von *A. caryophyllea* entsprechen würde.

Bei ALBERS (1980a) hat sich in einer Gegenüberstellung der durchschnittlichen Chromosomenlängen gezeigt, dass die Chromosomen aus dem Genom von *A. praecox* eine Vergrößerung in dem Genom von *A. caryophyllea* erfahren haben. Dies entspricht der von NAWASHIN (1928) beschriebenen neutralen Amphiplastie.

Im Gegensatz zu der Vergrößerung der Chromosomen (ALBERS 1980a) kann hier jedoch festgestellt werden, dass die Chromosomen im Genom von *A. caryophyllea* kleiner sind als in den Ausgangsgenomen von *A. praecox* und *A. elegantissima*, wobei die stets im Genom von *A. praecox* vorhandene sekundäre Einschnürung im Genom von *A. caryophyllea* insgesamt verloren gegangen zu sein scheint.

Die tetraploide Art *A. multiculmis* entspricht mit ihren ermittelten Werten den Erwartungen aus der Literatur. Die durchschnittliche Gesamtlänge des Chromosomensatzes weicht mit 101,39µm nur geringfügig von der bei ALBERS (1980a) mit 96,2µm und bei DONNERMEYER (1986) mit 98,9µm angegebenen Länge ab.

Der geringe Karyotypsymmetrie-Index von 54,5 erklärt sich durch das Vorkommen von 28 ausschließlich metacentrischen Chromosomen. Diese variieren in ihrer Länge zwischen 2,25 und 5,16µm, wodurch sich ein Größengradient-Index von 43,6 ergibt. Dies lässt sich nicht mit den Ergebnissen von ALBERS (1980a) und DONNERMEYER (1986) in Einklang bringen, die jeweils 12 Chromosomenpaare mit medianer Centromerposition und zwei Chromosomenpaare mit submedianem Centromer beobachtet haben, wodurch sich der höhere Karyotypsymmetrie-Index von 58 erklären lässt.

Bei allen untersuchten Metaphase-Platten wurde ein Chromosomenpaar mit Satelliten entdeckt, jedoch nur in der Hälfte aller Fälle ein Paar mit einer sekundären Einschnürung. DONNERMEYER (1986) hat durch frühere Karyotypanalysen bei *A. multiculmis* gezeigt, dass zwischen verschiedenen Standorten zum Teil deutliche karyotypische Unterschiede vorhanden sind und die Gesamtlänge der Karyotypen geringfügig variieren kann. So existieren mehr oder weniger deutliche Unterschiede in der Chromosomenmorphologie zwischen den Standorten, aber auch innerhalb eines Standortes gibt es Variationsbreiten. ALBERS (1978a) und DONNERMEYER (1986) konnten feststellen, dass sich die Chromosomen

von *A. multiculmis* in Vierergruppen einteilen lassen, was bezüglich der Entstehung auf die Verdopplung eines Karyotyps (Autopolyploidie) schließen läßt.

Die Termini „Allopolyploidie“ und „Autopolyploidie“ wurden erstmals von KIHARA & ONO (1926) als zwei verschiedene Typen der Polyploidie beschrieben.

Allopolyploide sind das Produkt einer interspezifischen Hybridisierung, wohingegen Autopolyploide innerhalb von Populationen individueller Pflanzen entstehen. Autopolyploidie beschreibt in diesem Sinne das mehrfache Auftreten eines einfachen Chromosomensatzes, wobei der Begriff üblicherweise für die generative Chromosomensatzvervielfachung verwendet wird. RAMSEY & SCHEMSKE (1998) reservieren den Begriff „Autopolyploid“ für Polyploide, die innerhalb einer einzelnen Population oder zwischen Ökotypen bzw. Rassen einer einzelnen Art entstanden sind.

Nach den oben genannten Definitionen dürfte man bei *A. multiculmis* somit nicht von einer autopolyploiden Art sprechen. Da diese Art durch Hybridisierung zweier verschiedener Arten entstanden ist, müßte man strenggenommen von einer allopolyploiden Bildung ausgehen. Diesbezüglich ist GOTTSCHALK (1976) aber der Ansicht, dass die natürlichen Polyploiden größtenteils allopolyploid sind, wobei sich der zu erbringende Nachweis jedoch schwierig gestaltet.

Auch nach LÖVE (1964) sind die meisten polyploiden Genomassoziationen nicht streng in auto- oder allopolyploide zu fassen. Da mehr oder weniger differenzierte Genome verschiedener Ökotypen einer Art oder nah verwandter Arten zusammentreffen, liegen deren Kombinationen zwischen den Extremen. STEBBINS (1971) hält die Genome der meisten Pflanzen, die über die tetraploide Stufe hinausgehen, für Mischkomplexe auto-allopolyploider Art.

So ist es nach ALBERS (1978b) sehr wahrscheinlich, dass auch *A. multiculmis* mit dem verdoppelten *A. elegantissima*-Karyotyp allotetraploider Natur ist. Dennoch wird bei *A. multiculmis* weiterhin von einer autopolyploiden Bildung gesprochen, die sich in Anlehnung an PUNINA (1987) darauf bezieht, dass eine Hybridisierung zweier Arten stattgefunden hat, die eine große Ähnlichkeit in ihren Chromosomenlängen zeigen. Um keine Mißverständnisse über die Begriffe aufkommen zu lassen und um zu betonen, dass an der Bildung von *A. multiculmis* mit dem Karyotyp [AA] zwei verschiedene Arten mit dem Grundkaryotyp [A] beteiligt sind, wird der Begriff „Allo“autopolyploidie verwendet. Damit soll deutlich werden,

dass nicht der Chromosomensatz einer Art verdoppelt wurde, sondern dass es auch bei *A. multiculmis* zu einer Verschmelzung zweier Genome gekommen ist, die dem selben Karyotyp angehören.

Bei *A. multiculmis* wird eine Verdopplung des *A. elegantissima*-Karyotyp vermutet, da ein Vergleich der Idiogramme (Abb. 3.10 und 3.25) und Karyopolygone (Abb. 3.9 und 3.24) von *A. elegantissima* und *A. multiculmis* große Ähnlichkeiten aufweisen. Auch ALBERS (1980a) hat erwähnt, dass die Chromosomenmorphologie bei *A. multiculmis* auf eine Verdopplung des Karyotyps hinweist, wie er bei *A. elegantissima* vorliegt, ohne dass jedoch Rückschlüsse auf die Ausgangsarten gezogen werden können. Der Karyotyp von *A. elegantissima* ist, wie bereits beschrieben, auch für die diploiden Arten *A. tenorei*, *A. byzantina*, *A. cupaniana* und *A. uniaristata* charakteristisch.

Den Auswertungen zufolge besitzt *A. multiculmis* ein Chromosomenpaar mit Satelliten, aber in weniger als 50% der ausgewerteten Metaphase-Platten eine zusätzliche sekundäre Einschnürung. Dennoch wurde diese Einschnürung im Idiogramm (Abb. 3.25) integriert, weil auch bei ALBERS (1978a) Hinweise auf eine sekundäre Einschnürung gefunden wurden. Es wird jedoch erwähnt, dass sich diese immer nur an einem Paar der vermuteten homologen Partner befindet.

Bei *A. multiculmis* muss ähnlich wie bei *A. caryophyllea* auf eine Entstehung im Mittelmeerraum geschlossen werden, da hier ein Ballungszentrum von diploiden Arten mit dem Karyotyp [A] vorliegt. Neben *A. cupaniana* ist auch *A. elegantissima* weit verbreitet, während *A. tenorei* auf die Küstenzonen des westlichen Mittelmeerraumes begrenzt ist. Zwischen diesen drei Arten kann ein Kontakt stattgefunden und zur Bildung der tetraploiden Art *A. multiculmis* geführt haben. Aufgrund früherer Untersuchungen (ALBERS 1980a) und der besprochenen Ähnlichkeit im Idiogramm kann *A. elegantissima* relativ sicher als eine Elternart von *A. multiculmis* bezeichnet werden.

Für *A. tenorei* als potentielle Elternart würde das Vorhandensein ihres SAT-Chromosomenpaares sprechen, wodurch ihr Idiogramm dem von *A. elegantissima* sehr ähnlich ist. Dieses Satelliten-Paar würde sich im Genom von *A. multiculmis* zumindest in 50% der ausgewerteten Metaphase-Platten als sekundäre Einschnürung wiederfinden lassen. Alternativ würde es im Zuge der differenzierenden Amphiplastie als solches nicht mehr erkannt werden können. Sollte es sich bei *A. tenorei* um die gesuchte Elternart handeln,

würden ihre Chromosomen im Genom von *A. multiculmis* insgesamt eine Verkleinerung erfahren.

ALBERS hat 1978 festgestellt, dass sich bei *A. multiculmis* zwar nur ein SAT-Chromosomenpaar nachweisen lässt, man aber weiterhin an einem Chromosomenpaar eine Einschnürung erkennen kann, die bei den potentiellen Ausgangskaryotypen nicht beobachtet werden konnten. Aufgrund dieser Aussage müßte das Augenmerk auf *A. cupaniana* gerichtet werden, da bei dieser Art weder Satelliten noch sekundäre Einschnürungen gefunden wurden (STEINERT 1988).

Das Genom von *A. cupaniana* ist kleiner als das von *A. tenorei* und stimmt bezüglich Genomgesamtlänge, Beschreibung der Chromosomen, Chromosomengrößenvariation und Karyotypsymmetrie-Index mit demjenigen von *A. elegantissima* überein. Eine Kombination beider Genome sowie eine Zusammenfassung beider Werte würde die ermittelten Werte von *A. multiculmis* bestätigen.

Karyotypbestimmungen haben nicht nur den einheitlichen symmetrischen Karyotyp für *A. multiculmis*, sondern auch für die tetraploide Art *A. armoricana* bestätigt (PALATINI 1991). Bezüglich der Entstehung wurde bereits eine Entwicklung aus Ökotypen von *A. multiculmis* vermutet. Hierzu hat sich PUNINA (1987) in ihrer Studie an der Gattung *Paeonia* insofern geäußert, dass sich aus einem tetraploiden Ausgangskaryotyp, der mittels Allopolyploidie entstanden ist, durch Chromosomenumbauten der Karyotyp einer anderen tetraploiden Art entwickeln kann. Dies könnte für *A. armoricana* zutreffend sein. Die Art ist zudem in einem äußerst begrenzten Areal beheimatet, wohingegen *A. multiculmis* ein größeres Verbreitungsgebiet zeigt.

STEBBINS (1966) hat festgestellt, dass die primitivsten Arten die größten Chromosomen besitzen, während die kleinsten Chromosomen in bestimmten spezialisierten annualen Arten mit reduziertem Lebenszyklus gefunden werden. Hierzu hat AVDULOV (1931) in seiner herausragenden Arbeit über die Gräser herausgefunden, dass eine Variation in der Chromosomengröße nicht mit phylogenetischer Primitivität oder aber mit Fortschritt korreliert ist, sondern nur ein Ausdruck klimatischer Anpassung darstellt. Gräser in gemäßigten Zonen haben nach STEBBINS (1966) kleine bis mittelgroße Chromosomen, wohingegen Gräser in kalten gemäßigten Regionen große Chromosomen besitzen.

Unterschiede in der Chromosomengröße sind also oft in Verbindung zu bringen mit einer Adaptation an verschiedene Umgebungen, wobei die Polyploidie die adaptive Funktion einer Stabilisierung von Genotypen darstellt, die eine Rekombination von Charakteristika der diploiden Vorfahren repräsentiert (STEBBINS 1966).

Auch wenn, wie bei der Gattung *Aira*, bei vielen nah verwandten Arten einer Gattung oder Familie gleiche Chromosomenzahlen vorliegen, bedeutet dies keineswegs Identität der vergleichbaren Chromosomen. Dies zeigt sich bei einem Karyotyp-Vergleich der untersuchten Arten mit dem Basis-Typ [A]. Oft zeichnen sich verwandte Arten durch unterschiedlich große Chromosomen aus. Es liegt daher nahe, dass man einen möglichst umfassenden Überblick über die Karyotypen vieler Arten gewinnen muss, um zu prüfen, ob es Gesetzmäßigkeiten oder Tendenzen gibt, die mit der systematischen Stellung von Arten oder übergeordneten Taxa korrelierbar sind.

Umweltparameter können ebenfalls zur Selektion variabler Chromosomenmuster, z.B. lokaler Rassen, führen. Dies haben FUKUDA & CHANELL (1975) anhand von Karyotypen verschiedener Populationen der Weißen Wachsblume (*Trillium ovatum*) im Westen Nordamerikas analysiert. In Regionen mit ausgeglichenem Klima existieren keine oder allenfalls minimale Unterschiede im Karyotyp zwischen den einzelnen, meist zusammenhängenden Populationen, während in klimatisch und geologisch vielgestaltigen Regionen in isolierten, relativ kleinen Populationen die Karyotypen variieren.

Vergleichbares kann man bei *A. praecox* feststellen, die weit bis nach Südkandinavien vordringen kann und als Anpassung an das kältere Klima eine kleinere Wuchsform mit einer zusammengezogenen Rispe sowie einen abgeleiteten Karyotyp aufweist. Die auftretende Variation der Chromosomenmuster scheint zusätzlich mit einer morphologischen Variation der isolierten Population korreliert zu sein.

DONNERMEYER (1986) hat bei *A. multiculmis* zwischen den verschiedenen Standorten z.T. deutliche morphologische Karyotypvarianten feststellen können, was als „adaptiver Chromosomen-Polymorphismus“ beschrieben werden kann. Die Tatsache, dass Individuen einer Art unterschiedliche Karyotypen aufweisen (intraspezifischer Karyotyp-Polymorphismus), deren Existenz Ausdruck eines bestimmten Anpassungszustandes der karyotypisch polymorphen Population an bestimmte Umweltbedingungen ist, zeigt Parallelen zu FUKUDA & CHANELL (1975).



Letztendlich sind Arten an Standortfaktoren in der Regel gut angepaßt, und nur in den seltensten Fällen ist ihnen ein Bastard überlegen. Meist macht sich Hybridenschwäche und nicht zu unterschätzende Fertilitätsreduktion bemerkbar, so dass die Bastarde den ursprünglichen Arten gegenüber ins Hintertreffen geraten. Vorteile können allerdings bei der Besiedelung neuer Lebensräume entstehen. Dies haben sich die Arten *A. praecox* und *A. caryophyllea* zu Nutze gemacht, auch wenn man die erst genannte nicht als Bastard bezeichnen kann. Beide Arten haben im Zuge der adaptiven Radiation neue Lebensräume erschlossen, indem sie sich an neue Bedingungen angepaßt haben.

#### 4.2.2 Verbreitung

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Gattung *Aira* innerhalb der Subtribus *Airinae* um ein phylogenetisch jüngeres Taxon, welches durch ihre Entwicklungsdynamik starken Veränderungen unterworfen ist (ALBERS 1976). Um die Evolution der Gattung und damit die Entwicklung der vier vorkommenden Karyotypen zu verstehen, muss man Kenntnisse über die Verbreitung der *Aira*-Arten erlangen. Anhand möglicher Kontaktzonen können eventuell Rückschlüsse über die Bildung der tetraploiden Arten gezogen werden.

Der Verbreitungsschwerpunkt der meisten Arten der Gattung *Aira* liegt in der Mediterraneis (Abb. 3.29 bis 3.32), mit einer deutlichen Radiation in Richtung Mitteleuropa (ALBERS 1980b). Jede diploide Art mit dem Karyotyp [A] ist auf eher begrenzte Areale beschränkt.

*A. uniaristata*, über die wenig bekannt ist und die in dieser Arbeit eine nebensächliche Rolle spielt, ist einzig durch Funde rund um die Straße von Gibraltar dokumentiert. *A. byzantina* ist nur durch Aufsammlungen in Griechenland und in der Türkei belegt, was früher dem byzantinischen Reich zugeordnet wurde und Namensgeber für diese Pflanze war. Auch *A. tenorei* und *A. elegantissima* ssp. *scoparia* sind nur durch relativ kleine Verbreitungsgebiete charakterisiert. Die größten Areale zeigen die beiden Arten *A. cupaniana*, die sehr deutlich den mediterranen Raum verläßt und auch in Spanien und Portugal anzutreffen ist, sowie *A. elegantissima* ssp. *elegantissima*, die neben dem Mittelmeerraum bis zum nördlichen Balkan vorkommen kann.

Die diploide *A. praecox* mit dem Karyotyp [B] verläßt gänzlich das mediterrane Gebiet und zeigt eine eher atlantische Ausbreitung (Abb. 3.29 und 3.31). Die Art besitzt einen abgeleiteten Karyotyp und zeigt eine bessere Anpassung an atlantische Verhältnisse mit einer

größeren Toleranz gegen sommerliche Nässe und winterliche Kälte auf Sandböden (ALBERS 1980b).

Faßt man alle diploiden Arten zusammen, dann zeigen sie insgesamt ein sehr weitreichendes Verbreitungsgebiet, welches von Portugal über den mediterranen Raum bis in die Kaukasische Region reicht.

Für die allopolyploide bzw. alloautopolyploide Bildung der tetraploiden Arten und im besonderen von *A. caryophyllea* und *A. multiculmis*, muss es zu einer Hybridisierung zwischen zwei diploiden Arten gekommen sein.

Hierfür ist die Feststellung möglicher Kontaktzonen zwischen den Arten interessant. Bei *A. caryophyllea* mit dem Karyotyp [AB] ist es zu einer Bastardierung zwischen *A. praecox*, Karyotyp [B], und einem diploiden Vertreter mit dem Karyotyp [A] gekommen. Kontaktzonen zwischen den beiden Karyotypen (Abb. 3.29) gibt es zum einen in Südfrankreich (mit *A. cupaniana* oder *A. elegantissima*) und zum anderen in Portugal (mit *A. cupaniana*). Nach Abb. 3.31 ließe sich die Kontaktzone in Südfrankreich ausschließen, da dort *A. praecox* nicht vertreten ist. Aus karyologischer Sicht ist jedoch bewiesen, dass sich *A. caryophyllea* aus der Bastardierung von *A. praecox* und *A. elegantissima* entwickelt hat, so dass man daraus den Schluß ziehen könnte, dass sich zwar die Bildung im mediterranen Raum vollzogen hat, aber dies durch heutige Funde bezüglich des Verbreitungsgebietes der Arten nicht mehr belegt werden kann.

Man muss annehmen, dass zu der Zeit ihres Ursprungs Amphidiploide zusammen mit ihren beiden Eltern-Arten vorkommen (STEBBINS 1956). Heute bekannte Fundorte spiegeln aber nur den „Jetzt – Zustand“ wider und sagen nichts darüber aus, wo die eine oder andere Art in früheren Zeiten noch vertreten gewesen sein könnte.

TATEOKA (1974) hat ähnliches über den Polyploidiekomplex von *Calamagrostis* in Japan beschrieben. Seiner Meinung nach sind Arten mit niedrigeren Valenzen von Hochpolyploiden verdrängt worden und schließlich verschwunden. Parallelen finden sich auch in der Gattung *Dactylis* (STEBBINS 1956), deren ausdauernde Vertreter in der mediterranen Region sowie in angrenzenden Teilen von Europa und Asien vorkommen. Der große Umfang der geographischen Verbreitung dieser Gattung wird durch tetraploide Arten erreicht, die in ihrer äußeren Morphologie und ökologischer Adaptation meist zwischen verschiedenen Vertretern der Diploiden liegen. Auch für diese Gattung ist bekannt, dass die diploiden Arten früher

umfangreichere Areale besetzt haben als sie es jetzt tun. Mittlerweile wäre eine solche Hybridisierung im Falle der Gattung *Dactylis* in der heutigen Zeit unmöglich, da die Gebiete der Diploiden sich nicht (mehr) überlappen (STEBBINS 1956). Dies scheint auch für die Gattung *Aira* zutreffend zu sein.

ALBERS (1980b) zufolge hat sich die amphidiploide Entstehung von *A. caryophyllea* im westlichen Mittelmeerraum vollzogen, wobei von Südwesten aus postglazial eine Besiedelung Mitteleuropas erfolgt sein muss. Die Art hat sich als optimales Syntheseprodukt erwiesen und im Hinblick auf die Verbreitung einer Allopolyploiden ist ihr Areal geradezu als klassisch zu bezeichnen, wenn man ihre Genom-Zusammensetzung [AB] berücksichtigt (ALBERS 1980b). Neben den von den diploiden Arten bevorzugten mediterranen Biotopen besiedelt *A. caryophyllea* auch Areale, die weiter nördlich bis nach Skandinavien gelegen sind und mit denen sie das milde Klima verläßt. In dieser Hinsicht stimmt sie mit der atlantischen Verbreitung von *A. praecox* überein. Sie zeigt aber auch dort oft eine relative Standortkonstanz mit einer Besiedelung auf offenen Sandböden und exponierten Hängen (ALBERS 1980b).

Anthropogene Einflüsse haben wesentlich zur Verbreitung dieser Art beigetragen, wodurch sich ihr häufiges Vorkommen an Bahndämmen und Straßenrändern erklären läßt (ALBERS 1980b). Das Heraufsetzen des Ploidiegrades hat der Pflanze vermutlich eine erhöhte Flexibilität in der Expression ihres Genoms verliehen, um auf unterschiedliche Biotopeneinflüsse mit jeweils anderen Strategien zu reagieren ([www.biologie.uni-hamburg.de/b-online](http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online)). Im Zuge der adaptiven Radiation hat *A. caryophyllea* bei der Besiedlung neuer Standorte in vielen Fällen einen Vorteil gewonnen.

Die tetraploide Art *A. multiculmis* muss als euatlantische Art einer ähnlichen Ausbreitungsrichtung wie *A. praecox* gefolgt sein, wenn man nach heutigem Kenntnisstand das Vorkommen der diploiden Ausgangssippen betrachtet. *A. multiculmis* zeigt eine größere ökologische Amplitude in Form eines weiter gefaßten Verbreitungsgebietes als ihre diploiden Ausgangsarten, wodurch es ihr möglich ist, über das mediterrane Gebiet hinaus nach Norden in Gebiete mit milden, ausgeglichenen Temperaturverhältnissen vorzustoßen (ALBERS 1980b). Gleiches gilt für die auf Südkontinent und die Bretagne beschränkte *A. armoricana*, die sich aus Ökotypen von *A. multiculmis* entwickelt haben kann.

Gerade die Familie der Poaceae zeigt einen hohen Prozentsatz an polyploiden Pflanzen. So haben die Gräser insgesamt zweimal so viele polyploide Vertreter wie der Durchschnitt der Blütenpflanzen, und nahezu alle Gattungen der Poaceae beinhalten Arten mit Chromosomenzahlen, die ein Vielfaches der Original - Basiszahl darstellen (STEBBINS 1956). Diesbezüglich hat DE WET (1971; 1980) die Feststellung gemacht, dass im allgemeinen der tetraploide Zustand der erfolgreichste bei den Höheren Pflanzen darstellt. Studien in der Gras-Evolution haben gezeigt, dass die Verdopplung der ganzen Chromosomenzahl oder die Polyploidie eine ungewöhnlich große Rolle in der Evolution der Poaceen - Familie gespielt haben muss (STEBBINS 1956).

So scheinen nach ALBERS (1980b) die Polyploiden insgesamt für die Besiedelung des nach Abschmelzen des Eises frei werdenden Neulands, d.h. in den postglazial frei gewordenen Räumen, geeigneter und daher erfolgreicher zu sein. HANELT (1966) begründet dies damit, dass Polyploide über eine stark gesteigerte Rekombinationsrate zu einer größeren genetischen Variationsbreite gelangt sind. Polyploiden wird eine bessere Fähigkeit bei der Kolonisierung neuer Gebiete zugesprochen, was dadurch erklärt wird, dass sie in weniger vorteilhaften Habitaten abgehärteter und widerstandsfähiger sind.

STEBBINS (1956) ist der Ansicht, dass die geographische Verbreitung der polyploiden Gräser darauf zurückzuführen ist, dass Polyploide besser an neue ökologische Nischen angepaßt und besser für die Übernahme des Landes nach dem Rückgang des Eises ausgerüstet worden sind als ihre diploiden Verwandten. Verallgemeinernd gesagt können sie dadurch gewöhnlich Gebiete besetzen, die geologisch neuer sind als diejenigen ihrer diploiden Vorfahren.

Dies korreliert mit einer Aussage von EHRENDORFER (1959), nach der eine weitere wesentliche Bedeutung der Polyploidie in der Aufhebung der zwischen den Diploiden bestehenden Kreuzungsbarrieren liegt. So sind Polyploide oftmals weiter ausgedehnt in ihrer Verbreitung als ihre diploiden Vorfahren, und zeigen eine Anpassung an eine größere Vielfalt von Habitaten (STEBBINS 1956).

Dies läßt sich anhand der Art *A. caryophyllea* nachvollziehen, denn auch hier ist es so, dass die Gebiete der geographischen Verbreitung der Diploiden kleiner gefaßt sind als diejenigen der Tetraploiden. Die diploiden Arten sind in weitgehend begrenzten Arealen beheimatet, was vielleicht dadurch zu erklären ist, dass sich ihr geographisches Umfeld geändert hat (STEBBINS 1956). Die tetraploide *A. caryophyllea* zeigt sich toleranter bezüglich klimatischen

Veränderungen, was sich letztendlich in ihrer schnellen und ausgedehnten Ausbreitung widerspiegelt.

### **4.3 Molekulargenetik**

Molekulare Merkmale sind bei der Betrachtung von Arten wertvoll, da man anhand des Grades an molekularen Übereinstimmungen oder Unterschieden Aussagen über die Stammesgeschichte der Organismen machen kann (SPRING & BUSCHMANN 1998).

Besonders die Nukleinsäuresequenzen bestimmter Bereiche der Chloroplasten- und Kerngenome haben sich als besonders gut geeignete Merkmale für systematische Fragestellungen erwiesen.

Der ITS-Bereich der Kern-Region ist diesbezüglich geeignet, um Aussagen zum verwandtschaftlichen Anschluß von bisher kontrovers eingeordneten Arten zu erhalten (z.B. BALDWIN *et al.* 1995; SHEN *et al.* 1998; HSIAO *et al.* 1998; HSIAO *et al.* 1999; STARR *et al.* 1999). Taxonomisch relevante Aussagen können aber auch aus dem Grad der Übereinstimmung von Basensequenzen ausgesuchter DNA-Abschnitte abgeleitet werden. Häufig wird hier das *rbcL*-Gen verwendet (PAX *et al.* 1997; PETERSEN *et al.* 2004), aber es gibt auch in der Gras-Familie Untersuchungen an dem Kern-Gen Phytochrom B (MATHEWS *et al.* 2000) oder an den *matK* Indels (HILU & ALICE 1999).

Stärker konservative DNA-Regionen erlauben diesbezüglich Entscheidungen auf der Ebene von Familien und Gattungen, weniger konservative Regionen bis hinunter zum Artniveau.

#### **4.3.1 DNA-Sequenzierung**

Die Systematik der Gattung *Aira* ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die bisherige Klassifikation beruht auf morphologisch-anatomischen und karyologischen Merkmalen, die in den beiden vorangegangenen Kapiteln besprochen wurden.

Ein Versuch zur Unterstützung der diskutierten Hypothesen zur Phylogenie der Gattung *Aira* anhand molekulargenetischer Methoden sollte mit dieser Arbeit unternommen werden.

Diese Darstellung basiert mit der *trnL-F* Region des Chloroplastengenoms und der ITS-Region des Kerngenoms auf zwei unterschiedlichen Datensätzen.

Diese sind mittels parsimonischer Methoden unter Verwendung des Programms PAUP Version 4.0b10 (SWOFFORD 2002) ausgewertet worden. Nach YANG (1996) wird für die

phylogenetische Baum-Rekonstruktion in diesem Zusammenhang am ehesten die *Maximum Parsimony*-Methode (MP) angewandt.

Von dem Chloroplasten-Genom wurde die *trnL-F* Region sequenziert, die zwischen dem *trnL* (UAA) 5'Exon und *trnF* (GAA) liegt und aus dem 3'Ende des 5'*trnL*-Exons, dem *trnL*-Intron, dem 3'*trnL*-Exon, einen „intergenic spacer“ und dem 5'Ende des *trnF*-Exons besteht (TOULOUMENIDOU 2001). Die Auswertung der *trnL-F* Region hat sich als nicht sehr informativ herausgestellt. Dies liegt z.T. daran, dass eine Amplifikation mit Hilfe der Universal-Primer nach TABERLET *et al.* (1991) bei einigen Taxa nicht möglich war, obwohl eine Erprobung der Primer im Vorfeld zu positiven Ergebnissen geführt und einen generellen Einsatz ermöglicht hat.

Wie man anhand des Alignments erkennen kann, gibt es nur eine sehr geringe Divergenz zwischen den Arten, die sich durch die geringe Anzahl an parsimony-informativen Charakteren erklären läßt. Von den 859 einbezogenen Charakteren sind nur 15 Charaktere, also 1,75 %, parsimony-informativ, d.h. dass sich mindestens zwei unterschiedliche Nukleotide in mindestens zwei Sequenzen finden.

Das dargestellte Phylogramm von einem MPT (Abb. 3.33) gibt keine sinnvolle Claden-Bildung wider, anhand derer man Rückschlüsse auf mögliche Verwandtschaftsverhältnisse ziehen kann. Es zeigt einen sehr hohen Consistency-Index (CI), woraus man schließen kann, dass das Dendrogramm durch wenige homoplatische Merkmale und einen großen Anteil an Synapomorphien gestützt wird (TOULOUMENIDOU 2001).

Insgesamt kann mit dem CI-Wert sowie dem Retention-Index (RI) eine Einschätzung der Stabilität der errechneten Phylogramme vorgenommen werden. Je mehr sich der CI dem Wert 1 nähert, um so besser passen die einzelnen Merkmale auf ein gegebenes Kladogramm (FOREY *et al.* 1992). Uninformative Charaktere (Autapomorphien und Sympleiomorphien) können den Wert beeinflussen, indem sie ihn erhöhen ohne eine Unterstützung der Gruppierung der Taxa zu liefern (FOREY *et al.* 1992). Demgegenüber gibt der Retention-Index den Anteil an Übereinstimmungen eines Dendrogrammes wider, die als Synapomorphien gedeutet werden. Ein hoher RI-Wert zeigt Änderungen an, die hauptsächlich in internen Knoten im Kladogramm vorkommen. Ein geringer RI deutet auf Änderungen hin, die auf die Äste konzentriert sind, die zu den terminalen Taxa führen (FOREY *et al.* 1992). Aufgrund des geringen Retention-Index in dem Phylogramm kann auf Veränderungen an den terminalen

Ästen (Autapomorphien) geschlossen werden, die – wenn sie einzigartig in einer Art sind – keine Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse zulassen. Damit könnte die schlechte Auflösung erklärt werden.

Die zwei verwendeten Parsimony-Methoden (ML und MP) haben innerhalb der *trnL-F* Analyse zu einer identischen Topologie der Kladogramme geführt. Dies bestätigt zwar die Zuverlässigkeit der Sequenzdaten (TOULOU MENIDOU 2001), führt aber dennoch infolge der geringen Divergenz zu keiner guten Aufteilung. Obwohl bei den höheren Pflanzen die ringförmige Chloroplasten-DNA in vielfacher Hinsicht zur molekularbiologischen Untersuchung der Pflanzenphylogenie genutzt wird, hat die Untersuchung dieser Region innerhalb der Gattung *Aira* auf dem untersuchten taxonomischen Niveau zu keinen neuen Informationen geführt.

Bei der Analyse der ITS-Region war ebenfalls nicht für alle zu untersuchenden Arten eine Amplifikation mit den verwendeten Primern nach WHITE *et al.* (1990) möglich. So fehlen in dieser Auswertung die beiden Arten *A. cupaniana* und *A. tenorei*, die im Rahmen der Suche nach den Ausgangsarten bei der tetraploiden *A. multiculmis* eine wichtige Rolle einnehmen.

Die übrigen Sequenzen der ITS 1, 5.8S und ITS 2-Region zeigen im Vergleich zu der *trnL-F* Analyse insgesamt mehr Divergenzen im Alignment, wodurch sich eine verbesserte phylogenetische Auswertung ergeben hat. Erklärbar ist dies dadurch, dass von 825 einbezogenen Charakteren 65 parsimony-informativ sind, also knapp 7,88 %. Anhand des Phylogramm (Abb. 3.36) kann man erkennen, dass sich dieses sowohl durch einen relativ hohen Consistency-Index (CI) als auch durch einen relativ hohen Retention-Index (RI) auszeichnet. Es existieren nur wenige homoplasische Merkmale (hoher CI) und die Veränderungen haben mehr an den internen Knoten als an den terminalen Enden stattgefunden (hoher RI).

Die Verwendung der beiden Methoden *Maximum Parsimony* und *Maximum Likelihood* hat in diesem Fall nicht zur gleichen Baum-Topologie geführt, was sich in einer leicht veränderten Gruppierung der Arten widerspiegelt. Die Inkongruenz der Topologien weist darauf hin, dass die Sequenzdaten nicht ganz zuverlässig sind. Die jeweils hohen Werte (Abb. 3.38 bis Abb. 3.40) auf dem die *Aira*-Gruppe von den beiden *Outgroup*-Arten abtrennenden Ast unterstützen eine Monophylie der Gattung *Aira*.

Rückschlüsse auf die Ausgangsfragen dieser Arbeit lassen die ITS-Sequenzierungen dennoch nicht zu. So kann man die – im Gegensatz zu der *trnL-F* Analyse – vermehrt vorkommenden Divergenzen vielleicht auch dadurch erklären, dass sich die ITS-Region auf unterschiedlichen Chromosomen befindet und die Kopien nicht immer uniform sind, so dass sie eine gewisse Divergenz zeigen können (TOULOU MENIDOU 2001).

Hinzu kommt, dass bei der Analyse des Alignments durch den Bearbeiter meistens eine gewisse Anzahl an Merkmalen ausgeschlossen wird, so in diesem Fall die Basenpaare <30 und >850, da sich hier oft keine saubere Sequenz finden läßt. Diesbezüglich haben aber GATSEY *et al.* (1993) bereits erwähnt, dass das Ausschließen von systematischen Daten generell durch subjektive Kriterien bestimmt wird und – wenn dies vor der phylogenetischen Rekonstruktion geschieht – als extreme Form der Charakter-Gewichtung anzusehen ist. Dieser Punkt kann sich in einer Analyse als störend herausstellen, besonders wenn als Parsimony-Bedingung alle Charaktere gleich gewichtet werden.

Die meisten Probleme bei der ITS-Sequenzierung in Pflanzen können nach BALDWIN *et al.* (1995) durch eine weitere Reinigung der genomischen DNA oder der PCR-Produkte gelöst werden, so dass auch hier noch ein Ansatzpunkt für Verbesserungen zu finden ist.

Die ITS-Ergebnisse widersprechen dennoch nicht der Zuordnung der Arten nach anderen, z.B. karyologischen Kriterien, wie man in Abb. 3.38 erkennen kann. TOULOU MENIDOU (2001) hat jedoch festgestellt, dass molekularbiologische Untersuchungen entweder keine detaillierte Resolution innerhalb der Gruppe ergeben oder die Daten nicht mit der Gruppierung nach morphologischen Merkmalen übereinstimmen können.

Obwohl für die Systematik der Höheren Pflanzen die Sequenzen der nicht-kodierenden DNA-Bereiche zwischen der 18S rDNA, 5.8S rDNA und 26S rDNA für vergleichende Studien häufig angewandt werden, ist dieser Marker insgesamt nicht für die Unterscheidung nah verwandter *Aira*-Arten geeignet. Dabei zeichnet besonders die geringe, aber relativ konstante Größe, die bei Poaceen für die ITS 1 mit 194-223 bp und für die ITS 2 mit 213-233 bp (TAKAIWA *et al.* 1985; HSIAO *et al.* 1994) angegeben wird, sowie die Universalität und hohe Kopienzahl die Verwendung dieses 18S – 5.8S – 25S rDNA-Locus für molekulare Systematik-Studien aus (SHEN *et al.* 1998).

NIXON & CARPENTER (1996) sind der Ansicht, dass die simultane Analyse von kombinierten Daten die kladistische Parsimony eher maximiert als einzelne Analysen, und zu einer besseren phylogenetischen Schlußfolgerung führt. Dies haben auch COMPTON *et al.* (1998)



beherzigt, indem sie die Phylogenie der Ranunculaceae basierend auf der Morphologie, der ITS-Region der nrDNA und der *trnL-F* Sequenzen der cpDNA als drei unabhängige Datenquellen erstellt haben. So könnte auch die kombinierte Analyse aus Daten der cpDNA und nrDNA in Kombination mit morphologischen Merkmalen bei der Gattung *Aira* zu einer besseren Resolution führen.

Da eine hohe Divergenz unter den Arten für eine frühzeitig stattgefundenene Abtrennung der Arten und demgegenüber eine schlechte interspezifische Abgrenzbarkeit voneinander eher für eine sehr junge als für eine alte etablierte Art spricht (TOULOU MENIDOU 2001), kann man in Anbetracht der sowohl in der *trnL-F* Region wie auch der ITS-Region vorkommenden relativ geringen Divergenzen daraus schließen, dass die Arten der Gattung *Aira* eine sehr nahe Verwandtschaft untereinander zeigen.

#### 4.3.2 RAPD-Analysen

Neben den Sequenzanalysen wurde im Rahmen dieser Untersuchungen auch eine RAPD (**R**andomly **A**mplified **P**olymorphic **D**NA)-Analyse durchgeführt, die – etwa zeitgleich von WILLIAMS *et al.* (1990) und WELSH & MCCLELLAND (1990) entwickelt – heute mit zu den am häufigsten angewendeten molekulargenetischen Arbeitsmethoden gehört.

Die RAPDs sind eine auf die Polymerasekettenreaktion (PCR) basierende Analysetechnik innerhalb der Molekulargenetik, mit der Unterschiede in den Genomen zweier oder mehrerer Taxa nachgewiesen werden können, unabhängig davon, ob sie zu derselben oder zu verschiedenen Arten gehören (BROWN 1996). MALAN (2002) hält die RAPD-Analysen für geeigneter, wenn es um die Untersuchung der Verwandtschaft innerhalb von Populationen einer einzelnen Art oder sehr nah verwandter Arten geht, als wenn es sich um weniger verwandte Arten handelt. Wenn man verschiedene Arten einer Gattung vergleichen will, muss man beachten, dass die RAPD-PCR nur begrenzte Sequenzinformationen liefert (LANGSDORF 1999). Dennoch liegt ein großer Vorteil der Methode darin, dass man sie anwenden kann ohne irgendein vorheriges Wissen über die zu studierenden Genome haben zu müssen (SIKORA *et al.* 1997).

Insgesamt haben die 10 ausgewählten und verwendeten Primer polymorphe und reproduzierbare Bandenmuster geliefert. Nach LANGSDORF (1999) ist in einer RAPD-Analyse nicht die Anzahl der eingesetzten Primer entscheidend, sondern nur die Ausbeute an

informativen und polymorphen Markern. Anhand der Amplifikationsprofile durch die verschiedenen Primer konnten 90 RAPD-Banden ausgewählt und als Marker herangezogen werden, die mit Hilfe der *Maximum Parsimony*-Methode phylogenetisch ausgewertet worden sind.

Der *Semistrict Consensus*-Baum (Abb. 3.42) zeigt keine allzu große Resolution. Diese wird vermutlich durch Homoplasie gehemmt, was letztlich in dem *Consensus*-Baum in Polytomie resultiert (MALAN 2002).

Demgegenüber zeigen der *50% Majority Rule Consensus*- und besonders der *JackKnife*-Baum (Abb. 3.44) eine Aufteilung in zwei Claden, von denen sich die Clade B als die interessantere herausgestellt hat. Die Gruppierung der drei Taxa von *A. cupaniana* und *A. multiculmis* liefert einen ersten möglichen Hinweis auf eine nahe Verwandtschaft zwischen beiden Arten. Ein weiterer interessanter Aspekt, der bei Betrachtung der Abb. 3.44 auffällt, ist die jeweils völlig unterschiedliche Anordnung der drei untersuchten Taxa von *A. caryophyllea*.

Das Taxon *A. caryophyllea* 40 hat sich zusammen mit den *A. cupaniana*- und *A. multiculmis*-Vertretern in der Clade B angeordnet, wodurch man eine mögliche Fehlbestimmung des Taxon aufgrund einer Verwechslung mit *A. multiculmis* vermuten könnte. Die morphologische Ähnlichkeit beider Arten wurde bereits erörtert, aber karyologisch konnte *A. caryophyllea* 40 eindeutig dem Karyotyp [AB] zugeordnet werden.

Das Taxon *A. caryophyllea* 18 ist zusammen mit den Arten *A. praecox*, *A. elegantissima* und *A. tenorei* in der Clade A zu finden, was insofern auch erwartet wurde.

Demgegenüber muss man das dritte Taxon *A. caryophyllea* 96 jedoch aufgrund seiner Position im Kladogramm ebenso wie *Deschampsia* 22 als *Outgroup* ansehen, was im einfachsten Fall durch eine völlige Fehlbestimmung dieser Art zu erklären wäre. Auch hier konnte jedoch durch die Karyologie der Karyotyp [AB] festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für diese konfuse Anordnung der drei *A. caryophyllea*-Taxa könnte mit ihrer unterschiedlichen Herkunft zusammenhängen. Nach Tabelle 2.1 stammt das Material von *A. caryophyllea* 18 aus Italien, von *A. caryophyllea* 40 aus Frankreich und jenes von *A. caryophyllea* 96 aus Deutschland.

Es ist bekannt, dass durch RAPD-Analysen Populationen differenziert werden können, die regional und ökoklimatisch voneinander getrennt sind (LANGSDORF 1999). Ein Beispiel findet sich bei LI *et al.* (1999), die anhand von RAPD-Studien an temperat und tropisch verbreiteten Grasarten der Gattung *Tripsacum* vier Cluster unterscheiden konnten. Cluster A enthält nur

Arten aus Nordamerika, Cluster B nur solche aus Südamerika, Cluster 3 beinhaltet zwei Arten aus Mexico und Cluster 4 enthält mesoamerikanische *Tripsacum*-Arten. Die RAPD-Analysen konnten jedoch nicht die beiden auf der Infloreszenz-Morphologie basierenden taxonomischen Sektionen wiedergeben.

Man kann auch bei den drei *A. multiculmis*-Taxa feststellen, dass die im Kladogramm die Subclade B<sub>2</sub> bildenden Herkünfte 13 und 14 aus Frankreich stammen, wohingegen das Taxon *A. multiculmis* 3 aus Portugal kommt. Insgesamt befinden sich aber alle drei Taxa immer noch in derselben Clade B.

Im Gegensatz dazu ordnen sich alle drei aus Frankreich stammenden Vertreter von *A. tenorei* nicht zusammen in einer Gruppe an, sondern *A. tenorei* 65 gruppiert sich mit den drei *A. elegantissima*-Vertretern in der Subclade A<sub>2</sub>. Auch hier stehen *A. elegantissima* 32 aus Frankreich und *A. elegantissima* 4 aus Italien näher beieinander, obwohl auch *A. elegantissima* 43 aus Aufsammlungen in Frankreich stammt.

Es bedarf also einer genaueren Überprüfung der Taxa von *A. caryophyllea* anhand morphologischer Merkmale, um möglicherweise eine Aufschlüsselung nach ihren beiden Subspezies zu erlangen. Die Tatsache, dass man im Rahmen der Untersuchung aber für jede Art deutlich verschiedene Bandenmuster erhalten hat, deutet darauf hin, dass es sich bei allen um gut definierte Taxa handelt.

Nach CHEN *et al.* (2000) ist das RAPD-Fingerprinting eine sehr nützliche Technik für die Auftrennung von morphologisch ähnlichen Arten, die nur wenige morphologische Unterschiede zeigen, wohingegen sie für die Bestimmung phylogenetischer Beziehungen auf dem Art-Level weniger nützlich zu sein scheint, womit sie MALAN (2002) widersprechen. Aber weitere Ergebnisse belegen, dass die RAPD-Analysen für eine effiziente Identifikation und einen erfolgreichen DNA-Fingerprinting sowohl für die Dattelpalmen-Varietäten in Saudi-Arabien (AL-KHALIFAH & ASKARI 2003) als auch für die Phylogenie der Gattungen *Citrus* (NICOLosi *et al.* 2000) oder *Cicer* (AHMAD 1999) eingesetzt werden konnten.

Die weitere Analyse anhand der RAPD-PCR konzentriert sich auf den gezielten Vergleich der beiden tetraploiden Arten *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* mit ihren jeweils vermuteten Elternarten, im Falle von *A. caryophyllea* also mit den Bandenmuster von *A. praecox* und *A. elegantissima*. Hier kann man eindeutig erkennen, dass alle drei Arten wichtige Banden

miteinander teilen, aber demgegenüber sowohl Banden bei *A. caryophyllea* zu finden sind, die sie nur mit *A. praecox* bzw. im anderen Fall nur mit *A. elegantissima* teilt. Die Ergebnisse aus der Karyologie können somit bestätigt werden.

Bei der Bildung der tetraploiden Art *A. multiculmis* über die alloautopolyploide Entwicklung kristallisiert sich neben der durch karyologische Ergebnisse als sicher anzusehenden diploiden Art *A. elegantissima* sehr stark *A. cupaniana* als zweite Elternart heraus. Bei der Betrachtung der RAPD-Amplifikationsprofile (Abb. 7.1 bis 7.10) und deren anschließender Auswertung erkennt man, dass beide Arten einige wichtige Marker teilen, die sonst bei keinem weiteren Taxon vorkommt. Die phylogenetische Analyse anhand der *Maximum Parsimony*-Methode zeigt die Zugehörigkeit beider Arten zur selben Clade, wie man in den Abbildungen 3.44 und 3.51 erkennen kann. So wird an dieser Stelle die Beteiligung von *A. cupaniana* neben *A. elegantissima* am Genom von *A. multiculmis* postuliert.

#### **4.4 Genomische *in situ*-Hybridisierung**

Für die Untersuchung der allopolyploiden Bildung von *A. caryophyllea* sowie der alloautopolyploiden Bildung von *A. multiculmis* wurde die Methodik der GISH für die Unterscheidung der Chromosomen der potentiellen Elternarten angewendet, um die Ergebnisse aus Morphologie, Karyologie und Molekulargenetik zu untermauern.

Die Technik der *In situ*-Hybridisierung wurde vor über 30 Jahren unabhängig voneinander von mehreren Wissenschaftlern entwickelt (JOHN *et al.* 1969; PARDUE & GALL 1969, 1970).

Durch dieses molekulargenetische Verfahren ist es möglich, markierte DNA- oder RNA-Sequenzen als Sonden zu verwenden und ihr Vorkommen im Genom direkt an „Ort und Stelle“ (*in situ*) auf einem Chromosom nachzuweisen (NENNO 1998).

Eine wesentliche Verbesserung der Methode bildete die Umstellung von radioaktiv markierten Sonden auf Fluorochrom-markierte Sonden (FISH). Die Genomische *in situ*-Hybridisierung stellt dabei eine Variante der FISH dar, bei der es zu einer Hybridisierung der gesamten genomischen DNA an bestimmte Zellpräparate, wie z.B. Chromosomen kommt. Die Methode findet Anwendung in der Charakterisierung von Genomen und Chromosomen in Hybrid-Polyploiden, Hybrid-Pflanzen und allopolyploiden Arten (RAINA & RANI 2001) und vereint konventionelle Cytogenetik mit DNA:DNA – *In situ*-Hybridisierungstechniken,

wodurch es möglich ist Chromatin von verschiedenen Eltern oder Vorfahren zu unterscheiden (LEITCH & BENNETT 1997).

Innerhalb der Gattung *Aira* und der zur Diskussion stehenden Entwicklung der allopolyploid entstandenen Art *A. caryophyllea* kann durch die Genomische *in situ*-Hybridisierung eindeutig der allopolyploide Ursprung aus den beiden Genomen von *A. elegantissima* mit dem Karyotyp [A] und *A. praecox* mit dem abgeleiteten Karyotyp [B] nachvollzogen werden. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass das Genom des Hybriden sich vollständig aus den Genomen der beiden genannten Elternarten zusammensetzt. Dies konnte durch den Einsatz nur einer markierten Elternart als Sonde wie auch durch den Zweifach-Nachweis mit der gleichzeitigen Verwendung der oben genannten Arten als Sonden erbracht werden (Abb. 3.52 bis 3.54). Die Vermutungen und Belege, die bereits aus den karyologischen Untersuchungen zu Tage getreten sind und im Rahmen der RAPD-Analysen bestätigt werden konnten, werden durch die GISH verifiziert.

Dabei erforderte die Genomische *in situ*-Hybridisierung eine hohe Anzahl an Metaphase-Platten, denn nur ca. 50% der Chromosomenpräparate kamen für eine Hybridisierung zum Einsatz. Für die *In situ*-Hybridisierung sind Chromosomenpräparate höchster Qualität erforderlich (LEITCH *et al.* 1994). Bei den Präparationen ist es aber nur in wenigen Fällen gelungen, das gesamte Genom mit der vollständigen Anzahl an Chromosomen von der tetraploiden Art sichtbar zu machen, was bereits PAETSCH (2000) festgestellt hat.

Im Falle der „allo“autopolyploiden Bildung der tetraploiden Art *A. multiculmis* wurde bereits diskutiert, dass aus karyologischer Sicht die diploide Art *A. elegantissima* sehr sicher am Genom beteiligt ist. Die durchgeführten Hybridisierungen haben diesbezüglich gezeigt, dass die Verwendung einer Biotin-markierten Sonde aus der DNA von *A. elegantissima* zu einer Hybridisierung mit 14 Chromosomen im Genom von *A. multiculmis* geführt hat. Die Signale waren zwar gut zu erkennen, aber da die Qualität der Metaphase-Platten zu wünschen übrig ließ, wurde dies nicht dokumentiert.

Es wurde bereits erläutert, dass aus karyologischer Sicht Ungereimtheiten über den zweiten parentalen Elternteil existieren, aber die Vermutungen sich auf *A. tenorei* oder *A. cupaniana* konzentrieren. Aufgrund der karyologischen Ergebnisse wurde *A. cupaniana* bevorzugt in Betracht gezogen und weitgehend durch die Analysen der RAPD-Bandenmuster bestätigt.

Bei FRIESEN *et al.* (1997b) konnte der gemeinsame Einsatz der RAPD- und GISH-Methode dazu verwendet werden, die parentalen Arten von einigen wichtigen Kulturarten aus der Gattung *Allium* zu identifizieren und den hybridogenen Ursprung zu verifizieren. Da keine Einigkeit über die parentalen Elternteile vorlag und verschiedene Eltern vorgeschlagen wurden, hat sich die Anwendung der GISH als besonders geeignet erwiesen (FRIESEN *et al.* 1997b).

In einer weiteren Untersuchung innerhalb der Gattung *Allium* konnten FRIESEN *et al.* (1997a) durch die gleichzeitige Verwendung der GISH- und RAPD-Analysen den hybridogenen Ursprung von *Allium altynolicum* klären. Da bei dieser Art die meisten morphologischen Charaktere genau zwischen denen ihrer potentiellen Elternarten liegen, hat sich dies auch auf molekulargenetischer Ebene im Fehlen von Sequenzvariation und damit in einer geringen genetischen Divergenz widerspiegelt. Besonders der Einsatz der GISH hat gezeigt, dass sowohl das Genom von *A. schoenoprasum* als auch das Genom von *A. ledebourianum* an demjenigen von *A. altynolicum* beteiligt ist.

In der Literatur gibt es insgesamt zahlreiche Belege für einen erfolgreichen Einsatz der GISH, die nach RAINA & RANI (2001) eine breite Anwendung findet, wenn man nah verwandte Genome in Hybrid-Pflanzen unterscheiden will. Die Entwicklung der Genomischen *in situ*-Hybridisierung hat nach LEITCH & BENNETT (1997) neue Einblicke in den Ursprung und die Evolution von polyploiden Genomen wie z.B. der allopolyploiden Art *Millium montianum* geliefert.

Relativ früh haben ANAMTHAWAT-JÓNSSON *et al.* (1990), LEITCH *et al.* (1990) sowie SCHWARZACHER *et al.* (1992) anhand dieser Methode eine Unterscheidung taxonomisch sehr nah verwandter Arten in den Gattungen *Hordeum* und *Secale* bzw. den Nachweis von Fremd-Chromatin bei *Triticum aestivum* vorgenommen. MOSCONE *et al.* (1996) und LIM *et al.* (2000) haben die GISH erfolgreich eingesetzt, um bei dem amphidiploiden Tabak (*Nicotiana tabacum*) die beiden Sub-Genome und z.T. die potentiellen Elternarten zu identifizieren.

BELLIN & STRUSS (1998) konnten anhand der GISH-Experimente die Elternarten der amphidiploiden Arten *Brassica juncea* (AABB,  $2n=36$ ) und *Brassica carinata* (BBCC,  $2n=34$ ) identifizieren. SNOWDON *et al.* (1997a, 1997b) haben die GISH für die Identifikation und Charakterisierung von parentalen Genom-Komponenten in Hybriden von Raps (*Brassica napus*) eingesetzt, und die Ergebnisse korrelieren mit denen von BELLIN & STRUSS (1998).

SHIBATA & HIZUME (2002) konnten anhand der Methode in der allodiploiden Art *Allium wakegi* das Genom von *Allium cepa* und das Genom von *Allium fistulosum* eindeutig unterscheiden.

Insofern lagen bei der Bearbeitung der Gattung *Aira* und insbesondere bei *A. multiculmis* hohe Erwartungen in dieser Methode. Leider führte der Einsatz der übrigen, als mögliche Elternarten anzusehenden diploiden Arten zu keinem Ergebnis, was an den unzureichend gequetschten Chromosomenpräparaten gelegen haben könnte.

Da die GISH eine sehr komplexe Methode darstellt, kann man vielfältige Gründe für ein Mißlingen bei einer Untersuchung anbringen. Eine ungenügende Vorbehandlung mit den Enzymlösungen reicht aus, um nur unzulänglich gespreitete Metaphase-Kerne zu erhalten, die möglicherweise nach der Hybridisierung kein Signal zeigen. Auch die richtige Enzymlösung spielt eine wichtige Rolle. In einigen Fällen (z.B. SCHWARZACHER *et al.* 1992; MOSCONE *et al.* 1996; SNOWDON *et al.* 1997; BELYAYEV & RASKINA 1998; FUCHS *et al.* 1995; FUCHS *et al.* 1998; BELYAYEV *et al.* 2001) führt die Verwendung einer Enzymlösung aus Cellulase und Pectinase zu einem entsprechenden Erfolg, in anderen Untersuchungen (z.B. FRIESEN *et al.* 1997a; FRIESEN *et al.* 1997b; SHIBATA & HIZUME 2002) wird die Zusammensetzung aus Cellulase und Pectolyase bevorzugt. Für die Gattung *Aira* kann festgestellt werden, dass die Enzymlösung für eine erfolgreiche Mazeration aus Cellulase, Pectinase und Pectolyase bestehen muss.

Bei der Markierung mit den immunogenen Molekülen Biotin und Digoxigenin, die sich mit entsprechenden Antikörper-Farbstoff-Konjugaten nachweisen lassen, können ebenso Fehler auftreten, wie bei den Bedingungen für die Denaturierung oder die Stringenz-Waschung, die von Art zu Art verschieden sein können.

Bei einem durchgeführten Einzelnachweis kann der Anteil an unmarkierter Blocking- bzw. Kompetitor-DNA zu gering gewesen sein, so dass die repetitiven Sequenzen unzureichend geblockt worden sind und zu viele unspezifische Hybridisierungen stattgefunden haben, die letztlich keine eindeutigen Signale mehr zulassen. Dies haben auch FRIESEN *et al.* (1997a) festgestellt. Eine Verstärkung von zu schwachen Fluoreszenzsignalen kann man nach PINKEL *et al.* (1986) aber durch eine Amplifikation erreichen, bei der im Falle des Biotin mit einem Anti-Avidin-Antikörper (Goat-anti-avidin~biotin), der mit Biotin konjugiert ist, inkubiert und

danach erneut mit Avidin behandelt wird, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

Es bietet sich an, für die Untersuchung der Art *A. multiculmis* anhand der GISH weitere Bedingungen auszutesten und einzelne Parameter Schritt für Schritt zu überprüfen und zu verbessern. Diesbezüglich bieten HENEGARIU *et al.* (2001) einige Vorschläge für die Herstellung von Chromosomenpräparaten an. In zahlreichen Protokollen kann man Informationen bezüglich der Chromosomen-Vorbereitungen erhalten, wobei jede Arbeitsgruppe die eine oder andere Abwandlung für die Verbesserung der jeweils zu bearbeitenden Taxa vornimmt.

Eine Abwandlung des hier angewandten Protokolls (siehe Anhang Kapitel 7.2) könnte möglicherweise zu einer verbesserten Analyse bei *A. multiculmis* führen. Aber HODKINSON *et al.* (2000) haben im Rahmen ihrer Untersuchungen zum Studium der Genom-Organisation in der Poaceen-Gattung *Miscanthus* die Feststellung gemacht, dass die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung nicht in der Lage war zwischen den verschiedenen parental Genomen, die in *Miscanthus x giganteus* vorkommen, zu unterscheiden. Dies deutet ihrer Meinung nach darauf hin, dass diese zwei parental Genome sich auf dem repetitiven DNA-Level immer noch extrem ähnlich sind. Dieser Umstand könnte auch für das Genom von *A. multiculmis* zutreffen.

Dennoch hat sich für die Gattung *Aira* die Technik der *In situ*-Hybridisierung, und hier im speziellen die Genomische *in situ*-Hybridisierung als eine aussagekräftige Methode herausgestellt. Zumindest im Falle von *A. caryophyllea* hat sich eindeutig die Möglichkeit eröffnet, DNA-Sequenzen in Form der potentiellen Elternarten in Zellkernen bzw. anhand der Chromosomen der allopolyploid entstanden Hybriden sichtbar zu machen.

Basierend auf einer zusammenfassenden Betrachtung aller Ergebnisse der verschiedenen Bereiche der Methodik kann man folgende Aussagen über die phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb der Gattung *Aira* treffen.

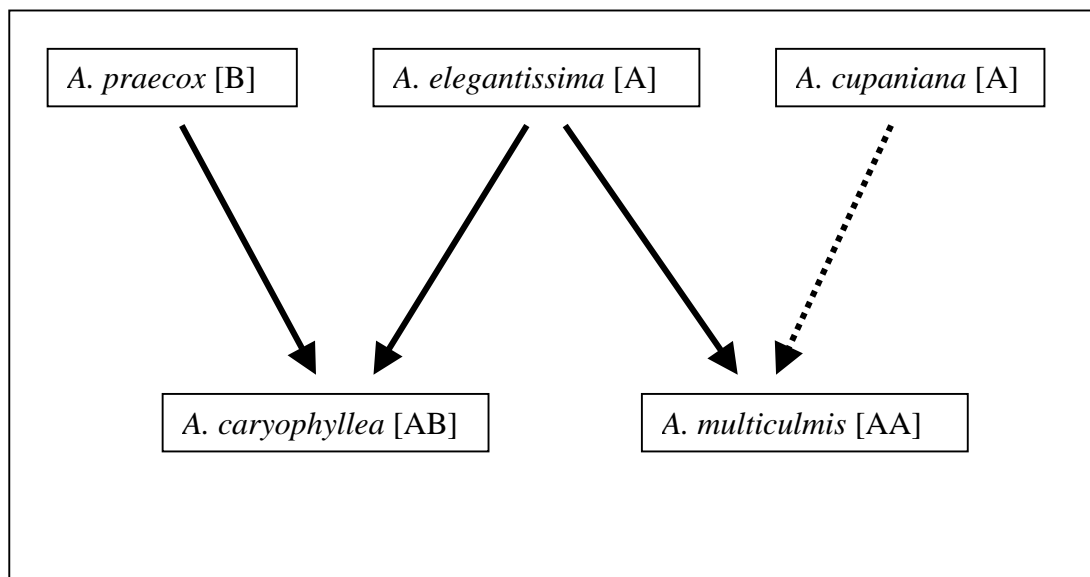
Die Morphologie läßt keine Schlüsse über die Entstehung der tetraploiden Arten *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* zu, aber im Rahmen der karyologischen Untersuchungen konnten Hinweise auf eine Beteiligung der diploiden Arten *A. elegantissima* mit dem Karyotyp [A] und *A. praecox* mit dem Karyotyp [B] an dem Genom von *A. caryophyllea* [AB] erbracht werden. Ebenso ist es sehr wahrscheinlich, dass bei *A. multiculmis* [AA] ein



verdoppelter *A. elegantissima*-Karyotyp vorliegt (ALBERS 1978b), wobei die weitere Elternart noch unbekannt bleibt. Durch die RAPD-Analysen konnte gezeigt werden, dass *A. caryophylla* sowohl mit *A. elegantissima* als auch mit *A. praecox* wichtige Marker-Banden teilt, die auf eine enge Verwandtschaft schließen lassen. Bei *A. multiculmis* hat sich neben *A. elegantissima* sehr stark *A. cupaniana* als Elternart herauskristallisiert.

Letztendlich haben die GISH-Analysen eindeutig den Nachweis für eine Beteiligung von *A. elegantissima* und *A. praecox* an dem Genom von *A. caryophylla* erbracht, wohingegen bei *A. multiculmis* bisher nur *A. elegantissima* detektiert werden konnte.

Aufgrund dieser Aussagen kann man folgendes Schema einer Hypothese zur Phylogenie präsentieren:



## 5. Zusammenfassung

Arten der Gattung *Aira* L. (Poaceae) wurden anhand morphologischer, karyologischer und molekulargenetischer Methoden sowie durch Genomische *in situ*-Hybridisierungen untersucht. Diese Studie sollte eine bessere Klassifizierung der Gattung ermöglichen und Rückschlüsse auf die parentalen Genom-Komponenten der tetraploiden Arten *A. caryophyllea* und *A. multiculmis* zulassen.

a) Die Einteilung der annualen Arten der Gattung *Aira* nach ALBERS & BUTZIN (1977) in die drei Sektionen Trichodaera, Euaera (*Aira*) und Pycnaera basierend auf der Rispenform und der Ährchenstiellänge hat bis heute Gültigkeit. Die Gattung ist durch gemeinsame morphologische Merkmale sehr stabil, die einzelnen Arten unterscheiden sich durch kleine Abweichungen voneinander. Einzig *A. praecox* ist durch ihre zusammengezogene Rispenform deutlich von allen anderen Arten der Gattung abgegrenzt, wodurch ihre Zuordnung als einzige Art zur Sektion Pycnaera gerechtfertigt ist.

Der Verbreitungsschwerpunkt der Gattung *Aira* liegt in der Mediterraneis mit einer deutlichen Radiation in Richtung Mitteleuropa. Die polyploiden Arten sind in ihrer Verbreitung weiter ausgedehnt als ihre diploiden Vorfahren, da sie durch eine erhöhte Flexibilität in der Expression ihres Genoms Vorteile bei der Besiedelung neuer Standorte haben.

b) Die Karyotypanalysen an den Arten der Gattung *Aira* haben entscheidend zum Verständnis der phylogenetischen Zusammenhänge beigetragen. Anhand der karyologischen Untersuchungen können die diploiden Arten *A. elegantissima*, *A. tenorei* und *A. cupaniana* dem symmetrischen Karyotyp [A] und die Art *A. praecox* aufgrund ihres leicht asymmetrischen Karyotyps dem Typ [B] zugeordnet werden.

Die durch Allopolyploidie entstandene tetraploide Art *A. caryophyllea* besitzt den Karyotyp [AB], der aus der Verschmelzung der beiden Genome von *A. elegantissima* und *A. praecox* hervorgegangen ist. Die Karyotypen von *A. praecox* und *A. elegantissima* erscheinen in dem Genom von *A. caryophyllea* wider. Im Zuge der neutralen Amphiplastie haben die Chromosomen der Ausgangsgenome eine Verkleinerung im Genom der tetraploiden Art erfahren.

Die ebenfalls tetraploide *A. multiculmis* könnte im Rahmen der „Allo“-autopolyploidie durch die Hybridisierung zweier Arten entstanden sein, die dem *A. elegantissima*-Typ [A] angehören und große Ähnlichkeiten in der Chromosomenmorphologie zeigen.

c) Obwohl die ringförmige Chloroplasten-DNA für systematische Zwecke von primärer Bedeutung ist, hat die Sequenzierung der *trnL-F* Region für die Arten der Gattung *Aira* einen sehr begrenzten taxonomischen Wert. Durch die geringe Divergenz im Alignment der Arten ist keine eindeutige Gruppierung möglich. Erklärbar ist dies durch viele Autapomorphien innerhalb der Gattung. Die Sequenzen der ITS-Region des Kerngenoms zeigen insgesamt mehr Divergenzen im Alignment, aber eine Inkongruenz der *MP*- und *ML*-Baumtopologien läßt Zweifel an der Zuverlässigkeit der Sequenzdaten aufkommen. Der ITS-Marker deutet jedoch auf eine Monophylie der Gattung *Aira* hin.

Die RAPD-Marker sind geeignet, um die Arten der Gattung *Aira* zu definieren. Jede Art zeichnet sich durch deutlich verschiedene Bandenmuster aus. Im Falle von *A. caryophyllea* können Hinweise auf die Beteiligung von *A. praecox* und *A. elegantissima* an ihrem Genom erbracht werden. In Bezug auf *A. multiculmis* kristallisiert sich neben *A. elegantissima* die diploide Art *A. cupaniana* anhand der RAPD-Amplifikationsprofile heraus.

d) Anhand der Genomischen *in situ*-Hybridisierung konnte bei der tetraploiden Art *A. caryophyllea* eindeutig ein Nachweis für den Ursprung aus den beiden Genomen *A. elegantissima* und *A. praecox* erbracht werden. Bei *A. multiculmis* ist die Beteiligung von *A. elegantissima* sicher, die Detektion der zweiten Elternart blieb bisher ohne Erfolg.

## 6. Literatur

AHMAD, F. (1999): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annual *Cicer* species. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 657-663.

ALBERS, F. (1973): Zwei Ausgangskaryotypen bei der Gräser-Gattung *Aira* L.. *Österr. Bot. Z.* **121**: 251-254.

ALBERS, F. (1975b): Karyotype evolution and cytogeographic distribution in the genus *Aira* L.. Intern. Bot. Kongress, Leningrad. (Abstract)

ALBERS, F. (1976): REM-Untersuchungen an Grannen der Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Gramineae – Aveneae). *Bot. Jahrb. Syst.* **97** (3): 414-424.

ALBERS, F. (1978a): Beitrag zu Taxonomie, Systematik und Evolution der Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Gramineae – Aveneae). Habilitationsschrift des Fachbereichs Mathematik-Naturwissenschaften der Christian-Albrechts-Universität in Kiel.

ALBERS, F. (1978b): Karyologische und genomatische Veränderungen innerhalb der Gräser-Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae*. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **91**: 693-697.

ALBERS, F. (1978c): Verlauf und Dauer der Mikrosporo- und Mikrogametogenesen bei Arten der Gräser-Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Aveneae). *Beitr. Biol. Pflanzen* **54**: 353-374.

ALBERS, F. (1979): Zwei neue Arten der Gattung *Aira* (Gramineae): *A. armoricana* und *A. byzantina*. *Willdenowia* **9**: 283-284.

ALBERS, F. (1980): Systematik, Variation und Entwicklungstendenzen der Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Gramineae – Aveneae). *Phyton (Austria)*, Vol. **20** (Fasc. 1-2): 95-116.

- ALBERS, F. (1980a): Vergleichende Karyologie der Gräser-Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Poaceae – Aveneae). *Pl. Syst. Evol.* **136**: 137-167.
- ALBERS, F. (1980b): Karyogeobotanik der Gräser-Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Aveneae). *Flora* **169**: 150-167.
- ALBERS, F., ALBERS, I. (1973): Diploide und tetraploide Sippen von *Aira* (Poaceae) im Massif des Maures (Provence). *Österr. Bot. Z.* **122**: 293-298.
- ALBERS, F., BUTZIN, F. (1977): Taxonomie und Nomenklatur der Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Gramineae – Aveneae). *Willdenowia* **8**: 81-84.
- AL-KHALIFA, N. S., ASKARI, E. (2003): Molecular phylogeny of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia by DNA fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* **107**: 1266-1270.
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K., SCHWARZACHER, T., LEITCH, A. R., BENNETT, M. D., HESLOP-HARRISON, J. S. (1990): Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.* **79**: 721-728.
- ASCHERSON, P., GRAEBNER, P. (1899): Synopsis der mitteleuropäischen Flora, Bd. 1 (1). Leipzig.
- AVDULOV, N. P. (1931): Karyo-systematische Untersuchungen der Familie Gramineen. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. Supplement **44**: 1-428.
- AX, P. (1988): Systematik der Biologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, J. M., WOJCIECHOWSKI, M. F., CAMPBELL, C. S., DONOGHUE, M. J. (1995): The ITS-region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **82**: 247-277.

- BAUMBERGER, H. (1970): Chromosomenzahlbestimmungen und Karyotypanalysen bei den Gattungen *Anemone*, *Hepatica* und *Pulsatilla*. *Ber. Schw. Bot. Ges.* **80**: 17-95.
- BELLIN, U., STRUSS, D. (1998): „Chromosomenpainting“ (GISH) zur Unterscheidung von *Brassica*-Genomen bei Artbastarden. *Vortrag für Pflanzenzüchtung* **42**: 93-95.
- BELYAYEV, A., RASKINA, O. (1998): Heterochromatin discrimination in *Aegilops speltoides* by simultaneous genomic *in situ* hybridization. *Chromosome Research* **6**: 559-565.
- BELYAYEV, A., RASKINA, O., NEVO, E. (2001): Evolutionary dynamics and chromosomal distribution of repetitive sequences on chromosomes of *Aegilops speltoides* revealed by genomic *in situ* hybridization. *Heredity* **86**: 738-742.
- BENTZER, B., v BOTHMER, R., ENGSTRAND, L., GUSTAFSSON, M., SNOGERUP, S. (1971): Some sources of error in the determination of arm ratios of chromosomes. *Bot. Notiser* **124**: 65-74.
- BROWN, T. A. (1996): Gentechnologie für Einsteiger. 2. Auflage, Spektrum, Akad. Verlag. Heidelberg; Berlin; Oxford.
- BUSCHMANN, A. (1948): Charakteristik und systematische Stellung von *Deschampsia setacea* (Hudson) Hackel. *Phyton* **1**: 24-41.
- BÜTTNER, P. (1999): Variabilität und Pathogenität bei *Botrytis cinerea*. Dissertation am Institut für Botanik, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- CHEN, Z., SONG, W., WARREN, A. (2000): Studies on six *Euplotes* spp. (Ciliophora: Hypotrichida) using RAPD fingerprinting, including a comparison with morphometric analyses. *Acta Protozool.* **39**: 209-216.

- CHIAPELLA, J. (2000): The *Deschampsia cespitosa* complex in central and northern Europe: a morphological analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **134**: 495-512.
- COMPTON, J. A., CULHAM, A., JURY, S. L. (1998): Reclassification of *Actaea* to include *Cimicifuga* and *Souliea* (Ranunculaceae): phylogeny inferred from morphology, nrDNA ITS, and cpDNA *trnL-F* sequence variation. *Taxon* **47**: 593-634.
- CRAWFORD, D. J., MORT, M. E., ARCHIBALD, J. K. (2005): Biosystematics, chromosomes and molecular data: melding the old and the new. *Taxon* **54**: 285-289.
- DARLINGTON, C. D. (1941): Polyploidy, crossing over and heterochromatin in *Paris*. *Ann. Bot.* **5**: 203-215.
- DE WET, J. M. J. (1971): Polyploidy and evolution in plants. *Taxon* **20**: 29-35.
- DE WET, J. M. J. (1980): Origin of polyploids. Pp. 3-15 in W. H. Lewis (editor), *Polyploidy: Biological Relevance*. Plenum, New York.
- DONNERMEYER, S. (1986): Karyotyp-Analysen an *Aira multiculmis* (Poaceae) und einigen verwandten Arten. Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe II am Institut für Botanik, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster (unveröffentlicht).
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull.* **19**: 11-15.
- EHRENDORFER, F. (1959): Zusammenhänge zwischen Sippenstrukturen, Lebensraum und Phylogenie bei Formenkreisen der Angiospermen. *Naturwiss. Rdsch.* **12**: 335-342.
- FARRIS, J. S., ALBERST, V. A., KÄLLERSJÖ, M., LIPSCOMB, D., KLUGE, A. G. (1996): Parsimony jackknifing outperforms neighbour-joining. *Cladistics* **12**: 99-124.

- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39** (4): 783-791.
- FOREY, P. L., HUMPHRIES, C. J., KITCHING, I. L., SCOTLAND, R. W., SIEBERT, D. J. WILLIAMS, D. M. (1992): Cladistics. A practical course in systematics. Clarendon Press. Oxford.
- FRIESEN, N., BORISJUK, N., MES, T. H. M., KLAAS, M., HANELT, P. (1997a): Allotetraploid origin of *Allium altynolicum* (*Alliaceae*, *Allium* sect. *Schoenoprasum*) as investigated by karyological and molecular markers. *Pl. Syst. Evol.* **206**: 317-335.
- FRIESEN, N., FRITSCH, R., BACHMANN, K. (1997b): Hybrid origin of some ornamentals of *Allium* subgenus *Melanocrommyum* verified with GISH and RAPD. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 1229-1238.
- FUCHS, J., SCHUBERT, I. (1995): Localization of seed protein genes on metaphase chromosomes of *Vicia faba* via fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Research* **3**: 94-100.
- FUCHS, J., BRANDES, A., SCHUBERT, I. (1995): Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Pl. Syst. Evol.* **196**: 227-241.
- FUCHS, J., KÜHNE, M., SCHUBERT, I. (1998): Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosoma* **107**: 272-276.
- FUKUDA, I., CHANELL, R. B. (1975): Distribution and evolutionary significance of chromosome variation in *Trillium ovatum*. *Evolution* **29**: 257-266.
- GATSEY, J., DE SALLE, R., WHEELER, W. (1993): Alignment-ambiguous nucleotide sites and the exclusion of systematic data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2** (2): 152-157.



- GOTTSCHALK, W. (1976): Die Bedeutung der Polyploidie für die Evolution der Pflanzen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- GREBENSTEIN, B., RÖSER, M., SAUER, W., HEMLEBEN, V. (1998): Molecular phylogenetic relationships in *Aveneae* (Poaceae) species and other grasses as inferred from ITS 1 and ITS 2 rDNA sequences. *Pl. Syst. Evol.* **213**: 233-250.
- HAGERUP, O. (1939): Studies on the significance of polyploidy. III *Deschampsia* and *Aira. Hereditas* **25**, 185-192.
- HALL, B.G. (2001): Phylogenetic Trees Made Easy. A How-To Manual for Molecular Biologists. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- HANELT, P. (1966): Polyploidie-Frequenz und geographische Verbreitung bei höheren Pflanzen. *Biol. Rdsch.* **4**: 183-196.
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N. A, WRIGHT, L. L. BRAY-WARD, P., WARD, D. C., VANCE, G. H. (2001): Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* **43**: 101-109.
- HENNIG, W. (1950): Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentral Verlag, Berlin.
- HENNIG, W. (1966): Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana.
- HILU, K. W., ALICE, L. A. (1999): Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae. *Am. J. Bot.* **86** (12): 1735-1741.
- HODKINSON, T. R., CHASE, M. W., TAKAHASHI, C., LEITCH, I. J., BENNETT, M. D., RENVOIZE, S. A. (2002): The use of DNA sequencing (ITS and *trnL-F*), AFLP, and fluorescent *in situ* hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *Am. J. Bot.* **89** (2): 279-286.

- HOLUB, J. (1958): Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung *Helictotrichon* Bess. – In: KLÁŠTERSKÝ, I.: Philipp Maximilian Opiz und seine Bedeutung für die Pflanzentaxonomie. 101-133. Prag.
- HSIAO, C., CHATTERTON, N. J., ASAY, K. H., JENSEN, K. B. (1994): Phylogenetic relationships of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome* **37**: 112-120.
- HSIAO, C., JACOBS, S. W. L., BARKER, N. P., CHATTERTON, N. J. (1998): A molecular phylogeny of the subfamily Arundinoideae (Poaceae) based on sequences of rDNA. *Australian Systematic Botany* **11**: 41-52.
- HSIAO, C., JACOBS, S. W. L., CHATTERTON, N. J., ASAY, K. H. (1999): A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences of nuclear ribosomal DNA (ITS). *Australian Systematic Botany* **11**: 667-688.
- HUELSENBECK, J. P., CRANDALL, K. A. (1997): Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 437-466.
- JOHN, H. A., BIRNSTIEL, M. L., JONES, K. W. (1969): RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* **223**: 582-587.
- KIHARA, H., ONO, T. (1926): Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex*-Arten. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.* **4**: 475-481.
- LANGSDORF, A. (1999): Analyse der genetischen Diversität von wildwachsenden Futterpflanzen aus der Sahelzone in Westafrika anhand von RAPD-Markern. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- LEITCH, I. J., BENNETT, M. D. (1997): Polyploidy in angiosperms. *Trends in plant science* **2** (12): 470-476.

- LEITCH, A. R., MOSGÖLLER, W., SCHWARZACHER, T., BENNETT, M. D., HESLOP-HARRISON, J. S. (1990): Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *Journal of Cell Science* **95**: 335-341.
- LEITCH, A. R., SCHWARZACHER, T., JACKSON, D., LEITCH, I. J. (1994): *In situ*-Hybridisierung. Reihe Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg · Berlin · Oxford.
- LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A. A. (1964): Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* **52**: 201-220.
- LEWITZKY, G. A. (1931): The karyotype in systematics. *Bull. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed.* **27**: 220-240.
- LI, Y. G., DEWALD, C. L., SIMS, P. L. (1999): Genetic relationships within *Tripsacum* as detected by RAPD variation. *Annals of Botany* **84**: 695-702.
- LIM, K. Y., MATYÁEK, R., LICHTENSTEIN, C. P., LEITCH, A. R. (2000): Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma* **109**: 245-258.
- LÖVE, A. (1964): The biological species concept and its evolutionary structure. *Taxon* **13**: 33-45.
- MADDISON, W. P. & MADDISON, D. R. (1992): MacClade Version 3.04. Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Sunderland, Massachusetts, USA.
- MALAN, A. F. (2002): Phylogeny of the genera *Karroochloa*, *Merxmuellera* and *Schismus* (Poaceae). PhD Thesis, Department of Plant Sciences: Genetics, University of the Free State, South Africa.

- MATHEWS, S., TSAI, R. C., KELLOGG, E. A. (2000): Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae): evidence from the nuclear gene phytochrom B. *Am. J. Bot.* **87** (1): 96-107.
- MOSCONE, E.A., MATZKE, M.A., MATZKE, A.J.M. (1996): The use of combined FISH / GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* **105**: 231-236.
- MÜHLHARDT, C. (2000): Der Experimentator: Molekularbiologie.  
2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- NAGL, W. (1976): Zellkern und Zellzyklen. Eugen-Ulmer Verlag, Stuttgart.
- NAWASHIN, M. (1928): Amphiplastie – eine neue karyologische Erscheinung.  
*Z. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre*, Suppl. II: 1148-1152.
- NENNO, M. (1998): Charakterisierung der Polytänchromosomen aus dem Embryosuspensor von *Phaseolus coccineus* L.. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- NICOLOSI, E., DENG, Z. N., GENTILE, A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., TRIBULATO, E. (2000): Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 1155-1166.
- NIXON, K. C., CARPENTER, J. M. (1996): On simultaneous analysis. *Cladistics* **12**: 221-241.
- PAETSCH, M. (2000): Etablierung und Optimierung der DNA:DNA *in situ*-Hybridisierung bei Brassicaceae am Beispiel der Gattung *Diplotaxis*. Diplomarbeit am Institut für Spezielle Botanik, Fachbereich Biologie / Chemie, Universität Osnabrück.
- PALATINI, M. (1991): Untersuchungen zur Systematik des *Aira multiculmis*-Komplexes.  
Diplomarbeit am Institut für Botanik, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster (unveröffentlicht).

- PARDUE, M. L., GALL, J. G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**: 600-604
- PARDUE, M. L., GALL, J. G. (1970): Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168**: 1356-1358.
- PAUNERO, E. (1955a): Las Aveneas espanolas. I. *An. Inst. Botan. Cavanilles* **13**: 149-229.
- PAUNERO, E. (1955b): Las Aveneas espanolas. II. *An. Inst. Botan. Cavanilles* **14**: 187-235.
- PAX, D. L., PRICE, R. A., MICHAELS, H. J. (1997): Phylogenetic position of the Hawaiian geraniums based on *rbcL* sequences. *Am. J. Bot.* **84** (1): 72-78.
- PETERSEN, G., SEBERG, O., BADEN, C. (2004): A phylogenetic analysis of the genus *Psathyrostachys* (Poaceae) based on one nuclear gene, three plastid genes, and morphology. *Pl. Syst. Evol.* **249**: 99-110.
- PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J. W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2934-2938.
- POSADA, D., CRANDALL, K. A. (1998): MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- PUNINA, E. O. (1987): Karyologische Studie bei Species der Gattung *Paeonia* (Paeoniaceae) aus dem Kaukasus. *Botanicheskij Journal* **72** (11): 1504-1514.
- RAINA, S.N., RANI, V. (2001): GISH technology in plant genome research. *Methods in Cell Science* **23**: 83-104.
- RAMSEY, J., SCHEMSKE, D. W. (1998): Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**: 467-501.

REMANE, A. (1952): Die Grundlagen des natürlichen Systems, der vergleichenden Anatomie und der Phylogenetik. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig.

RIEPEL, O. (1999): Einführung in die computerunterstützte Kladistik.  
Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.

RODRÍGUEZ, F., OLIVER, J. L., MARIN, A., MEDINA, J. R. (1990): The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 485-501.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., ROC, B.A. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

SAUER, W., HEUBL, G. R. (1984): Beiträge zur Kenntnis ausdauernder Wildhafer:  
2. Karyotypanalysen an west- und osteuropäischen sowie an alpinen Wildhaferarten der Gattung *Avenula* (Dumort.) Dumort. (Poaceae). *Phyton* **24**: 193-223.

SCHWARZACHER, T., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K., HARRISON, G. E., ISLAM, A. K. M. R., JIA, J. Z., KING, I. P., LEITCH, A. R., MILLER, T. E., READER, S. M., ROGERS, W. J., SHI, M., AND HESLOP-HARRISON, J. S. (1992): Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 778-786.

SHEN, Y., NEWBURY, H. J., FORD-LLOYD, B. V. (1998): Identification of taxa in the genus *Beta* using ITS 1 sequence informations. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 147-155.

SHIBATA, F., HIZUME, M. (2002): The identification and analysis of the sequences that allow the detection of *Allium cepa* chromosomes by GISH in the allodiploid *A. wakegi*. *Chromosoma* **111**: 184-191.

- SIKORA, S., REDŽEPOVIĆ, S., PEJIĆ, I., KOZUMPLIK, V. (1997): Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 527-531.
- SNEATH, P. H. A., SOKAL, R. (1973): Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SNOW, R. (1963): Alcoholic hydrochloric acid-carmines as a stain for chromosomes in squash preparations. *Stain Technology* **38**: 9-13.
- SNOWDON, R. J., KÖHLER, W., KÖHLER, A. (1997a): Chromosomal localization and characterization of rDNA loci in the *Brassica A* and *C* genomes. *Genome* **40**: 582-587.
- SNOWDON, R. J., KÖHLER, W., FRIEDT, W., KÖHLER, A. (1997b): Genomic in situ hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 1320-1324.
- SPIES, P. (2004): Phylogenetic relationships of the genus *Lachenalia* with other related liliaceous taxa. Dissertation for the master degree, Department of Plant Sciences: Genetics, University of the Free State, South Africa.
- SPRING, O., BUSCHMANN, H. (1998): Grundlagen und Methoden der Pflanzensystematik. Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden.
- STARR, J. R., BAYER, R. J., FORD, B. A. (1999): The phylogenetic position of *Carex* section *Phyllostachys* and its implications for phylogeny and subgeneric circumscription in *Carex* (Cyperaceae). *Am. J. Bot.* **86** (4): 563-577.
- STEBBINS, G. L. (1956): Cytogenetics and evolution of the grass family. *Am. J. Bot.* **43**: 890-905.

- STEBBINS, G.L. (1966): Chromosomal variation and evolution. *Science* Vol. **152**, Number 3728: 1463-1469.
- STEBBINS, G.L. (1971): Chromosomal evolution in higher plants. Arnold, London, UK.
- STEINERT, M. (1988): Morphologische und karyologische Untersuchungen an *Aira-* Populationen im Massif des Maures, Departement Var, Südfrankreich. Diplomarbeit am Institut für Botanik, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster (unveröffentlicht).
- SWOFFORD, D.L. (2002): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods, Version 4.0 beta 10 Version. Computer program distributed by the Laboratory of Molecular Systematics Smithsonian Institution.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., BOUVET, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Molec. Biol.* **17**: 1105-1109.
- TAKAIWA, F., OONO, K., SUGIURA, M. (1985): Nucleotide sequence of the 17S – 25S spacer region from rice rDNA. *Pl. Molec. Biol.* **4**: 355-364.
- TAMURA, K., NEI, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10** (3): 512-526.
- TATEOKA, T. (1974): Phytogeographical studies of *Calamagrostis sachalinensis* (Gramineae). II. Origin and Dispersal. *Bot. Mag. Tokyo* **87**: 149-164.
- TOULOUMENIDOU, T. (2001): Untersuchungen zur Radiation der Gattungen *Monsonia* L. und *Pelargonium* L'Hérit. (Geraniaceae) im südlichen Afrika auf der Grundlage molekularer Befunde. Dissertation am Institut für Botanik, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.



WAGENITZ, G. (1996): Wörterbuch der Botanik. Gustav Fischer Verlag, Jena.

WELSH, J., MCCLELLANE, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7218.

WETSCHING, W. (1983): Giemsa banding studies in *Dactylis glomerata*.  
*Phyton* **23**: 271-305.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J., (eds.): PCR protocols, a guide to methods and applications, pp. 315-322. Academic Press. San Diego, CA.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

WULFF, H. D. (1937): Chromosomenstudien an der schleswig-holsteinischen Angiospermen-Flora. I. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **55**: 262-269.

YANG, Z. (1996): Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Likelihood Methods. *J. Mol. Evol.* **42**: 294-307.

Internetadressen:

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/>

<http://www.ebi.ac.uk/embl>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.webdoc.sub.gwdg.de/diss/2001/Kierstein>

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	g	Gramm
°C	Grad Celsius	G	Guanin
μ	mikro / Faktor 10 <sup>-6</sup>	GISH	Genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung
?	Lambda		
A	Adenin	h	Stunde(n)
Abb.	Abbildung /-en	IR	Inverted Repeats
ACCTRAN	Accelerated Transformation	ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
BG	Botanischer Garten	ITS	Internal Transcribed Spacer
Bio.	Biotin	k	Kilo
bp	Basenpaare	kb	Kilobasen
bzw.	beziehungsweise	l	Liter
c	centi	LSC	Large Single Copy-Region
C	Cytosin	m	Milli oder Meter
ca.	circa	M	Molar
CI	Consistency-Index	max.	maximal
cp	Centromerposition	min.	Minute
cpDNA	Chloroplasten-DNA	ML	<i>Maximum Likelihood</i>
CTAB	Cationic Hexadecyl-Trimethyl Ammonium Bromid	MP	<i>Maximum Parsimony</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	MPT(s)	Most parsimonious tree(s)
d.h.	das heißt	MSUN	Herbarium Münster
Dig.	Digoxigenin	MULPARS	PAUP save only the minimal trees
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MULTREES	PAUP save multiple trees
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat	n	haploide Chromosomenzahl
etc.	et cetera	ng	Nanogramm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	nm	Nanometer
ed.	Ausgabe oder Herausgeber	Nr.	Nummer
et al.	et alii	nrDNA	Kern-DNA
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung	OT	Objektträger

---

PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	ribosomale DNA
RI	Retention-Index
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
SAT	Satellit
s.o.	siehe oben
SSC	Small Single Copy-Region
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TBR	Tree Bisection and Reconnection
TRIS	Tris-(hydromethyl)-aminomethan
tRNA	Transport-DNA
U	Unit ( $\mu\text{Mol Umsatz} / \text{min}$ )
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
V	Volt
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsprozent
x	Basischromosomenzahl
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## **7.2 Protokoll für die Genomische *in situ*-Hybridisierung**

### **7.2.1 Chromosomen-Präparation, Waschschritte u. Enzymbehandlungen**

- (1) Super Frost Objektträger gründlich unter Verwendung eines Reinigungsmittels reinigen, mit destilliertem Wasser spülen, mit Isopropanol versehen, in 96%igem Ethanol aufbewahren und vor der Verwendung im Abzug staubfrei trocknen.
- (2) Fixierte und in Ethanol aufbewahrte Wurzelspitzen für 30 min. in 0,01M Natrium-Citrat-Puffer waschen
- (3) Enzymverdau in einem Gemisch aus 2,5% Pectolyase, 2,5% Pectinase und 2,5% Cellulase in 0,01M Natrium-Citrat-Puffer für 20-30 min. bei Raumtemperatur
- (4) Enzym-Lösung mit einer Pasteurpipette abziehen
- (5) 3 x 10 min. in Natrium-Citrat-Puffer bei Raumtemperatur spülen
- (6) Keimlinge mit feiner Pinzette auf gereinigte und getrocknete Objektträger überführen, die Wurzelspitzen in einem Tropfen 45%iger Essigsäure abtrennen und kurz inkubieren lassen
- (7) abgetrennte Wurzelspitzen in 45%iger Essigsäure unter einem Deckglas ohne Erhitzen quetschen
- (8) OT mit Zange in flüssigen Stickstoff tauchen und Deckglas mit einer Rasierklinge absprengen
- (9) Präparate 10 min. in 96%igem Ethanol inkubieren
- (10) OT lufttrocknen lassen
- (11) Präparate im Phasen-Kontrast bei max. 400facher Vergrößerung auf Verwendbarkeit hin untersuchen
  - a) Mit „England-Finder“ die Position guter Zellkern-Bereiche auf dem OT bestimmen
  - b) Lage der Zellmasse auf der Rückseite der OT mit Diamant-Stift markieren
- (12) OT bis zum Gebrauch in einer Küvette mit Glycerin bei 4°C oder in einem Präparate-Kasten bei -20°C lagern
- (13) Auswahl der besten Chromosomen-Präparate und Beschriftung mit der einzusetzenden Sonden-Kombination (Bio oder Dig)
- (14) Spülen: in Glycerin gelagerte Präparate für 3x 20 min. in 2xSSC bzw. im Eisfach aufbewahrte Präparate für 10 min. in 2xSSC

- (15) RNase-Behandlung : pro OT 100 $\mu$ l ansetzen, bestehend aus 10 $\mu$ l RNase (Stammlösung 500 $\mu$ g/ml, DNase-frei), 10 $\mu$ l 2xSSC und 80 $\mu$ l Aqua dest.
  - ⇒ 95 $\mu$ l der verdünnten RNase auf jedes Präparat pipettieren
  - ⇒ OT mit einem Deckglas 24 x 60 mm bedecken
  - ⇒ 40 min. bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren
- (16) Waschen: ohne Deckglas für 3 x 5 min. sowie 1 x 20 min. in 2xSSC
- (17) Proteinase K-Behandlung: Proteinase-Puffer aus 1 $\mu$ g/ml Proteinase K in 20mM TrisHCl (pH 7,5) und 2mM CaCl<sub>2</sub>; pro OT 100 $\mu$ l Enzymlösung ansetzen
  - ⇒ 95 $\mu$ l der verdünnten Proteinase K-Enzymlösung auf Präparat tropfen
  - ⇒ mit Deckglas 24 x 60 mm bedecken
  - ⇒ 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren
- (18) Waschen: ohne Deckglas für 3 x 5 min. in 2xSSC
- (19) Paraformaldehyd: Zwischenfixierung der Chromosomenspreitungen auf dem OT in frisch angesetztem Fixativ (2g Paraformaldehyd in 50ml 2xPBS) für 10 min. bei Raumtemperatur
- (20) Waschen: ohne Deckgläser für 3 x 5min in 2xSSC
- (21) Alkoholreihe: je 5 min. in 70% , 90% und 96%igem Ethanol entwässern
- (22) Präparate an der Luft trocknen lassen, bis die DNA-Sonden vorbereitet sind

## 7.2.2 DNA-Vorbereitung

### 7.2.2.1 Blocking-DNA

- (1) Zu DNA-Proben 1ml TE-Puffer zufügen, Lösen des DNA-Pellet durch Vortex
- (2) RNase-Behandlung (RNase-Konzentration 100 $\mu$ l /ml in 2xSSC):
  - ⇒ bewirkt Abbau der störenden RNA
  - ⇒ 100 $\mu$ l RNase zugeben, damit eine Konzentration von 10 $\mu$ g / 1000 $\mu$ l vorliegt
  - ⇒ Proben bei 37°C für 30 min. inkubieren
- (3) Agarose-Gel: zur Überprüfung der erfolgreichen RNase-Behandlung
- (4) Testreihen für den Einsatz des Enzyms DNase I:

Tabelle 7.1: Pipettierschema mit der Probe *Aira cupaniana*54.

Test über unterschiedliche Mengen des Enzyms DNase I (Konzentration: 0,01mg/ml) bei gleichbleibender Einwirkzeit.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2µg oder 2000ng DNA	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
10x DNase-Reaktionspuffer	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl	3µl
H <sub>2</sub> O	21,9µl	21,8µl	21,7µl	21,6µl	21,5µl	21,4µl	21,3µl	21,2µl	21,1µl	21µl
DNase-Zugabe (0,01mg/ml)	0,1µl	0,2µl	0,3µl	0,4µl	0,5µl	0,6µl	0,7µl	0,8µl	0,9µl	1µl
Endvolumen	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl
Zeit, nachdem 1µl EDTA (0,5M) zugegeben wird 15 min. bei 65°C	1min.	1min.	1min.	1min.	1min.	1min	1 min	1 min	1min	1min

Tabelle 7.2: Pipettierschema mit der Probe *Aira praecox*1.

Test über gleichbleibende Enzymkonzentration und -menge (1µl) bei unterschiedlichen Einwirkzeiten von 1-10 min.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2µg oder 2000ng DNA	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
10x DNase-Reaktionspuffer	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
H <sub>2</sub> O	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl
DNase I-Zugabe (0,01mg/ml)	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl	1µl
Endvolumen	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl
Zeit, nachdem 1µl EDTA (0,5M) zugegeben wird 15 min. bei 65°C	1min.	2min.	3min.	4min.	5min.	6min	7min.	8min.	9min.	10min

(5) Versuchsreihen haben gezeigt, dass sowohl die kürzeste Einwirkdauer von 1 min. als auch die geringste Enzymkonzentration (0,1µl bei 0,01mg/ml) zu verwenden ist, da dies beste Fragmentierung der DNA erzielt.

### 7.2.2.2 Markierung und Überprüfung der Sonden-DNA

(1) RNase-Behandlung (RNase-Konzentration 100µl /ml in 2xSSC) der Sonden-DNA:

⇒ Proben bei 37°C für 30 min. inkubieren

(2) Agarose-Gel zur Überprüfung der RNase-Behandlung

(3) Markierung anhand der Nick-Translation mit Biotin- bzw. Digoxigenin-, „Nick Translation Mix für *in situ* Sonden“ nach folgender Standard-Markierungsreaktion:

a) 1-1,5µg Substrat-DNA in 16µl sterilem bidest. H<sub>2</sub>O mit 4µl DIG- bzw. Biotin-Nick Translation Mix mischen und kurz abzentrifugieren

b) Bei 15°C für 90 min. inkubieren

Folgende Abweichung vom Standard-Protokoll wird vorgenommen:

(4) Nach dem Inkubieren mit sterilem bidest. H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50µl auffüllen

(5) Erfolg der Markierungsreaktion vor dem Abstoppen über ein Agarose-Gel testen

⇒ 1/10 des jeweiligen Reaktionsvolumens mit Gel-Ladepuffer vermischen

⇒ 3 min. bei 95°C denaturieren

⇒ 3 min. auf Eis

⇒ Proben auf 1%igem Gel mit geeignetem Marker (0-10 000bp) überprüfen

(6) Die Reaktion wird abgestoppt, wenn die Proben eine Fragmentgröße zwischen 200-500bp erreicht haben (ansonsten weiter bei 15°C inkubieren):

⇒ 1µl EDTA (0,5M) pro 20µl Reaktionsvolumen zufügen

⇒ 10 min. bei 65°C erhitzen

(7) Ethanol-fällung zur Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide:

⇒ 2,5µl Natrium-Azetat (3M) pH 5,2

⇒ 130µl eiskaltes Ethanol (99%)

⇒ bei -20°C über Nacht im Eisfach zur Fällung kommen lassen

(8) nach Sonden-Markierung:

⇒ Proben 30 min. bei 14 000 U/min. bei 4°C zentrifugieren

⇒ Ethanol abgießen

⇒ 100-130µl 70%iges Ethanol (-20°C) zufügen

⇒ 15 min. bei 14 000 U/min. bei 4°C zentrifugieren

⇒ Ethanol abgießen und Tubes lufttrocknen lassen (wenn nötig abdecken und vor Licht schützen)

- (9) trocknes Pellet in 50µl Aqua dest. lösen, 45 min. bei 30°C schütteln  
⇒ vorliegende Konzentration: ca. 20-30ng/µl
- (10) Vorbereitung für Hybridisierung:  
⇒ 2µl Aqua dest. in 1,5ml-Tubes pipettieren  
⇒ 3µl Sonde zufügen für eine Konzentration von mind. 50ng/µl  
⇒ sollte sich später herausstellen, dass die Signale der Hybridisierung zu schwach waren, dann muss die Menge der Sonde erhöht werden
- (11) Eventuell zu markierter DNA auch Blocking-DNA im Verhältnis 1:10 zugeben, d.h. zu 50ng/µl Sonde gut 500 ng/µl Blocking-DNA
- (12) Alternativ zur Vakuumzentrifuge Proben über eine Ethanol-fällung trocknen,  
⇒ dann zusätzlich tRNA aus *E. coli* zugeben  
⇒ Ansatz aus 2µl H<sub>2</sub>O, 3µl Sonden-DNA, 1µl tRNA (10µg/µl), 44µl H<sub>2</sub>O, 2,5µl Natrium-Azetat (3M) und 130µl Ethanol (96%) herstellen  
⇒ Proben über Nacht bei -20°C fällen  
⇒ 45 min. bei 15 000 U/min und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen  
⇒ Pellet in 100µl eiskaltem Ethanol (70%) waschen  
⇒ 30 min. bei 15 000 U/min und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen  
⇒ Proben lufttrocknen lassen
- (13) Trockenes Pellet in 5µl reinem Formamid (100%ig) aufnehmen, 45 min. schütteln
- (14) 5µl DS 20 (restliche Komponenten des Hybridisierungsmix) zufügen, 30 min. schütteln
- (15) Proben kurz anzentrifugieren
- (16) 5 min. bei 95°C denaturieren, dann sofort auf Eis

### 7.2.3 *In situ*-Hybridisierung

- (1) 10µl der markierten DNA-Sonde auf entsprechendes Chromosomen-Präparat auftragen
- (2) aufgelegtes Deckglas (22 x 22 mm) außen herum mit Fixogumm abdichten, ca. 20 min. trocknen lassen  
⇒ wenn fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet wurden, diese vor Lichteinfall schützen



- (3) Proben auf den Objektträgern für 4 min. auf einen vorgeheizten Heizblock mit 80°C denaturieren. Ein vorheriger Denaturierungstest hat gezeigt, dass 4 min. die optimale Zeit darstellt.
- (4) Nach der Denaturierung Objektträger in vorgewärmte Feuchtekammer geben, so dass bei 37°C über Nacht die Hybridisierung stattfinden kann.

#### 7.2.4 Detektion

- (1) Stringenz-Waschungen der OT in 42°C warmen Wasserbad
  - 3 x 5 min. in SF 50 Puffer (Lösung A)
  - 2 x 5 min. in 2xSSC (Lösung B)
  - 1 x 5 min. in 4xSSC (pH 7,0) mit 0,05% Tween-20 (Lösung 4T)
- (2) Blockieren mit der Lösung BB (BSA, Tween-20, 4xSSC)
  - ⇒ 20-27µl der Lösung auf die Objektträger geben
  - ⇒ 30 min. bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren
- (3) OT in Puffer 4T für 1 x 5 min. bei 42°C im Wasserbad waschen
- (4) Detektion der markierten Sonden:
  - I. mit Biotin markierte Präparate** **und**
  - III. mit Biotin und Digoxigenin markierten Präparate:**
    - ⇒ Avidin~Texas Red (ATR) 1:1000 verdünnen in Lösung BB (0,1µl/100µl)
    - ⇒ Angesetzte Verdünnung auf Eis stellen und dunkel halten
    - ⇒ 90 µl der Verdünnung auf OT geben und mit Deckglas bedecken
    - ⇒ 30 min. bei 37°C in einer Feuchtekammer
- (5) Waschen in 42°C warmen Wasserbad
  - ⇒ 2 x 5min. in 4T-Puffer
  - ⇒ 1 x 5min. in TNT-Puffer zur Herabsetzung der Oberflächenspannung
- (6) Verstärkung des Signals (Biotin-Präparate) bzw. Detektion (Digoxigenin-Präparate)
  - I. mit Biotin markierte Präparate:**
    - ⇒ Goat-anti-avidin~biotin (GAAB) 1:200 verdünnen in TNB-Puffer (0,5µl/100µl)
    - ⇒ 90µl auf OT auftropfen und mit Deckglas bedecken
  - II. mit Digoxigenin markierte Präparate:**

- ⇒ Mouse-anti-digoxigenin (AD) 1:250 in TNB-Puffer verdünnen (0,4µl/100µl)
- ⇒ 90µl auf OT auftropfen und mit großem Deckglas bedecken

### **III. doppelt mit Biotin und Digoxigenin markierte Präparate:**

- ⇒ Goat-anti-avidin~biotin 1:200 und Mouse-anti-digoxigenin 1:250 (GAAB / AD) in TNB-Puffer verdünnen
- ⇒ 90µl auf OT pipettieren und mit Deckglas bedecken
- ⇒ 30 – 60 min. bei 37°C in Feuchtekammer und Wärmeschrank inkubieren

(7) Waschen in 42°C warmen Wasserbad

- ⇒ 3 x 5 min in TNT-Puffer

(8) Weitere Detektion:

#### **I. mit Biotin markierte Präparate:**

- ⇒ Wie oben inkubieren in Avidin~Texas Red (ATR) (1:1000, 0,1µl/100µl)
- ⇒ 90µl auf OT auftropfen und mit Deckglas bedecken

#### **II. mit Digoxigenin markierte Präparate:**

- ⇒ Goat-anti-mouse Alexa 488 1:200 in TNB-Puffer verdünnen (0,5µl/100µl)

#### **III. doppelt markierte Präparate:**

- ⇒ Avidin~Texas Red (ATR) (1:1000, 0,1µl/100µl) und Goat-anti-mouse Alexa 488 (1:200, 0,5µl/100µl) In TNB-Puffer verdünnen
- ⇒ für 30 min. bei 37°C in Feuchtekammer und Wärmeschrank inkubieren

(9) Waschen bei 42°C für 3 x 5 min. in TNT-Puffer, um die OT von den überschüssigen Detektionslösungen zu befreien

(10) Gegenfärben mit dem VECTASHIELD Hard-Set Mounting Medium mit DAPI

- ⇒ 7,5µl Lösung OT geben und mit Deckglas bedecken
- ⇒ Präparate bis zur Betrachtung dunkel halten

## 7.3 Alignment von Arten der Gattung *Aira*

### 7.3.1 Alignment der *trnL*-F Region

#NEXUS

BEGIN DATA;  
 DIMENSIONS NTAX=8 NCHAR=859;  
 FORMAT MISSING=. GAP=- INTERLEAVE DATATYPE=DNA ;  
 OPTIONS MSTAXA=UNCERTAIN ;

MATRIX

	10	20	30	40	50	60	
[	.	.	.	.	.	.	]
[	.	.	.	.	.	.	]
Poapratensis1	----- TCC ----- C C- AAACCC -----						[11]
Acaryophyllea18	ATTCAAAAAAGGGCAATCCTCGCAGCC- AA ATCCGTG -TTTTGAGAAAACAAG - - GGGGT						[56]
Acupaniana31	ATT -AAAWAAGGGCAATCCTCSWGCC-AWATCCGTGTTTGTAGAAAACAAG - - GGGGT						[56]
Aelegantissima2	ATT -AAAAAAGGGCAATCCT - GAGCC- -AAATCCGTG - TTTGAGAAAACAAG - - GGGGT						[53]
Aelegantissima7	ATT -AAAAAAGGGCAATCCT - GAGCC- -AAATCCGTG - TTTGAGAAAACAAG - - GGGGT						[53]
Amulticulmis3	CTSTGAGAGGGCGCRTCTCT C GAGCTSTS AGCATGTGTRTA .GTGAG TG TATCTCACGWC						[60]
Apraecox15	----- AAAGGGCAATCCT - GAGCHC-AAATCCGTG - TTTGAGAAA CAAG - -GTGGT						[48]
Aprovincialis5	GT-----AGACA----- TATGAGAAGA - AAG - -AGA- -						[23]
	← <i>TrnL</i> Gene			←   → Intergenic spacer			→
[	70	80	90	100	110	120	
[	.	.	.	.	.	.	]
Poapratensis1	-----						[11]
Acaryophyllea18	KC - TCGAACTASAATACAAAGGAAAAGGA TAGG TGCAGARACTCAATGGAA GCGGTTCTA						[115]
Acupaniana31	KKCTCCAAMTASAATACAAARGAAAAGGWTWKGCAGWGRCTCAATGGGAGCKGTTCYM						[116]
Aelegantissima2	TC - TCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGA TAGGTGC AGAGACTCAATGGAAGCT GTTCYA						[112]
Aelegantissima7	TC - TCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGA TAGGTGC AGAGACTCAATGGAAGCT GTTCTA						[112]
Amulticulmis3	ACATCGC TCTAGTATATAGW .RT ATATR T TWTGKYATAGA CTCACTGTGT GCK GTTCTM						[120]
Apraecox15	TC - TCGAACTAGAATACAAAGGAAAAGGA TAGGTGC AGAGACTCAATGGAAGCT GTTCTA						[107]
Aprovincialis5	----- GAACTAGAATAGAAAAGGAAAAGGATAGGTGC AGAGACTCAATGGAA GCT GTTCTA						[78]
	← Intergenic spacer →						
[	130	140	150	160	170	180	
[	.	.	.	.	.	.	]
Poapratensis1	-----						[11]
Acaryophyllea18	ACGAATCGAGTCAATTATC GTA GTGTTGTYAGTGGAAATTCCTTCACAAATTCGAGARACG						[175]
Acupaniana31	RCGAATCSASTC AATTA - CGYWGTGTTGTTAGTGGARTTCCTTCA - AAATTC GAGGRGAG						[174]
Aelegantissima2	ACGAATCGAGTTAATTA - CGTT GT GTTGTTAGTGGAAATTCCTTCA - AAATTCGAGAA- AG						[169]
Aelegantissima7	ACGAATCGAGTTAATTA - CGTT GT GTTGTTAGTGGAAATTCCTTCA - AAATTCGAGAA- AG						[169]
Amulticulmis3	GCGTATCGAGTSWAT -GWCTCR GTGTTGTTAGTGGAGTTCKTC - CAAATTCGAGG -GAK						[177]
Apraecox15	ACGAATCGAGTTAATTA - CGTT GT GTTGTTAGTGGAAATTCCTTCT T AAATTCGAGAA-AG						[165]
Aprovincialis5	ACGAATCGAGTTAATTA - CGTT GT GTTGTTAGTGGAAATTCCTTC - CAAATTCGAGAA -AG						[135]
	← Intergenic spacer →						
[	190	200	210	220	230	240	
[	.	.	.	.	.	.	]
Poapratensis1	-----						[11]
Acaryophyllea18	AAGGGTTTTATACATCTAATAAGCGA CATATAGATACTGTACATA GCAAA - CGATTAAT -						[233]
Acupaniana31	AAGGGTTTTATACATCYAATAAGCAC ATTATAGATACTG -WCATWGCAAWACGATTAATA						[233]
Aelegantissima2	AAGGGTTTTATACATCTAA TAAGCACAT - ATAGATACTG -ACATA GCAAA - CGATTAAT -						[225]
Aelegantissima7	AAGGGTTTTATACATCTAA TAAGCACAT - ATAGATACTG -ACATA GCAAA - CGATTAAT -						[225]
Amulticulmis3	AAGGGTTTTATACATCTAA TAARGASA - TATAGATACTG -AMATA GCAAAC DGWTATWW						[235]
Apraecox15	AAGGGTTTTATACATCTAA TAAATGCAT - ATAGATACTG -ACATA GCAAA - CGATTAAT -						[221]
Aprovincialis5	AAGGGTTTTATACATCTAA TAAGCACAT - ATAGATACTG -ACATA GCAAA - CGATTAAT -						[191]
	← Intergenic spacer →						

[	250	260	270	280	290	300]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Poapratensis1	-----TCC TTTAT TCCCT-----AACTT --- ATA					[32]	
Acaryophyllea18	CACAG -AACC TAT AT AATAA TA T AGAT TC TTTAT TCTTTTTAAAAATG AAA TTTGARRTA					[292]	
Acupaniana31	CACAGCAACC TAT ATWATAA TA T AGAWTCYTTAT TCTTTTTT AGARTG AAA TTTGAGRTA					[293]	
Aelegantissima2	CACAG -AACC TAT AT TA TAA TA T AGAT TCTTTAT TCTTTTTT AGAATG AAA TTTGAAATA					[284]	
Aelegantissima7	CACAG -AACC TAT AT TA TAA TA T AGAT TCTTTAT TCTTTTTT AGAATG AAA TTTGAAATA					[284]	
Amulticulmis3	CAMWRWAVSWWYM-TTW TAWYWTAKWTTSHTTWDTCHYTYKHM RADWGAAATKBGAATA					[294]	
Apraecox15	CACAG -AACC TAT AT TA TAA TA T AGAT TCTTTAT TCTTTT T TAGAATG AAA TTTGAAATA					[280]	
Aprovincialis5	CACAG -AACC TAT AT TA TAA TA T AGAT TCTTTAT TCTTTT T TAGAATG AAA TTTGAAATA					[250]	

← Intergenic spacer →

[	310	320	330	340	350	360]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Poapratensis1	G-----					[33]	
Acaryophyllea18	GAAATGA-----					[299]	
Acupaniana31	GGGATGRT TAT TAART AAATAAAAA ATT CAGAATTTTT TT TAGAA TTAWTGTGAAAAAAA					[353]	
Aelegantissima2	GAAATGAT TAT TAAAT AAATAAAAA ATT CAGAATTTTT TT TAGAA TTA TTGTGAATMCAT					[344]	
Aelegantissima7	GAAATGAT TAT TAAAT GAATAAAAA ATT CAGAATTTTT TT TAGAA TTA TTGTGAATCCAT					[344]	
Amulticulmis3	RMARKKAWKAWTAAAWMAATMRDWMWBWMTKWWTTTTTHKWWAKCWWT TGAHTCCA					[354]	
Apraecox15	GAAATGAT TAT TAAAT AAATAAAAA ATT CTGAATTTTT TT TA GAA TTA TTGTGAATCCAT					[340]	
Aprovincialis5	GAAATGAT TAT TAAAT AAATAAAAA ATT CAGAATTTTT TT TA GAA TTA TTGTGAATCCAT					[310]	

← Intergenic spacer →

[	370	380	390	400	410	420]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Poapratensis1	-----					[33]	
Acaryophyllea18	-----					[299]	
Acupaniana31	ACCAAWGGAATAWTTAGTAATCMAATCTTTCMATTCCAAGTTTTGAGGTCTTTAAAAAAG					[413]	
Aelegantissima2	TCCAA TGGAA TA TTTAGTAATCAAATCT TTCAATTCA AAGTTTTGAGGTCTTTAAAAAAG					[404]	
Aelegantissima7	TCCAA TGGAA TA TTTAGTAATCAAATCT TTCAATTCA AAGTTTTGAGGTCTTTAAAAAAG					[404]	
Amulticulmis3	TCCTDWYS AA TATT TAGTAATAAAATCT TTCAATTCMAARTTTTGGAGGTCTTTAAAAAAR					[414]	
Apraecox15	TCCAA TCGAA TA TTTAGTAATCAAATCT TTCAATTCA AAGTTTTGAGGTCTTTAAAAAAG					[400]	
Aprovincialis5	TCCAA TGGAA TA TTTAGTAATAAAATCT TTCAATTCA AAGTTTTGAGGTCTTTAAAAAAG					[370]	

← Intergenic spacer →

[	430	440	450	460	470	480]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Poapratensis1	-----					[33]	
Acaryophyllea18	-----					[299]	
Acupaniana31	TGGATTAATCGGACGAGGACAAAAGAGAGAGTCC -ATTCTACATGTCAATACT GACAATAA					[472]	
Aelegantissima2	TGGATTAATCGGACGAGGACAAAAGAGAGAGTCCATTCTACATGTCAATACT GACAATAA					[464]	
Aelegantissima7	TGGATTAATCGGACGAGGACAAAAGAGAGAGTCCATTCTACATGTCAATACT GACAATAA					[464]	
Amulticulmis3	TGGATTAATCGGACGAGGACAAAAGAGAGAGTCCATTCTACMTGTCAATACTGACAATAA					[474]	
Apraecox15	TGGATTAATCGGACGAGGACAAAAGAGAGAGTCCATTCTACATGTCAATACT GACAATAA					[460]	
Aprovincialis5	TGGATTAATCGGACGAGGACAAAAGAGAGAGTCCATTCTACATGTCAATACT GACAATAA					[430]	

← Intergenic spacer →

[	490	500	510	520	530	540]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Poapratensis1	-----					[33]	
Acaryophyllea18	-----					[299]	
Acupaniana31	TGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTY - GTGAGGG TTCAAGTCCC					[531]	
Aelegantissima2	TGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTCCGTKWSSG TTC AAGTCCC					[524]	
Aelegantissima7	TGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTC - GTGA . SG TTC AAGTCCC					[523]	
Amulticulmis3	TGAAATTTCTAGTAAAARGAAAATCCGTCGACTTTATAARTBS - TGAGGGTT CAAG TCCC					[533]	

Apraecox15 TGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTC - GTGAGGG TTC AAGTCCC [519]  
 Aprovincialis5 TGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGACTTTATAAGTC - GTGATVG TTC AAGTCCC [489]

← Intergenic spacer →

[ 550 560 570 580 590 600 ]

[  
 [ Poapratensis1 .....CTTTATTCCTAA - CTTATAGTATTTATCC - TCTTTTTTC [72]  
 Acaryophyllea18 ..... [299]  
 Acupaniana31 TCTATCCCC - AAACCC - TACTTTATTCCTAA - CTTATAGTATTTATCC - TCTTTTTTC [587]  
 Aelegantissima2 TCTATCCCC - AAACCC - TACTTTATTCCTAA - CTTATAGTATTTATCC - TCTTTTTTC [580]  
 Aelegantissima7 TCTATCCCC - AAACCC - TACTTTATTCCTAA - CTTATAGTATTTATCC - TCTTTTTTC [579]  
 Amulticulmis3 TCTATCCCCAMACCCC TACTTTATTCCTMAACTTATASTATTTATCMCTCTTTTTTC [593]  
 Apraecox15 TCTATCCCC - AAACCC - TACTTTATTCCTAA - CTTATAGTATTTATCC - TC - - - - - [567]  
 Aprovincialis5 TCTATCCCC - AAACCC - TACTTTATTCCTAA - CTTATAGTATTTATCC - TCTTTTTTC [545]

← Intergenic spacer →

[ 610 620 630 640 650 660 ]

[  
 [ Poapratensis1 TTTTATCAATGGGTTTAAGATTC - ATTAGCTTTTCAT - TCTACTCTTTCACAAAGGAG [130]  
 Acaryophyllea18 ..... [299]  
 Acupaniana31 TTTTATCAATGGGTTTAAGATTC - ATTATCTTTTCAT - TCTCCTCTTTCACAAAGGAG [645]  
 Aelegantissima2 TTTTATCAATGGGTTTAAGATTC - ATTATCTTTTCAT - TCTCCTCTTTCACAAAGGAG [638]  
 Aelegantissima7 TTTTATCAATGGGTTTAAGATTC - ATTATCTTTTCAT - TCTCCTCTTTCACAAAGGAG [637]  
 Amulticulmis3 TTTTATCAATGGGTTTAAGATTCATTATYCTTTTCTCA TTTCTCTTTCACAAAGGAG [653]  
 Apraecox15 ..... [567]  
 Aprovincialis5 TTTTATCAATGGGTTTAAGATTC - ATTATCTTTTCAT - TCTCCTCTTTCACAAAGGAG [603]

← Intergenic spacer →

[ 670 680 690 700 710 720 ]

[  
 [ Poapratensis1 TGCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTAGAATATA - - - - - TTCTTTTTT - - - ATT - A [181]  
 Acaryophyllea18 ..... [299]  
 Acupaniana31 TKCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTAGAATATAATATATTTCTTTTTT - - - ATT - A [701]  
 Aelegantissima2 TGCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTAGAATATAATATATTTCTTTTTT - - - ATT - A [694]  
 Aelegantissima7 TGCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTAGAATATAATATATTTCTTTTTT - - - ATT - A [693]  
 Amulticulmis3 TSCSAMGAGHACTCAATGGATCTTATCCTAGAATATAATATATTTCTTTTTTATTAGTTCA [713]  
 Apraecox15 ..... [567]  
 Aprovincialis5 TGCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTAGAATATAATATATTTCTTTTTT - - - ATT - A [659]

← Intergenic spacer →

[ 730 740 750 760 770 780 ]

[  
 [ Poapratensis1 GAGTATCGGGAAGGAACCCCGTTATTCAA - - - TCTATTTTT - - TCAGTATT - ATT - - AA [233]  
 Acaryophyllea18 ..... [299]  
 Acupaniana31 GAGTATCGGGA - GGAATCCCGATTATTCAC - - - TCTATTTTT - - - CAGTATT - ATT - - AA [751]  
 Aelegantissima2 GAGTATCGGGAAGGAATCCCGATTATTCAC - - - TCTATTTTT - - - CAGTATT - ATT - - AA [745]  
 Aelegantissima7 GAGTATCGGGAAGGAATCCCGATTATTCAC - - - TCTATTTTT - - - CAGTATT - ATT - - AA [744]  
 Amulticulmis3 GAGTATCGGGAAGSAWTCSS SATTATTTGCACCTCTATATTYGTCMAGTATTTATWTA AV [773]  
 Apraecox15 ..... [567]  
 Aprovincialis5 GAGTATCGGGAAGGAATCTCGATTATTCAC - - - TCTATTTTT - - - CAGTATT - ATT - - AA [710]

← Intergenic spacer →

```

[           790           800           810           820           830           840]
[
Poapratensis1      GTAAACC -- ATGTACAAT - GCA TAGGA - CTACTC -- CCCCGTTTTTCAA ----- ATTTA [281]
Acaryophyllea18   ----- [299]
Acupaniana31      GTAAGCC -- ATGTACAAT - GCA TAGGG - CTACCYTYCCCCATTTTCCAATTWAGAATTTA [807]
Aelegantissima2  GTAAGCC -- ATGTACAAT - GCA TAGGG - CTACCCTTCCCCATTTTCCA ATT TAGAATTT - [800]
Aelegantissima7  GTAAGCC -- ATGTACAAT - GCA TAGGG - CTACCCTTCCCCATTTTCCA ATT TAGAATTT - [799]
Amulticulmis3     GTAAGCCCAKTGTACVAWTGMWWTARGGG YTACYYTTYSCCATTTTBYAATT TAGAATTTA [833]
Apraecox15        ----- [567]
Aprovincialis5   GTAAGCC -- ATGTACAAT - GCA TAGGG - CTACCCTTCCCCATTTTCCA ATT TAGAATTTA [766]

```

←----- Intergenic spacer -----→

```

[           850           ]
[
Poapratensis1      GAATTTGAAATACTTTATT [300]
Acaryophyllea18   ----- [299]
Acupaniana31      ----- AATACTTTATT [818]
Aelegantissima2  -----TAAATACTTTATT [813]
Aelegantissima7  -----TAAATACTTTATT [812]
Amulticulmis3     GAATTTTAAATACTTTATT [852]
Apraecox15        ----- [567]
Aprovincialis5   GAATTTTAAATACTTTATT [785]

```

←----- Intergenic spacer -----→

; ENDBLOCK;

### 7.3.2 Alignment der ITS-Region

#NEXUS

```

BEGIN DATA;
DIMENSIONS NTAX=13 NCHAR=825;
FORMAT MISSING=. GAP=- INTERLEAVE DATATYPE=DNA ;
OPTIONS MSTAXA=UNCERTAIN ;

```

MATRIX

```

[           10           20           30           40           50           60]
[
Acaryophyllea18   GTCCGGTRDDGTGTTCCGGATCGCGGCGMACGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [59]
Acaryophyllea40   ----- TCCGGATCGCGGCCGACCGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [47]
Aelegantissima6  ----- GKSSSSSTKTTCGGATCSCGGCGAACGGGGCGGTTCCGCCGCCCCCGACGTCGCGA [56]
Aelegantissima7  GTCCGGTGAWGTGTTCCGGATCGCGGCGA- CGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [58]
Amulticulmis13   GTCCGGTGRAGTGTTCGGATCGCGGCGMACGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [59]
Amulticulmis3     ----- [0]
Apraecox15        -----TGTTCGGATCGCGGCCAACGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [48]
Apraecox17        GTCCGGTG AHRGTGTTCCGGATCGCGGCGAACGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [59]
Aprovincialis27  GTCCGGTRRSDTGTTCGGATCGCGGCGGACGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GATGTCGCGA [59]
Aprovincialis28  - - - CGGTKWVRTGTTCCGGATCGCGGCGA- CGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [55]
Aprovincialis5   GTCCGGTRWHGTGTTCCGGATCGCGGCGAACGGGGCGGTTCCGCCGCCCC -GACGTCGCGA [59]
Deschampsia      ----- [0]
Miscanthus        ----- [0]

```

←----- 18 S rRNA -----→

[	70	80	90	100	110	120]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Acaryophyllea18	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[119]
Acaryophyllea40	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[107]
Aelegantissima6	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[116]
Aelegantissima7	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[118]
Amulticulmis13	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[119]
Amulticulmis3	-----	-----					[0]
Apraecox15	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[108]
Apraecox17	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[119]
Aprovincialis27	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[119]
Aprovincialis28	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[115]
Aprovincialis5	GAAGTCCATTGAACCTTATCATT	TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT					[119]
Deschampsia	-----	-----					[0]
Miscanthus	-----GAAC-----	-----					[4]

← 18 S rRNA →

[	130	140	150	160	170	180]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Acaryophyllea18	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGAACGCG- TCACC						[177]
Acaryophyllea40	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGAACGCG- TCACC						[166]
Aelegantissima6	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGAACGCG- TCACC						[175]
Aelegantissima7	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGAACGCG- TCACC						[176]
Amulticulmis13	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGAACGCG- TCACC						[177]
Amulticulmis3	-----	-----					[0]
Apraecox15	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAATAGACCGAGCACGCG- TCACC						[166]
Apraecox17	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAATAGACCGAGCACGCG- TCACC						[177]
Aprovincialis27	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGCACACG- TCACC						[177]
Aprovincialis28	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGAGCACGCG- TCACC						[173]
Aprovincialis5	GAAC- TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGCGAACGCG- TCACC						[177]
Deschampsia	-----TCGTGACCCTGACCAAAACAGACCGTGCACGCG-TCATC						[38]
Miscanthus	-----TGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCCTAAACAAAACAGACCGCGAACGAGTCC- CT						[58]

18 S rRNA

← | →

ITS 1

→

[	190	200	210	220	230	240]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Acaryophyllea18	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGGGCGCAAGTCGCTCGACAACCTCCTCT						[236]
Acaryophyllea40	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGGG - CAAGTC - CTCG -CAACCTCCTCT						[222]
Aelegantissima6	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGTTGGC - CAAGTC - CTCGGCAACCTCCTTT						[232]
Aelegantissima7	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGTTGGC - CAAGTC - CTCGGCAACCTCCTTT						[233]
Amulticulmis13	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGGG - CAAGTC - CTCG -CAACCTCCTCT						[233]
Amulticulmis3	-----	-----					[0]
Apraecox15	CAACCCGCCGGCGACGGACATCGTTTTGCCGTTGGC - CAAGTC - CTCGACAACCTCCTCT						[224]
Apraecox17	CAACCCGCCGGCGACGGACATCGTTTTGCCGTTGGC - CAAGTC - CTCGACAACCTCCTCT						[235]
Aprovincialis27	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGGG - CAAGTC - CTCGGCAACCTCCTCT						[234]
Aprovincialis28	CAACCCGCCGGCGACGGACATCGTTCGCCGTTGGC - CAAGTC - CTCGACAACCTCCTCT						[231]
Aprovincialis5	CAACCTGCCGGCGACGG - CATCGTTCGTGCTCGGG - CAAGTC - CTCG -CAACCTCCTCT						[233]
Deschampsia	CAACCTGCCGGCGGTTGG - CACCGTCCATCGTTGGC - CAAGTC - CTCGACAACCTCCTCT						[95]
Miscanthus	CG - - - TGCCGCCGA - - - G CTTCG - - - - - GCTCGGCATTAGGTCCCCG - - - AGCTCCG-T						[102]

←

ITS 1

→

[	250	260	270	280	290	300]	
[	.	.	.	.	.	.	.]
Acaryophyllea18	CCTCGG - TTTGGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCCACGGSCCTTTGGCGT CAAGG AACACT						[295]
Acaryophyllea40	CCTCGG - TTTGGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCC -ACGGCCCTTTGGCGT CAAGG AACACT						[281]
Aelegantissima6	CCTCGG - TTAGGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCC -ACGGCCCTTTGGCGT CAAGGAACACT						[290]
Aelegantissima7	CCTCGG - TTAGGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCC -ACGGCCCTTTGGCGT CAAGGAACACT						[291]
Amulticulmis13	CCTCGG - TTTGGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCC - ACGGSCCTTTGGCGT CAAGGAACACT						[291]
Amulticulmis3	-----ACAC-						[4]
Apraecox15	CCTCGGATT - GGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCCAC - GACCCTTTGGCGTCAAGGAACACT						[282]
Apraecox17	CCTCGGATT - GGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCC . CGACCCTTTGGCGTCAAGGAACACT						[294]
Aprovincialis27	CCTCGGATT - GGGGGCTCGGGGTAAGAAGAACCC - ACGGCCCTTTGGCGTCAAGGAACACT						[292]

Aprovincialis28	CCTCGGATT - GGGGGATCGTGGTAAAAGAACCAC - GGCCCTTTGGCGTCAAGGAACACT	[289]
Aprovincialis5	CCTCGG - TTTGGGGGCTCGGGGTAAAAGAACCC - ACGGCCCTTTGGCGTCAAGGAACACT	[291]
Deschampsia	TCTCGGAGT - GGGGGCTCGGGGTAAAAGAACCACGGCGCCTAAGGCGTCAAGGAACACT	[154]
Miscanthus	CCCCGGGCRGAGGGGCC - - - -ACAACAGAACCACGGCGCCTTAGGCGT CAAGGAACACT	[158]

← ITS 1 →

[	310      320      330      340      350      360]	
[		.]
Acaryophyllea18	G - - - - TGCCTTACCTGGTGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTTCCCAT GTTGAATGCTA	[351]
Acaryophyllea40	G - - - - TGCCTAACCTGGTGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTTCCCAT GTTGAATGCTA	[337]
Aelegantissima6	G - - - - TGCCTAACCCGGGGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTCCCGTGTGCAATGCTA	[346]
Aelegantissima7	G - - - - TGCCTAACCCGGGGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTCCCGTGTGCAATGCTA	[347]
Amulticulmis13	G - - - - TGCCTAACCTGGTGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTTCCCAT GTTGAATGCTA	[347]
Amulticulmis3	-----	[4]
Apraecox15	G - - - - TGCCTAACCTCGGGGACGCGGTTGGCTTGCTGGCCGTTCCCGT GTTGAATGCTA	[338]
Apraecox17	G - - - - TGCCTAACCTCGGGGACGCGGTTGGCTTGCTGGCCGTTCCCGT GTTGAATGCTA	[350]
Aprovincialis27	G - - - - TGCCTAACACGGGGATGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTT - CCCGTGTTGCAATGCTA	[347]
Aprovincialis28	G - - - - TGCCTAACCTCGGGGACGCGGTTGGCTTGCTGGCCGTTCCCGT GTTGAATGCTA	[345]
Aprovincialis5	G - - - - TGCCTAACCTGGTGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTTCCCAT GTTGC AATGCTA	[347]
Deschampsia	G - - - - TGCCTAACCTCGGGGACGCGGCTGGCTTGCTGGCCGTTCCCGTGTGCAATGCTA	[210]
Miscanthus	TATATTGCCTTG CTCGGCGGGCGGTTGGCTGCCTTCCGCTCCCGCGCAGCGATGATA	[218]

← ITS 1 →

[	370      380      390      400      410      420]	
[		.]
Acaryophyllea18	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG- ATGAAGAACGT	[409]
Acaryophyllea40	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCG -CTCTCGCATCG -ATGAAGAACGT	[394]
Aelegantissima6	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG -ATGAAGAACGT	[404]
Aelegantissima7	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG- TCTCGCATCG -ATGAAGAACGT	[404]
Amulticulmis13	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG- TCTCGCATCG- ATGAAGAACGT	[404]
Amulticulmis3	----- CTACACGWC -----	[13]
Apraecox15	T- TTAATCCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG- TCTCGWTCG- ATGAAGAACGT	[395]
Apraecox17	T- TTAATCCACATRACTCTCGGCAACGGATATCTCGG- TCTCGCATCG - ATGAAGAACGT	[407]
Aprovincialis27	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG- ATGAAGAACGT	[405]
Aprovincialis28	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATYGCATGAAGAACGT	[404]
Aprovincialis5	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG- ATGAAGAACGT	[405]
Deschampsia	T- TTAATCCACACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG- ATGAAGAACGT	[268]
Miscanthus	TCTTAATCCACATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG- ATGAAGAACGT	[277]

← 5.8S rRNA →

[	430      440      450      460      470      480]	
[		.]
Acaryophyllea18	AGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[468]
Acaryophyllea40	AGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[453]
Aelegantissima6	AGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[463]
Aelegantissima7	ARC meta ATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[463]
Amulticulmis13	ASCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[463]
Amulticulmis3	-----	[13]
Apraecox15	ARC meta ATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[454]
Apraecox17	AGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[466]
Aprovincialis27	WCG meta ATGCGATACCTGGTGTGAAT -TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[464]
Aprovincialis28	RRC meta ATGCGATACCTGGTGTGAATGTGCAGAA TCC -GCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[463]
Aprovincialis5	AGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[464]
Deschampsia	AGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAAC	[327]
Miscanthus	AG meta ATGCGATACCTGGTGTGAAT - TGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTTTTGAAC	[336]

→ 5.8S rRNA ← ITS 2 →



[	490	500	510	520	530	540]	
[	.	.	.	.	.	.	]
Acaryophyllea18	GCAAGTTGCGCCCGAG	-GCCTCTCGGCCGAGG-	GACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCBAAA			[525]
Acaryophyllea40	GCAAGTTGCGCCCGAGCGCCTCTCGGCCGAGG-	SACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA				[511]
Aelegantissima6	GCAAGTTGCGCCCGAGCGCCTCTCGGCCGAGG-	CACGCC-	TGCCTGGGCGTCACGC	-AAA			[520]
Aelegantissima7	GCAAGTTGCGCCCGAG	-GCCTCTCGGCCGAGG-	SACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA			[520]
Amulticulmis13	GCAAGTTGCGCCCGAG	-GCCTCTCGGCCGAGG-	SACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA			[520]
Amulticulmis3	-----GCCTCTCGAC	-----	ACTRGGACG	-----			[32]
Apraecox15	GCAAGTTGCGCCCGAS	-GCCTCTCGGCCGAGGS-	ACGCCATGCCTGGGCGTCACGCCAAA				[512]
Apraecox17	GCAAGTTGCGCCCGAG	-GCCTCTCGGCCGAGGG-	ACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA			[523]
Aprovincialis27	GCAAGTAKCGCCCGAGT-	CCTCT	-GKCCGAGT-	TACGCC	-TGCCTGKKCGTCACGCCAAA		[520]
Aprovincialis28	GCMAGTTGCGCCCGAG-	GCCTCTCGGCCGAGGGCACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA				[521]
Aprovincialis5	GCAAGTTGCGCCCGAS	-GCCTCTCGGCCGAGG	-SACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA			[521]
Deschampsia	GCAAGTTGCGCCCGAG	-GCCATTCGGCCGAGGGCACGCC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA				[385]
Miscanthus	GCAAGTTGCGCCCGAG	-GCCTCTCGGCCGAGGGCACGTC	-TGCCTGGGCGTCACGCCAAA				[394]



ITS 2



[	550	560	570	580	590	600]	
[	.	.	.	.	.	.	]
Acaryophyllea18	C-ACGCTCCCACCCC-	TCATCGGGGTGCGCGACGSG-	CATGTGGCTCTCCGTC	ACGTAA			[582]
Acaryophyllea40	C-ACGCTCCCACCCCT-	TCATCGGGGTGCGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTC	ACGTAA				[568]
Aelegantissima6	C-ACGCTCCCACCC-	C-TCATCGGGGTGCGCGACGC-	-----				[553]
Aelegantissima7	C-ACGCTCCCACCCC-	TCATCGGGGTGCGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTC	ACGTAA				[577]
Amulticulmis13	C-ACGCTCCCACCCCT-	TCATCGGGGTGCGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTC	ACGTAA				[577]
Amulticulmis3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[38]
Apraecox15	C-ACGCTCCCACCCCCTCATCGGGGAGTGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTCACGCCAA						[571]
Apraecox17	C-ACGCTCCCACCCCCTCATCGGGGAGTGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTCACGCCAA						[582]
Aprovincialis27	C-ACGCTCCCACCTCCC-	TCATCGKKKTTCGACGSGGCATGTGKCTCTCCGTC	ACGTAA				[578]
Aprovincialis28	C-ACGCTCACACCCCCTCATCGGGGAGTGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTCACGCCAA						[580]
Aprovincialis5	C-ACGCTCCCACCCCT-	TCATCGGGGTGCGCGACGCGGCATGTGGCTCTCCGTC	ACGTAA				[578]
Deschampsia	C-ACGCTCCCACCC-	CCTCATCGGGGATCGGGATGCGGCATGTGGCCCTGTC	ACGCCAA				[443]
Miscanthus	AGACACTCCAACCCACCCA	-AGGTGGAGGGACGTGGTGTGGCCCCCGCGCCGAG					[452]



ITS 2



[	610	620	630	640	650	660]	
[	.	.	.	.	.	.	]
Acaryophyllea18	GGGGCGAGGGCCGAAGATTTCGGCTGCCGGCGTACCGTGCCGGACACAGCGCGTGGTGGG						[642]
Acaryophyllea40	GGGGCGAGGGCCGAAGATTTCGGCTGCCGGCGTATCGTGTCCGGACACAGCGCGTGGTGGG						[628]
Aelegantissima6	-----						[553]
Aelegantissima7	GGGGCGAGGGCCGAAGATTTGGCTGCCGGTGTATCGTGCCGGACACAGCGCGTGGTGGG						[637]
Amulticulmis13	GGGGCGAGGGCCGAAGATTTCGGCTGCCGGCGTATCGTGTCCGGACACAGCGCGTGGTGGG						[637]
Amulticulmis3	-----	TCG	G	-----	AGAGAGTGATAGA		[56]
Apraecox15	-GTGCGGAGGGCCGAAGATTTCGGCTGGCGGCTTATCGTGCCGG	ACACAGCGCGTGGTGGG					[630]
Apraecox17	-GTGCGGAGGGCCGAAGATTTCGGCTGGCGGCTTATCGTGCCGG	ACACAGCGCGTGGTGGG					[641]
Aprovincialis27	GKKKCGKAGKKCCGAAGATTTCGKCTKCKKCGTATCGTKCCGKACACAGCGCGTKGKGG						[638]
Aprovincialis28	-GTGCGGAGGGCCGAAGATTTGGCTGCCGGTATCGT	GCCGG	ACACAGCGAGTGGTGGG				[639]
Aprovincialis5	GGGGCGAGGGCCGAAGATTTCGGCTGCCGGCGTATCGTGTCCGGACACAGCGCGTGGTGGG						[638]
Deschampsia	GCGACGGTGGGCCGAAGATGTGGCTGCCGGTGTTCGT	GCCGGACACAGCGCGTGGTGGG					[503]
Miscanthus	GGCATGGTGGGCCGAAGTTGGGCTGCCGGCAATCGTGTCCGGACACAGCACGTGGTGGG						[512]



ITS 2



[	670	680	690	700	710	720]	
[	.	.	.	.	.	.	]
Acaryophyllea18	CGA-ACTCGCTT-	TACTTACCGCAGTGCCTCCGACATGTAGCCGGCGTCATGGCCACGAA					[700]
Acaryophyllea40	CGA-ACTCGCTT-	TACTTACCGCAGTGCCTTCGACATGTAGCCGGCGGATTGGCCACGAA					[686]
Aelegantissima6	-----						[553]
Aelegantissima7	CGA-ACTCGCTT-	TACTTACCGCAGTGTCTCCGACATGTAGCCGACGTAACGGCCATGAA					[695]
Amulticulmis13	CGA-ACTCGCTT-	TACTTACCGCAGTGCCTTCGACATGTAGCCGGCGGATTGGCCACGAA					[695]
Amulticulmis3	-----						[56]

Apraecox15	CGA -ACTCGCTT - TACTTACCGCAGTGCCTTCGGTATGTAGCTGCTATTAC GGCCTTGAA	[688]
Apraecox17	CGA -ACTCGCTT - TACTTACCGCAGTGCCTTCGGTATGTAGCTGCTATTAC GGCCTTGAA	[699]
Aprovincialis27	CGA -ACTCGCTT - TACTTACCGCAGTGCCTCCGGCATGTAGCCGACGTCACGKCCGCGAA	[696]
Aprovincialis28	CGA -ACTCGCTT - TACTTACCGCAGTGCCTCCGGCATGTACCTGGCATGACGGCCTTGAA	[697]
Aprovincialis5	CGA -ACTCGCTT - TACTTACCGCAGTGCCTTCGACATGTAGCCGGCGGATTGGCCACGAA	[696]
Deschampsia	CGA -TCTCGCTT - AACTTACCGCAGTGCATTCCGGCGGTAGCCGACGTGATGGCCCAA	[561]
Miscanthus	CGA CACTCAGTTGTTCTCGGTGCAGTGCC -CCGGCAATCGGCCGGCGCATCGGCCCTAAG	[571]

← ITS 2 →

[	730	740	750	760	770	780]	
[							
Acaryophyllea18	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[758]					
Acaryophyllea40	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[744]					
Aelegantissima6	-----	[553]					
Aelegantissima7	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[753]					
Amulticulmis13	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[753]					
Amulticulmis3	----- GTGTAA -----	[62]					
Apraecox15	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[746]					
Apraecox17	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[757]					
Aprovincialis27	TKACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGKCGGGACTA	[754]					
Aprovincialis28	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[755]					
Aprovincialis5	TGACCCTATG -- AACGGAGCGCACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTA	[754]					
Deschampsia	CGACCCTATATAAACGGAGCGCACGACGCTCCGACC -----	[597]					
Miscanthus	- GACCCT ----- TGGAGC ----- ACCGCAGCGC --- ATCG -----	[597]					

← ITS 2 →

[	790	800	810	820 ]	
[					
Acaryophyllea18	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[803]			
Acaryophyllea40	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[789]			
Aelegantissima6	-----	[553]			
Aelegantissima7	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[798]			
Amulticulmis13	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[798]			
Amulticulmis3	-----	[62]			
Apraecox15	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[791]			
Apraecox17	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[802]			
Aprovincialis27	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[799]			
Aprovincialis28	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[800]			
Aprovincialis5	CCCGCTGAGTTTAAGCATATAAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTA	[799]			
Deschampsia	-----	[597]			
Miscanthus	- CCGCT ----- CGGA ----- CCG-	[609]			

← ITS 2 →

| → 26S rRNA

; ENDBLOCK;

## 7.4 RAPD-Analysen

### 7.4.1 Amplifikationsprofile

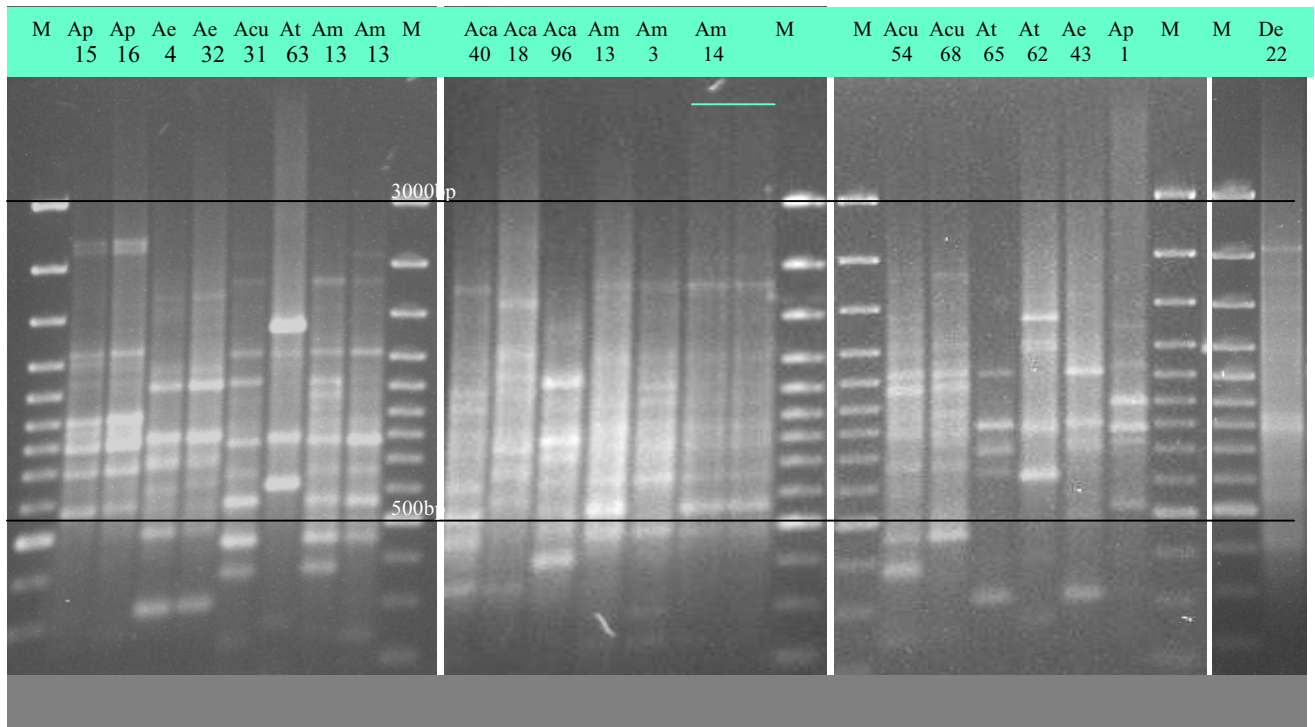


Abb. 7.1: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y02 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

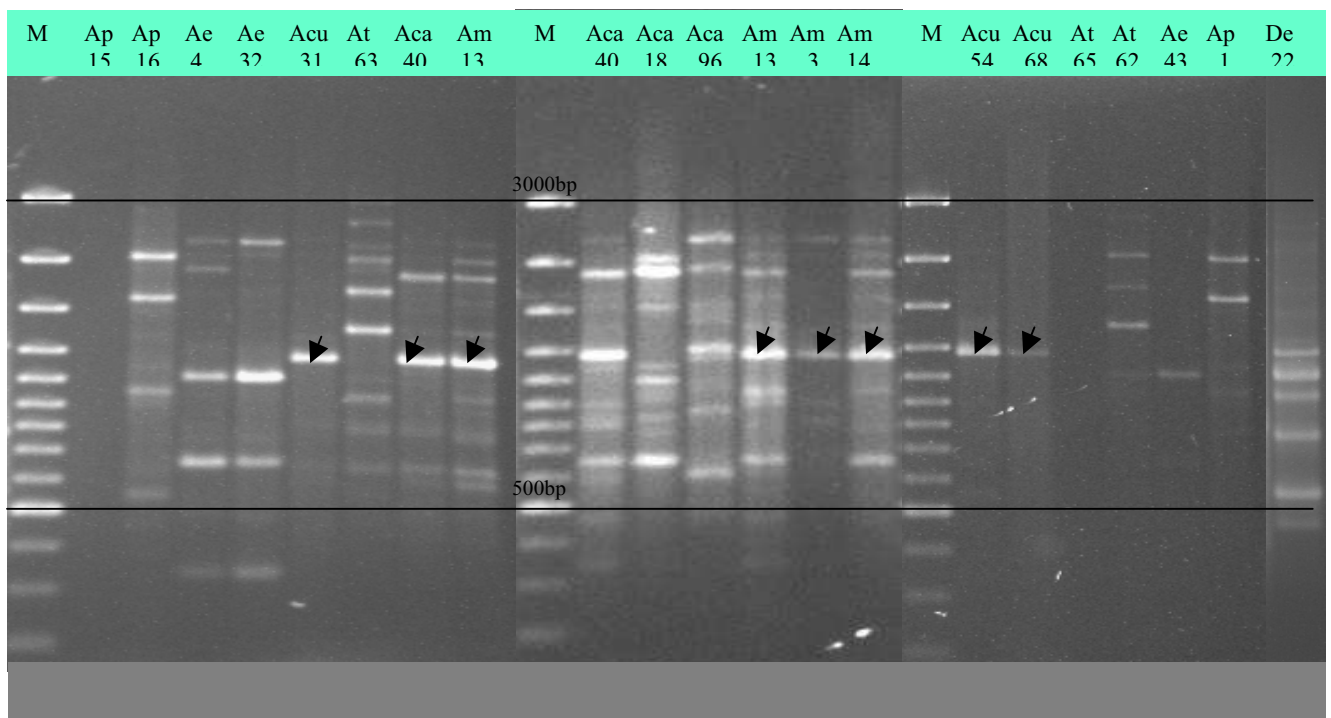


Abb. 7.2: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y03 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

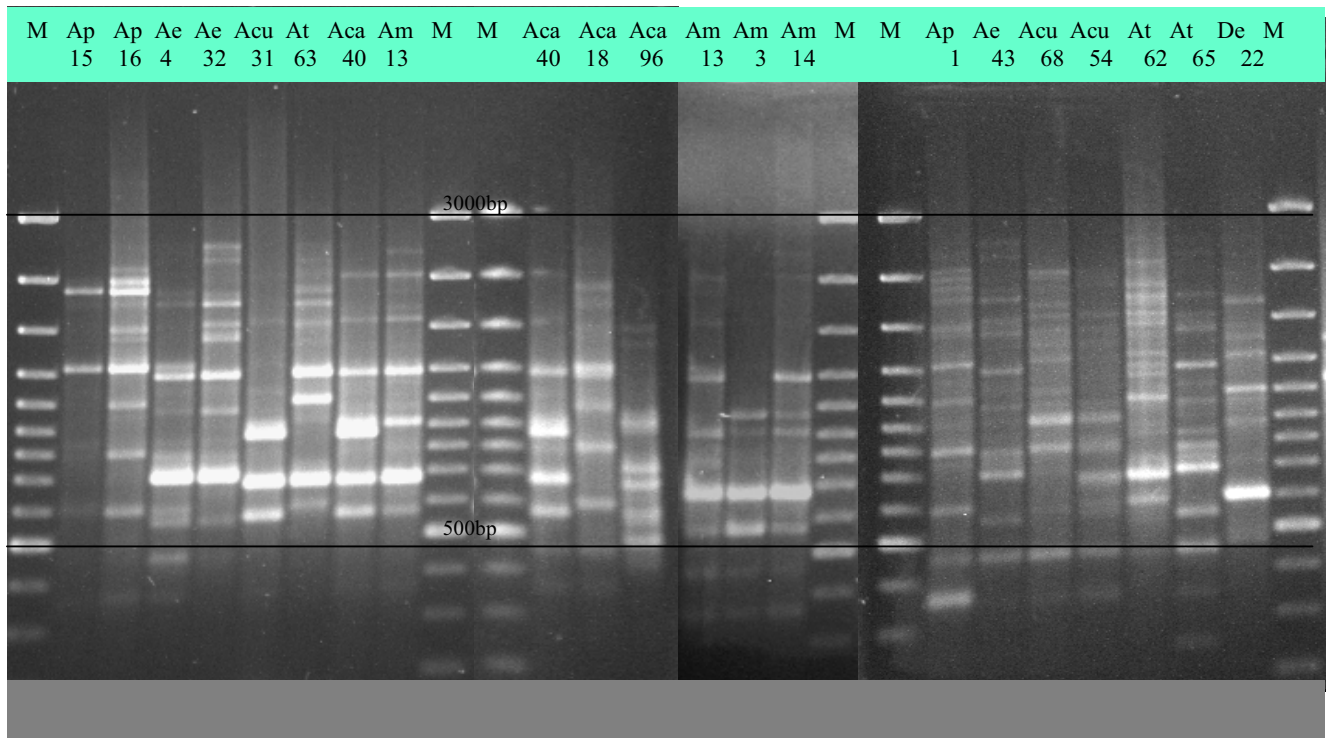


Abb. 7.3: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y04 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

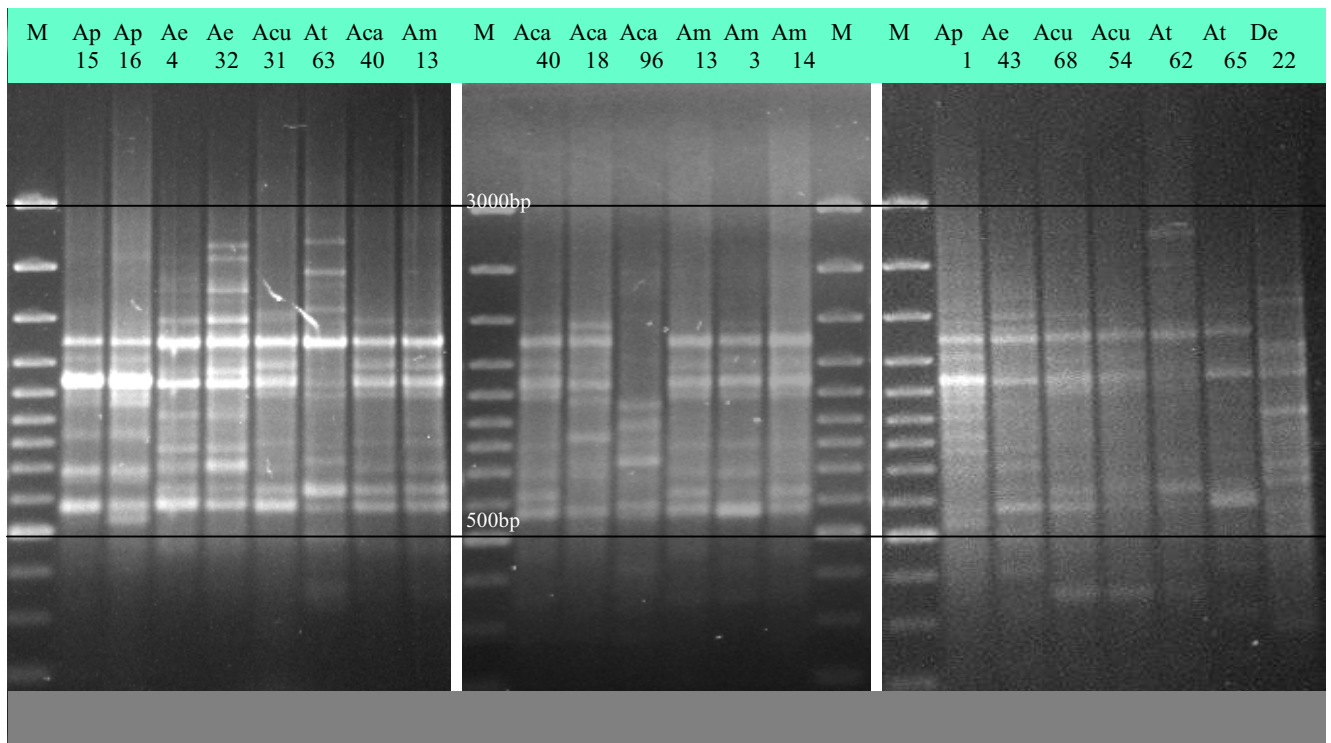


Abb. 7.4: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y05 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

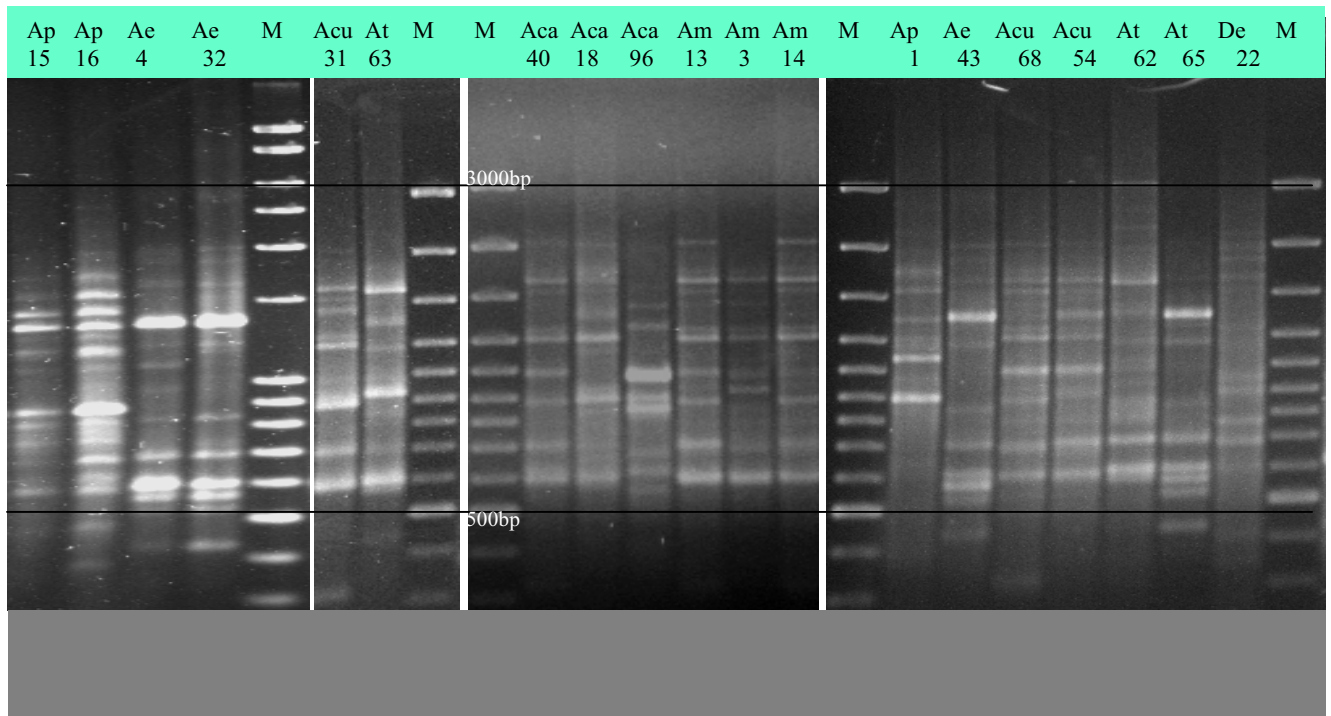


Abb. 7.5: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y06 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

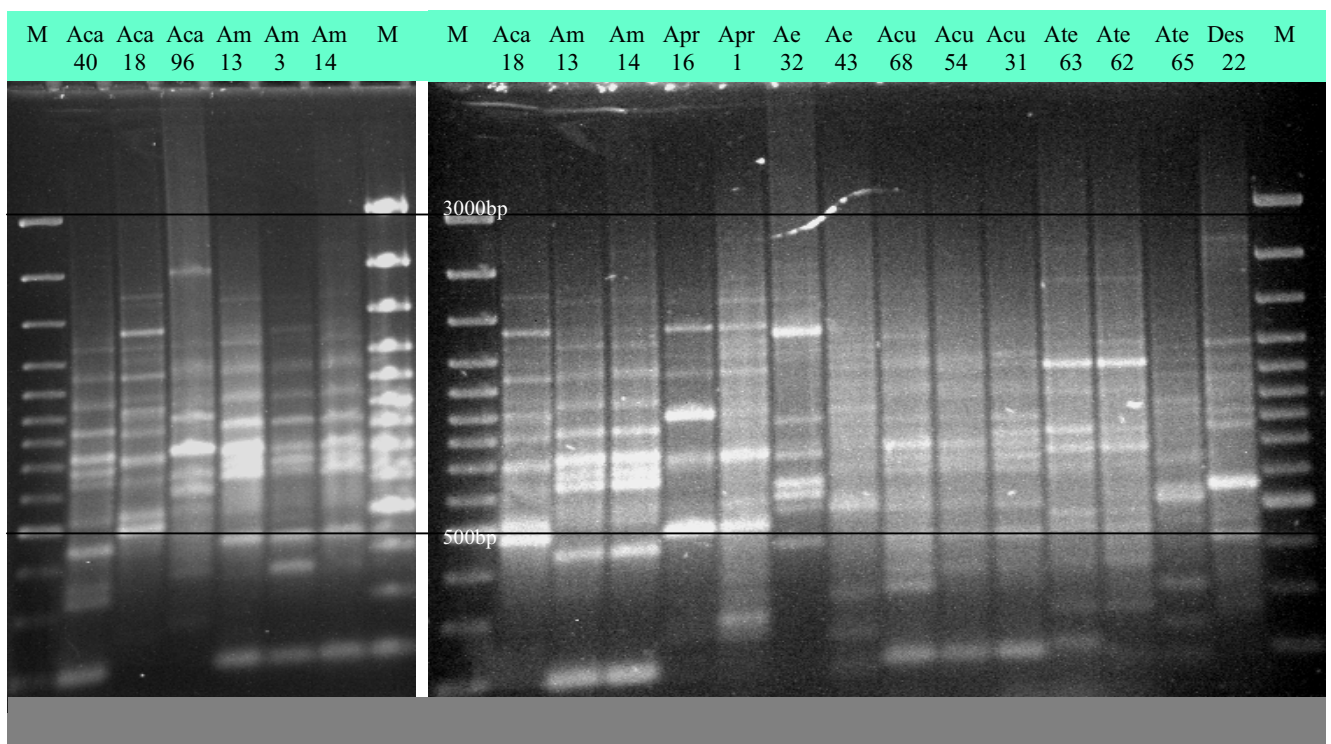


Abb. 7.6: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y07 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder



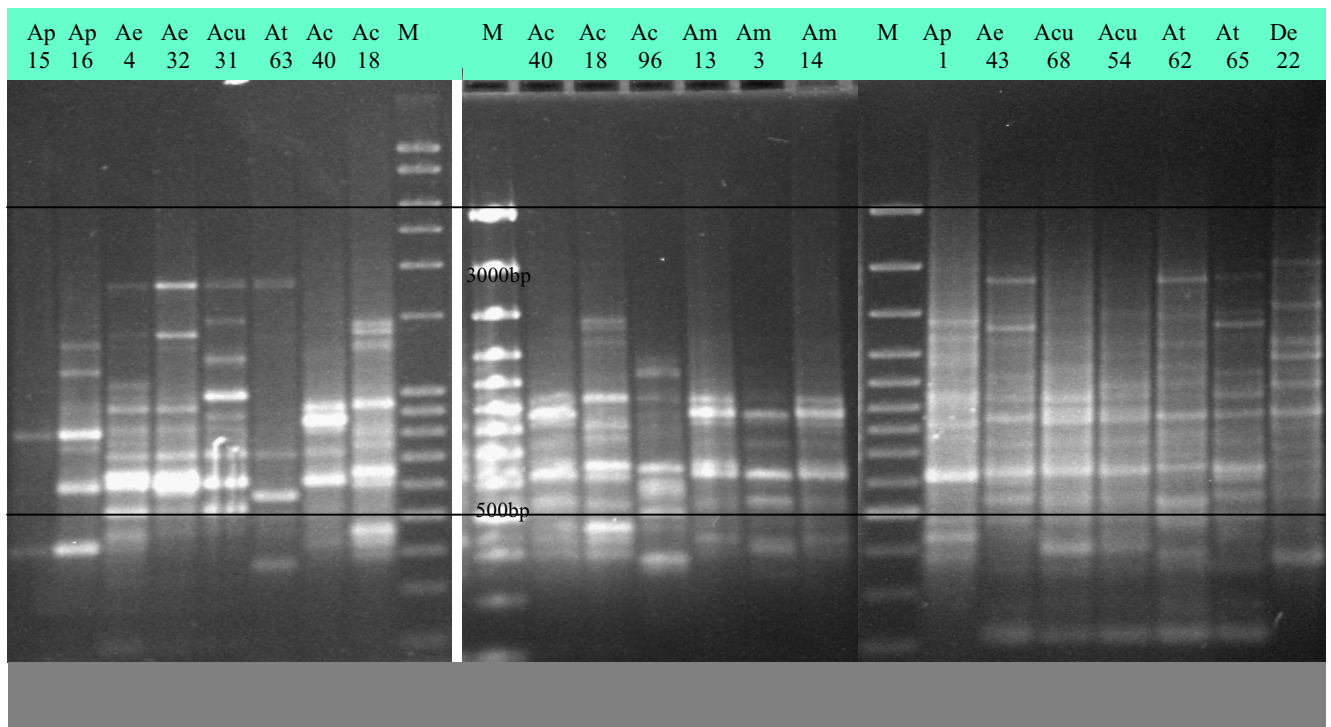


Abb. 7.7: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y08 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

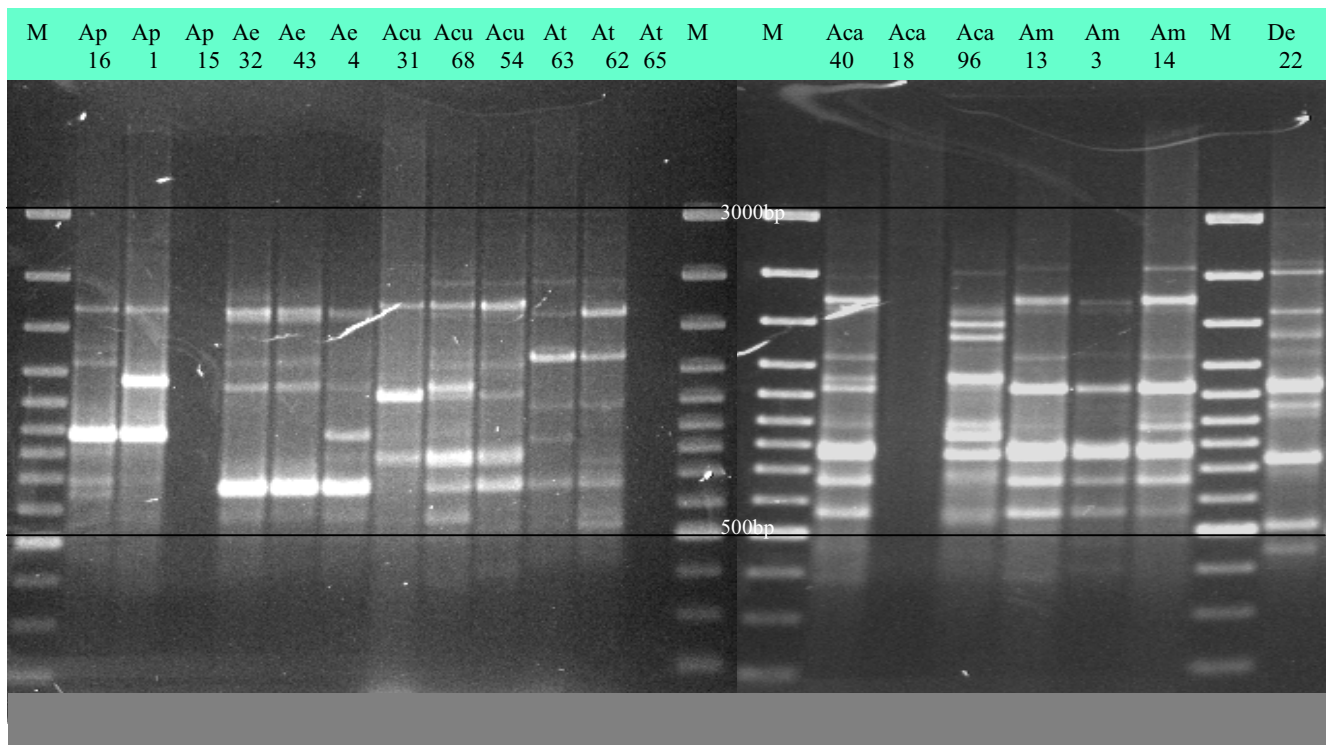


Abb. 7.8: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y14 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

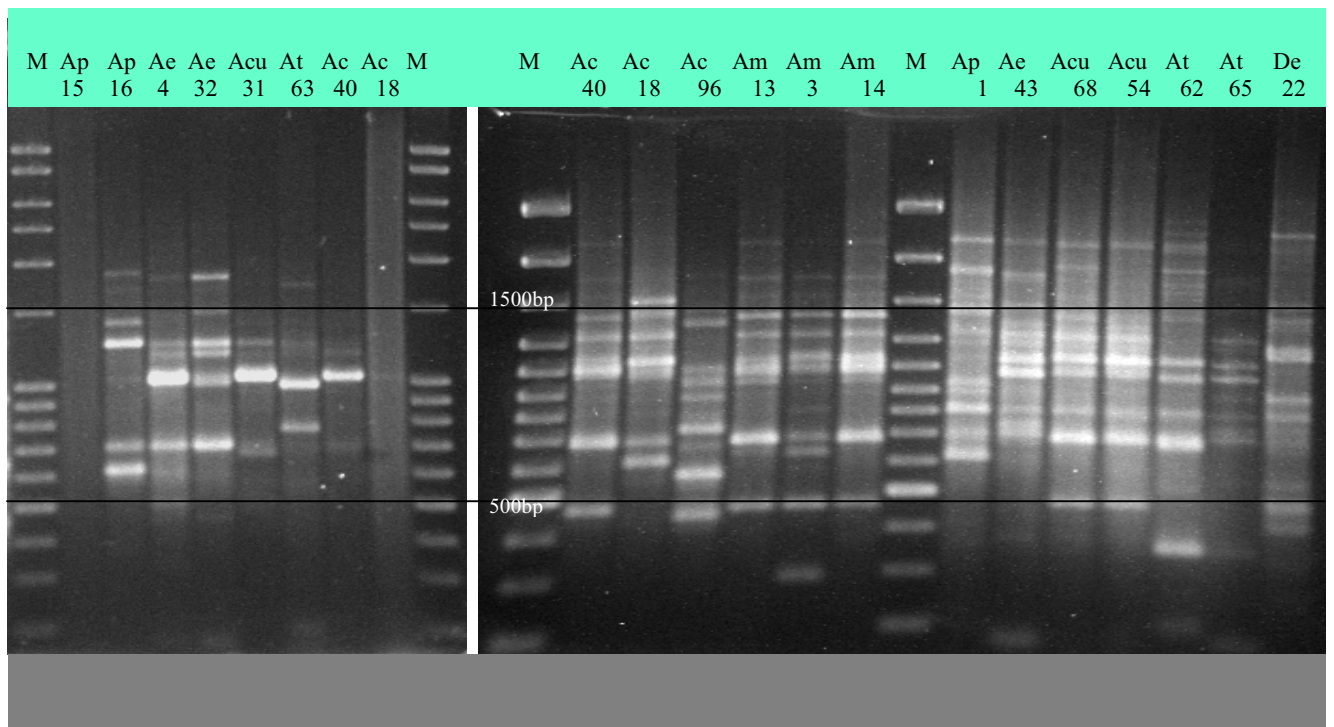


Abb. 7.9: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y15 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

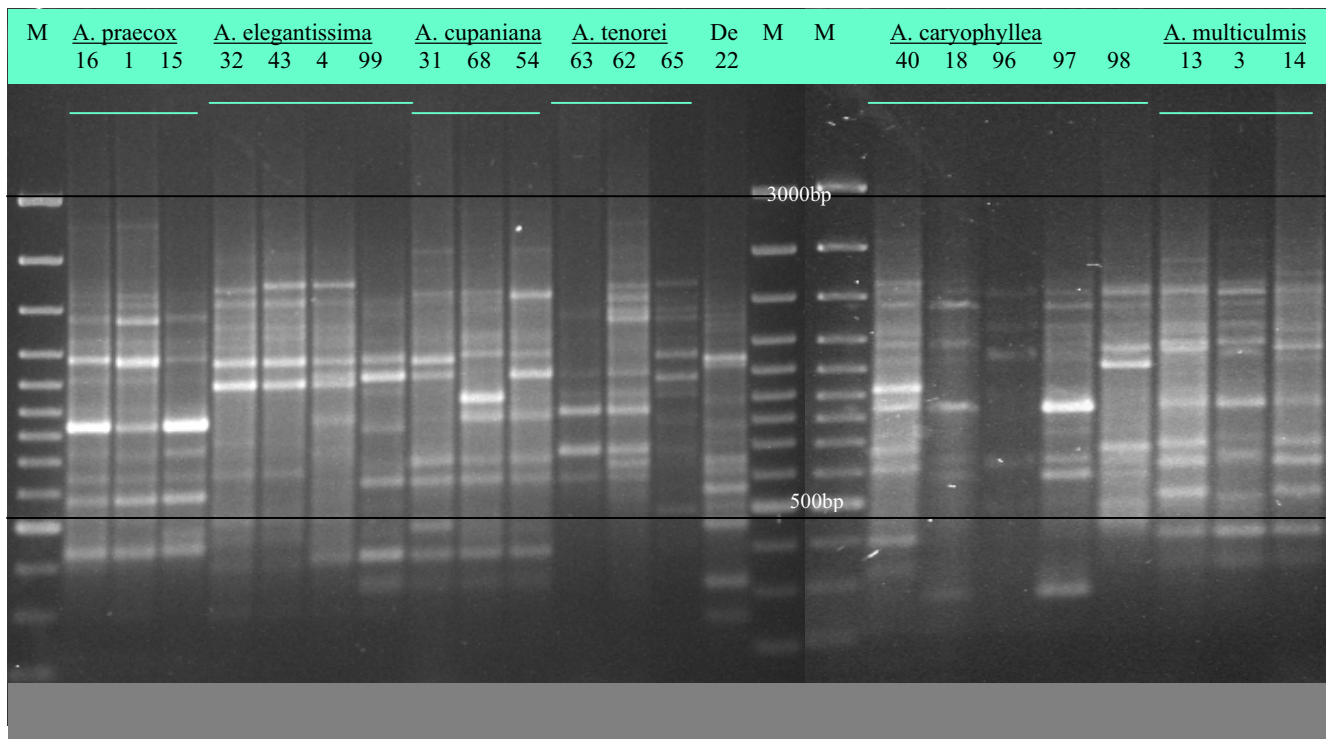


Abb. 7.10: RAPD Amplifikationsprofil von verschiedenen *Aira*-Arten durch Primer y17 (Primer Kit, Roth). M: 100bp DNA ladder

## 7.4.2 Auswertung der RAPD-Amplifikationsprofile

Art	Primer y02											
	Markerbanden (bp)											
	350	430	550	650	690	750	820	1031	1200			
A. praecox 16	0	0	1	0	1	1	1	0	1			
A. praecox 1	0	0	1	0	0	1	0	0	0			
A. praecox 15	0	0	1	0	1	?	?	0	?			
A. elegantissima 32	0	0	0	0	1	1	0	1	1			
A. elegantissima 43	0	0	0	0	1	1	0	1	?			
A. elegantissima 4	0	0	0	0	1	1	0	1	0			
A. cupaniana 31	1	1	1	1	0	1	0	1	1			
A. cupaniana 68	0	1	0	1	0	1	0	1	1			
A. cupaniana 54	1	1	0	1	0	1	0	1	1			
A. tenorei 63	0	0	0	0	0	1	0	0	1			
A. tenorei 62	0	0	0	0	?	0	0	?	1			
A. tenorei 65	0	0	0	0	1	0	0	1	0			
A. caryophyllea 40	1	1	1	1	0	1	1	1	1			
A. caryophyllea 18	1	0	0	0	1	1	1	1	1			
A. caryophyllea 96	0	1	1	1	0	0	1	0	0			
A. multiculmis 13	0	1	1	1	0	1	1	0	1			
A. multiculmis 3	0	1	0	1	0	1	1	1	1			
A. multiculmis 14	0	1	1	1	0	1	1	?	1			
Deschampsia 22	0	?	?	0	?	0	1	0	?			



Art	Primer y03											
	Markerbanden (bp)											
	650	750	1150	2000	2100							
A. praecox 16	0	0	0	1	0							
A. praecox 1	0	0	0	1	1							
A. praecox 15	?	?	?	?	?							
A. elegantissima 32	1	0	0	0	1							
A. elegantissima 43	0	0	0	0	0							
A. elegantissima 4	1	0	0	0	1							
A. cupaniana 31	0	0	1	0	0							
A. cupaniana 68	0	0	1	0	0							
A. cupaniana 54	0	0	1	0	0							
A. tenorei 63	1	1	0	1	1							
A. tenorei 62	0	0	0	1	1							
A. tenorei 65	0	0	0	0	0							
A. caryophyllea 40	1	1	1	0	0							
A. caryophyllea 18	1	1	0	1	?							
A. caryophyllea 96	0	?	1	0	?							
A. multiculmis 13	1	1	1	1	1							
A. multiculmis 3	0	1	1	?	?							
A. multiculmis 14	1	?	1	1	?							
Deschampsia 22	0	1	1	0	0							

Art	Primer y04											
	Markerbanden (bp)											
	590	600	700	900	1200	1500	1950	2100				
A. praecox 16	0	1	0	0	0	1	1	1				
A. praecox 1	0	1	0	0	0	1	1	?				
A. praecox 15	0	?	0	0	0	0	1	0				
A. elegantissima 32	0	1	1	0	1	1	1	0				
A. elegantissima 43	0	0	1	0	1	0	?	0				
A. elegantissima 4	0	1	1	0	1	0	1	0				
A. cupaniana 31	1	0	1	1	0	1	0	0				
A. cupaniana 68	1	0	0	1	0	1	0	0				
A. cupaniana 54	1	0	1	1	0	1	0	0				
A. tenorei 63	0	1	1	0	1	1	1	1				
A. tenorei 62	0	1	1	0	1	1	0	1				
A. tenorei 65	0	0	0	0	1	1	0	0				
A. caryophyllea 40	1	0	1	1	1	1	0	1				
A. caryophyllea 18	0	1	0	0	1	1	?	0				
A. caryophyllea 96	1	0	1	1	0	1	0	?				
A. multiculmis 13	1	0	1	1	1	1	0	1				
A. multiculmis 3	1	0	1	1	0	0	0	0				
A. multiculmis 14	1	0	1	1	1	1	0	1				
Deschampsia 22	0	1	0	0	0	0	0	0				

Art	Primer y05											
	Markerbanden (bp)											
	580	620	690	750	1000	1100	1200	1300	1490	2000		
A. praecox 16	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0		
A. praecox 1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0		
A. praecox 15	1	0	1	0	?	1	?	1	0	0		
A. elegantissima 32	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1		
A. elegantissima 43	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0		
A. elegantissima 4	1	1	1	1	0	1	0	1	1	?		
A. cupaniana 31	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0		
A. cupaniana 68	1	1	?	0	1	1	1	1	1	0		
A. cupaniana 54	?	1	?	0	1	1	1	1	?	0		
A. tenorei 63	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1		
A. tenorei 62	?	1	?	0	?	?	0	1	0	0		
A. tenorei 65	1	1	?	0	0	1	0	1	1	0		
A. caryophyllea 40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
A. caryophyllea 18	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0		
A. caryophyllea 96	1	0	0	1	0	0	0	0	?	0		
A. multiculmis 13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
A. multiculmis 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
A. multiculmis 14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
Deschampsia 22	1	1	1	?	?	1	1	0	0	0		

Art	Primer y06											
	Markerbanden (bp)											
	400	600	700	800	850	1000	1200	1350	1400	1600		
A. praecox 16	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0		
A. praecox 1	0	0	0	0	?	1	1	1	0	0		
A. praecox 15	0	1	?	0	1	0	1	1	1	0		
A. elegantissima 32	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1		
A. elegantissima 43	0	1	1	0	1	0	1	1	0	?		
A. elegantissima 4	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1		
A. cupaniana 31	0	1	1	0	0	?	1	0	1	1		
A. cupaniana 68	0	1	1	?	0	1	1	0	0	1		
A. cupaniana 54	0	1	1	?	0	1	1	1	0	1		
A. tenorei 63	0	1	1	0	1	?	1	1	0	1		
A. tenorei 62	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1		
A. tenorei 65	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0		
A. caryophyllea 40	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1		
A. caryophyllea 18	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1		
A. caryophyllea 96	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0		
A. multiculmis 13	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1		
A. multiculmis 3	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1		
A. multiculmis 14	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1		
Deschampsia 22	1	?	1	0	0	0	0	0	0	1		

Art	Primer y07											
	Markerbanden (bp)											
	300	500	550	620	690	730	800	950	1050	1800		
A. praecox 16	0	1	?	0	1	0	0	0	1	0		
A. praecox 1	1	1	1	0	0	1	?	?	1	1		
A. praecox 15	0	1	?	0	?	0	0	0	0	0		
A. elegantissima 32	?	0	1	1	0	0	1	1	1	1		
A. elegantissima 43	0	0	1	0	?	0	?	?	1	0		
A. elegantissima 4	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1		
A. cupaniana 31	0	0	1	1	1	1	1	?	1	0		
A. cupaniana 68	0	0	1	1	1	1	1	?	1	0		
A. cupaniana 54	0	0	1	1	1	1	1	?	1	0		
A. tenorei 63	0	1	0	?	1	0	0	?	1	1		
A. tenorei 62	0	1	0	?	1	0	0	?	1	1		
A. tenorei 65	1	0	1	?	0	0	0	0	?	0		
A. caryophyllea 40	0	0	0	1	1	1	0	1	1	?		
A. caryophyllea 18	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1		
A. caryophyllea 96	?	0	1	1	0	1	0	1	1	0		
A. multiculmis 13	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1		
A. multiculmis 3	0	?	1	1	1	1	0	1	1	1		
A. multiculmis 14	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1		
Deschampsia 22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		

Art	Primer y08											
	Markerbanden (bp)											
	410	500	600	710	800	950	1300	1450	1490	1900		
A. praecox 16	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0		
A. praecox 1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0		
A. praecox 15	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
A. elegantissima 32	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1		
A. elegantissima 43	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1		
A. elegantissima 4	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1		
A. cupaniana 31	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1		
A. cupaniana 68	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
A. cupaniana 54	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
A. tenorei 63	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1		
A. tenorei 62	0	1	1	1	1	?	0	0	0	1		
A. tenorei 65	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1		
A. caryophyllea 40	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
A. caryophyllea 18	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0		
A. caryophyllea 96	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
A. multiculmis 13	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
A. multiculmis 3	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0		
A. multiculmis 14	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
Deschampsia 22	0	?	?	0	1	0	0	0	1	0		

Art	Primer y14											
	Markerbanden (bp)											
	510	550	650	750	790	890	1050	1100	1300	1600	1700	
A. praecox 16	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
A. praecox 1	0	0	0	0	0	1	0	0	?	0	1	
A. praecox 15	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
A. elegantissima 32	0	0	1	0	0	0	0	1	?	1	0	
A. elegantissima 43	0	0	1	0	0	0	0	1	?	1	0	
A. elegantissima 4	0	0	1	0	0	1	0	?	0	1	0	
A. cupaniana 31	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	
A. cupaniana 68	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	
A. cupaniana 54	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	
A. tenorei 63	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
A. tenorei 62	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
A. tenorei 65	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
A. caryophyllea 40	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
A. caryophyllea 18	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
A. caryophyllea 96	0	1	?	0	1	1	0	1	0	1	0	
A. multiculmis 13	0	1	1	0	1	?	1	0	1	1	1	
A. multiculmis 3	0	1	1	0	1	0	1	0	?	1	1	
A. multiculmis 14	0	1	1	0	1	1	1	0	1	?	1	
Deschampsia 22	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	

Art	Primer y15											
	Markerbanden (bp)											
	700	1050	1200	1300	1900							
A. praecox 16	1	0	0	1	1							
A. praecox 1	1	0	0	?	1							
A. praecox 15	?	?	?	?	?							
A. elegantissima 32	1	1	1	1	1							
A. elegantissima 43	1	1	1	0	1							
A. elegantissima 4	1	1	1	1	1							
A. cupaniana 31	1	1	1	1	0							
A. cupaniana 68	1	1	1	1	0							
A. cupaniana 54	1	1	1	1	0							
A. tenorei 63	0	0	1	1	1							
A. tenorei 62	1	1	0	1	1							
A. tenorei 65	?	1	1	?	?							
A. caryophyllea 40	1	1	1	1	0							
A. caryophyllea 18	1	1	1	1	0							
A. caryophyllea 96	0	0	0	0	0							
A. multiculmis 13	1	1	1	1	0							
A. multiculmis 3	1	1	1	1	0							
A. multiculmis 14	1	1	1	1	0							
Deschampsia 22	?	0	0	1	0							



Art	Primer y17											
	Markerbanden (bp)											
	400	570	600	650	840	900	1000	1031	1100	1150	1450	1500
A. praecox 16	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
A. praecox 1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1
A. praecox 15	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	?
A. elegantissima 32	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
A. elegantissima 43	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
A. elegantissima 4	1	0	?	0	1	0	1	1	1	0	?	1
A. cupaniana 31	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
A. cupaniana 68	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
A. cupaniana 54	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
A. tenorei 63	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	?	0
A. tenorei 62	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
A. tenorei 65	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
A. caryophyllea 40	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
A. caryophyllea 18	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
A. caryophyllea 96	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A. multiculmis 13	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
A. multiculmis 3	1	0	?	?	1	0	0	0	0	1	1	1
A. multiculmis 14	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
Deschampsia 22	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Focke Albers möchte ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut, die fachliche Betreuung sowie die stetige Diskussionsbereitschaft danken.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Klaus B. Tenberge möchte ich mich für die Übernahme des zweiten Gutachtens dieser Arbeit bedanken.

Ein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Paul Tudzynski für die Möglichkeit, in seinen Laboren zu arbeiten, und an die Mitglieder seiner Arbeitsgruppe für die ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Ingo Schubert und besonders Dr. Jörg Fuchs vom IPK Gatersleben sei herzlich gedankt für die Unterweisung in die Technik der GISH und die freundliche Zusammenarbeit.

Ich danke den zahlreichen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie besonders den übrig gebliebenen Mitstreitern Matthias Becker und Cathérine Schöpfer für eine immerzu andauernde sehr schöne Arbeitsatmosphäre und für die kollegiale Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Botanik und den guten Seelen Frau In der Stroth und Frau Pieper-Koners danke ich für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Den Mitarbeitern des Gartenpersonals des Botanischen Gartens Münster sei gedankt für eine angenehme Zusammenarbeit und für die Pflege meines Forschungsmaterials.

Stefanie Schültke danke ich ganz herzlich für wertvolle Tips und ihre Hilfe und natürlich dafür, dass sie sich die Mühe gemacht hat diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Bei meiner ehemaligen Kollegin Tasoula Touloumenidou im fernen Griechenland möchte ich mich für ihre damalige Unterstützung und Hilfsbereitschaft, aber besonders für die immerwährende Freundschaft bedanken.

Ich danke auch allen meinen Freunden und Bekannten für eine wirklich schöne Zeit in Münster. Dafür, dass ihr mich immer mal wieder von dieser Arbeit weg gelockt und abgelenkt habt, sei euch gedankt. Es geschah stets im richtigen Moment.

Meinem Freund Peter danke ich besonders für seine Liebe und Unterstützung, ohne die ich in den letzten Monaten oft an den Rand der Verzweiflung gekommen wäre. Danke, dass du auch in meinen „schlimmen Phasen“ nicht die Geduld verloren hast und immer zu mir gestanden bist.

Abschließend möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Familie und im speziellen bei meinen Eltern für ihre fortwährende ideelle und materielle Unterstützung bedanken, ohne die an eine Fertigstellung dieser Arbeit nicht zu denken gewesen wäre. Danke, dass ihr an mich geglaubt und mir immer wieder Mut gemacht habt. Ich liebe euch.

## Tabellarischer Lebenslauf

Nicole Heinrichsmeier,

geboren am 15.10.1973 in Beckum

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Name des Vaters: Hans Heinrichsmeier

Name der Mutter, geb.: Marianne Heinrichsmeier, geb. Kruggel

Schulbildung: Katholische Grundschule – Vitusschule:  
1980 bis 1984 in Sünninghausen  
Thomas-Morus-Gymnasium:  
1984 bis 1993 in Oelde

Hochschulreife (Abitur): am 15. Juni 1993 in Oelde

Studium: Diplomstudiengang der Biologie an der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster vom WS 1993/94 bis SS 1999

Promotionsstudiengang: seit dem WS 1999/2000

Prüfungen: Diplom im Biologie am 11.8.1999 an der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

### Tätigkeiten:

als Studentische Hilfskraft an der WWU Münster:

01.04.1997 bis 30.09.1997 Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie

01.10.1997 bis 31.03.1998 Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie

01.04.1998 bis 30.09.1998 Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie

01.10.1998 bis 31.12.1998 Institut für Botanik und Botanischer Garten

als Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der WWU Münster:

01.10.1999 bis 31.03.2000 Institut für Botanik und Botanischer Garten  
01.04.2000 bis 30.09.2000 Institut für Botanik und Botanischer Garten  
01.10.2000 bis 31.12.2000 Institut für Botanik und Botanischer Garten  
01.01.2001 bis 31.05.2001 Institut für Botanik und Botanischer Garten

als Wissenschaftliche Hilfskraft an der WWU Münster:

01.06.2001 bis 31.12.2001 Institut für Botanik und Botanischer Garten  
01.02.2002 bis 31.05.2002 Institut für Botanik und Botanischer Garten  
01.08.2002 bis 31.07.2003 Institut für Botanik und Botanischer Garten  
01.07.2003 bis 31.07.2003 Institut für Didaktik der Biologie  
01.08.2003 bis 31.10.2003 Institut für Didaktik der Biologie  
01.11.2003 bis 31.12.2003 Institut für Botanik und Botanischer Garten

Beginn der Dissertation: Oktober 1999 am Institut für Botanik der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster  
Betreuer: Prof. Dr. F. Albers

---

*(Unterschrift)*