



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Zellkern-DNA-Gehalte und Anatomie
der generativen Fortpflanzungseinheiten von
Potentilla sensu lato (Rosaceae)

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Lea Elisabeth Kausche
Studienrichtung: (lt. Studienblatt)	A 449 Diplomstudium Pharmazie
Betreuer:	ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel

Wien, im September 2010

INHALT

Abbildungsverzeichnis.....	4	
Tabellenverzeichnis	6	
1	Allgemeines	7
1.1	Einleitung.....	7
1.1.1	Anwendung als Arzneipflanzen.....	8
1.2	Reproduktion	11
1.2.1	Blütenbau.....	11
1.2.2	Embryosack und Pollen	11
1.2.3	Reproduktionsmechanismen.....	13
1.2.4	Früchtchen	15
2	Zielsetzung der Diplomarbeit	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Durchflusszytometrie.....	19
3.1.1	Ploidy Analyser (partec).....	20
3.1.2	FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company)	22
3.1.3	Auswertung.....	24
3.2	Mikroskopie.....	25
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Durchflusszytometrie.....	28
4.1.1	Methodenentwicklung Durchflusszytometrie.....	29
4.1.2	Datenübersicht Durchflusszytometrie	34
4.1.3	Zusammenfassung und Beispiele	41
4.1.4	Einzelresultate	43
4.2	Mikroskopie.....	80
4.2.1	Morphologie	81
4.2.2	Anatomie	86
5	Diskussion	96
5.1	Durchflusszytometrie.....	96
5.2	Mikroskopie.....	98
Literaturverzeichnis	100	
Herkunftsnachweis der Früchtchen	104	
Populationen der Durchflusszytometrie.....	104	

Populationen der Mikroskopie	109
Zusammenfassung	110
Abstract	112
Danksagung	114
Lebenslauf	116

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 partec Ploidy Analyser.....	21
Abbildung 2 BD FACSCalibur.....	23
Abbildung 3 Arbeitsplatz Mikrotom.....	25
Abbildung 4 Arbeitsplatz Mikroskop	27
Abbildung 5 Beispiel eines Auswertungsblattes FACSCalibur, <i>Potentilla pusilla</i>	31
Abbildung 6 Auswertungsblatt FACSCalibur a; <i>Potentilla pusilla</i>	32
Abbildung 7 Auswertungsblatt FACSCalibur b; <i>Potentilla pusilla</i>	33
Abbildung 8 FACSCalibur <i>Argentina leuconota</i> , Embryo und Endosperm je mit G2 ..	42
Abbildung 9 Ploidy Analyser, <i>Drymocallis geoides</i> Ptl2895	43
Abbildung 10 FACSCalibur, <i>Drymocallis geoides</i> Ptl2755	44
Abbildung 11 FACSCalibur, <i>Drymocallis geoides</i> Ptl2895	45
Abbildung 12 Ploidy Analyser, <i>Drymocallis glandulosa</i> Ptl2786	46
Abbildung 13 FACSCalibur, <i>Drymocallis glandulosa</i> Ptl2756	47
Abbildung 14 FACSCalibur, <i>Drymocallis glandulosa</i> Ptl2710	48
Abbildung 15 Ploidy Analyser, <i>Potentilla argentea</i> Ptl2801	49
Abbildung 16 FACSCalibur, <i>Potentilla argentea</i> Ptl2712.....	50
Abbildung 17 Ploidy Analyser, <i>Potentilla aurea</i> Ptl2935	51
Abbildung 18 Ploidy Analyser, <i>Potentilla aurea</i> Ptl2941	52
Abbildung 19 FACSCalibur, <i>Potentilla aurea</i> Ptl2935.....	53
Abbildung 20 FACSCalibur, <i>Potentilla aurea</i> Ptl2941	54
Abbildung 21 Ploidy Analyser, <i>Potentilla carniolica</i> Ptl2868.....	55
Abbildung 22 Ploidy Analyser, <i>Potentilla gracilis</i> Ptl2711	56
Abbildung 23 Ploidy Analyser, <i>Potentilla grandiflora</i> Ptl2892.....	57
Abbildung 24 FACSCalibur, <i>Potentilla grandiflora</i> Ptl2897.....	58
Abbildung 25 Ploidy Analyser, <i>Potentilla hippiana</i> Ptl2930.....	59
Abbildung 26 FACSCalibur, <i>Potentilla incana</i> Ptl2659	61
Abbildung 27 Ploidy Analyser, <i>Potentilla multifida</i> Ptl2729.....	62
Abbildung 28 Ploidy Analyser, <i>Potentilla multifida</i> Ptl2741	63
Abbildung 29 FACSCalibur, <i>Potentilla norvegica</i> Ptl2714	65
Abbildung 30 FACSCalibur, <i>Potentilla nuttallii</i> Ptl2655	67
Abbildung 31 Ploidy Analyser, <i>Potentilla ornithopoda</i> Ptl2715	68
Abbildung 32 Ploidy Analyser, <i>Potentilla ornithopoda</i> Ptl2716	69
Abbildung 33 FACSCalibur, <i>Potentilla ornithopoda</i> Ptl2715	70
Abbildung 34 Ploidy Analyser, <i>Potentilla pensylvanica</i> Ptl2765	71
Abbildung 35 FACSCalibur, <i>Potentilla pensylvanica</i> Ptl2656	72
Abbildung 36 Ploidy Analyser, <i>Potentilla pulcherrima</i> Ptl2718	73
Abbildung 37 FACSCalibur, <i>Potentilla pulcherrima</i> Ptl2718	74
Abbildung 38 FACSCalibur, <i>Potentilla recta</i> Ptl2912.....	76
Abbildung 39 FACSCalibur, <i>Potentilla recta</i> Ptl2811	77

Abbildung 40 FACSCalibur, <i>Potentilla recta</i> Ptl2929	78
Abbildung 41 Ploidy Analyser, <i>Potentilla villosa</i> Ptl2807	79
Abbildung 42 Beispiel eines der zur Konstruktion des morphologischen Modells verwendeten Längsschnittes, <i>Potentilla velutina</i>	80
Abbildung 43 morphologisches Modell eines <i>Potentilla</i> -Früchtchens, farbig	81
Abbildung 44 morphologisches Modell eines <i>Potentilla</i> -Früchtchens	82
Abbildung 45 Schnitt eines Früchtchens, <i>Potentilla velutina</i> (10x vergrößert, Dunkelfeld).....	83
Abbildung 46 Schnitt eines Früchtchens, <i>Potentilla velutina</i> (10x vergrößert, polarisiert + Dunkelfeld)	83
Abbildung 47 Schnitt eines Früchtchens, <i>Potentilla velutina</i> (100x vergrößert, Dunkelfeld).....	84
Abbildung 48 Schnitt eines Früchtchens, <i>Potentilla velutina</i> (100x vergrößert, polarisiert)	84
Abbildung 49 Schnitt eines Früchtchens, <i>Potentilla velutina</i> (100x vergrößert).....	85
Abbildung 50 Schnitt eines Früchtchens, <i>Potentilla velutina</i> (100x vergrößert, polarisiert)	85
Abbildung 51 Zeichnung: Fruchtwand einer <i>Potentilla velutina</i> (400x vergrößert)	87
Abbildung 52 Zeichnung: Testa, Endosperm und Embryo einer <i>Potentilla velutina</i> (400x vergrößert).....	88
Abbildung 53 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (gefärbt mit Safranin & Astrablau, 200x vergrößert).....	89
Abbildung 54 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (gefärbt mit Safranin & Astrablau, 400x vergrößert).....	89
Abbildung 56 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (200x vergrößert).....	90
Abbildung 55 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (gefärbt mit Safranin & Astrablau, 200x vergrößert).....	90
Abbildung 57 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (gefärbt mit Phloroglucin, 200x vergrößert).....	91
Abbildung 58 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (gefärbt mit Phloroglucin, 400x vergrößert).....	91
Abbildung 59 Fruchtwand, <i>Potentilla velutina</i> (polarisiert, 200x vergrößert)	92
Abbildung 60 Fruchtwand, <i>Potentilla pusilla</i> (polarisiert, Dunkelfeld, 200x vergrößert)	92
Abbildung 61 Fruchtwand, <i>Potentilla velutina</i> (200x vergrößert).....	93
Abbildung 62 Fruchtwand, <i>Potentilla velutina</i> (Dunkelfeld, 600x vergrößert).....	93
Abbildung 63 Fruchtwand, <i>Potentilla velutina</i> (200x vergrößert).....	94
Abbildung 64 Fruchtwand, <i>Potentilla velutina</i> (Dunkelfeld, 200x vergrößert).....	94
Abbildung 65 <i>Potentilla velutina</i> (Dunkelfeld, 100x)	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Fluorochrome nach Doležel et al. 2007	20
Tabelle 2 Geräteeinstellungen Ploidy Analyser.....	21
Tabelle 3 Geräteeinstellungen BD FACSCalibur	22
Tabelle 4 Microm HM 325 Einstellungen	26
Tabelle 5 Nikon Mikroskop – Daten	27
Tabelle 6 Übersicht Verhältniswerte Ploidy Analyser	34
Tabelle 7 Übersicht Verhältniswerte FACSCalibur, Früchtchenqualität	38

1 ALLGEMEINES

1.1 EINLEITUNG

Potentilla L., Gattung Fingerkraut, umfasst je nach taxonomischem Konzept 300 bis 500 Arten und zählt somit zu den artenreichsten Pflanzengattungen der nördlichen Hemisphäre (Soják 2005; Airy Shaw 1973; Soják 2008). Die Vielfalt der in dieser Gattung und ihren nächsten Verwandten vorkommenden Reproduktionsmechanismen erschwert die Unterscheidung und Einteilung der Arten sowie das Erstellen eines Stammbaums. Neben meiotischer Entstehung der Gameten mit anschließender sexueller Befruchtung der Eizelle sind bei *Potentilla* verschiedene Formen fakultativ asexueller Fortpflanzung, insbesondere Agamospermie, verbreitet, sowie das damit in Verbindung gebrachte Auftreten von Hybridisierung und Polyploidie.

Systematisch betrachtet sind Fingerkräuter bedecktsamige Pflanzen, Angiospermen, aus der Familie der Rosengewächse, Rosaceae. Innerhalb der mehrere Unterfamilien bildenden Rosengewächse werden sie zu den Rosoideae gezählt. Ebenfalls um Rosengewächse der Unterfamilie Rosoideae handelt es sich beispielsweise bei der Erdbeere (Gattung *Fragaria*), Frauenmantel (*Alchemilla*) und Odermennig (*Agrimonia*). Diese Gattungen, die ebenfalls als Arzneipflanzen verwendete Arten enthalten, sind somit nahe Verwandte der Fingerkräuter (Morgan et al. 1994; Dobeš & Paule 2010). Mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden, die sich vor allem auf morphologische Kriterien sowie die Beurteilung fossiler Pflanzenfunde stützen, war die Phylogenie der Angiospermen nur unzureichend zu rekonstruieren. Neuere Untersuchungen bedienten sich der Technik der DNA-Sequenzierung zur Erstellung der Stammbäume (Wilkström et al. 2000). Die molekulare Analyse konnte bestehende verwandtschaftliche Hypothesen unterstützen. So konnte die Abgrenzung der Familie der Rosaceae mit Ausnahme der Gattung *Quillaja* durch Sequenzierung des in Chloroplasten zu findenden Gens *rbcL* bestätigt werden (Morgan et al. 1994). Mitunter führt der Vergleich molekularer Merkmale zu Schlüssen die nicht mit denen anderer Untersuchungsmethoden konform gehen. Zunächst stützt sich die Phylogenie auf die molekularen Befunde. Die klassischen Ergebnisse werden anhand der rekonstruierten verwandtschaftlichen Verhältnisse neu interpretiert. In der eben erwähnten Publikation aus dem Jahr 1994 wird ferner darauf aufmerksam gemacht, dass es nicht zu einem umfassenden Bild der evolutionären Entwicklung führt eine (Neu-)Konstruktion eines Stammbaums auf einem einzelnen Kriterium oder einer einzigen Methode zu begründen. In der Frage, ob sich die Rosengewächse unter dysploidier Vermehrung des Basischromosomensatz von $x = 7$ auf $x = 9$ entwickelt haben oder ob umgekehrt eine Reduktion stattgefunden hat, liefern die Untersuchungen Morgans und Mitarbeiter einen Hinweis, dass sich die Chromosomengrundzahl $x = 8$ der Gattung *Alchemilla*, von $x = 7$ abgeleitet hat. Die Gattung *Potentilla* entwickelte sich aus einer mit *Alchemilla*

gemeinsamen Stammart, hat jedoch die ursprüngliche monoploide chromosomale Grundausrüstung von $x = 7$ beibehalten (Morgan et al. 1994). Für die Systematik der Fingerkräuter hat die Berücksichtigung molekularer Daten eine bedeutende taxonomische Neuordnung herbeigeführt: die Untersuchung von Chloroplasten-DNA (cpDNA) ermöglichte die Erstellung eines phylogenetischen Konzeptes der Subtribus *Potentillinae* (Dobeš & Paule 2010). Diese wurde in acht Linien, Stamm B-I, unterteilt. Innerhalb dieser zeigt sich eine weitere Differenzierung in zwei entwicklungsgeschichtliche Hauptlinien, den Stamm B und die Stämme C-I. Stamm C stellt hierbei eine junge, d.h. phylogenetisch abgeleitete, besonders artenreiche Kerngruppe innerhalb der Gattung *Potentilla* dar. Neben einer Überarbeitung der Verwandtschaftsbeziehungen bringen die neuen Erkenntnisse auch Änderungen bezüglich der Gattungszugehörigkeit einzelner Arten mit sich. So wird beispielsweise die von Wolf 1908 als *Potentilla fruticosa* bezeichnete Art heute der Gattung *Dasiphora* zugeordnet. In Übereinstimmung mit fossilen Daten wurde auf Basis der Analyse der cpDNA eine erste Darstellung phylogeographischer Entwicklung mit Ursprung in Asien und unterschiedlich rascher geografischer Ausbreitung und Evolution der einzelnen Stämme ermittelt, deren weitere Charakterisierung nun gezielt verfolgt werden kann (ibidem).

1.1.1 ANWENDUNG ALS ARZNEIPFLANZEN

Im Rahmen des Pharmaziestudiums lernt man zwei sowohl traditionell als auch schulmedizinisch angewandte Heilpflanzen kennen die der Gattung *Potentilla* angehören: die Blutwurz (*Potentilla erecta* L.), gemäß Phylogenie und nomenklatorischer Priorität eine *Potentilla* im aller engsten Sinn, und das Gänsefingerkraut (*Argentina anserina* = *Potentilla anserina* L. nach bisherig gängiger taxonomischer Auffassung), das diesen neuen Erkenntnissen zufolge nur mehr in einer weit gefassten Definition den Fingerkräutern zugeordnet werden könnte (Dobeš & Paule 2010).

Das **Gänsefingerkraut** (*Argentina anserina*, ehemals *Potentilla anserina*), im Volksmund unter anderem auch Anserine oder Krampfkraut genannt und bekannt als „Frauenpflanze“, ist ein niedrig wachsendes, mehrjähriges Kraut (Hemikryptophyt) dessen Laubblätter unterbrochen gefiedert sind. Die ein bis drei Zentimeter langen Fiederblätter weisen wiederum einen gesägten bis fiederspaltigen Rand auf und sind unterseitig dichtfilzig behaart. Dies verleiht der Blattunterseite ein silbriges Schimmern. Gesammelt und getrocknet wird das blühende Kraut (*Anserinae herba*), aber auch der Wurzelstock (*Anserinae rhizoma*). Als wirksame Inhaltsstoffe sind im trockenen Kraut 6(-10)% Gerbstoffe, sowie noch nicht näher bekannte spasmolytische Verbindungen und Flavonoide identifiziert worden. Das Vorhandensein der Trihydroxyflavonoide Myricetin und Leucodelphinidin stellt eine phytochemische Besonderheit innerhalb der Rosaceen dar (Bate-Smith 1958). Die adstringierende Wirkung der Droge ist auf die

enthaltenen Gerbstoffe zurückzuführen. Anwendungsgebiete sind akute Diarrhoe und dysmenorrhische Beschwerden, zu deren Behandlung mehrmals täglich eine Tasse frisch bereiteter Aufguss von 1 bis 2 Teelöffel der getrockneten Pflanze getrunken wird. Nach Kneipp wirkt ein Aufguss von einem Gramm der Pflanze mit heißer Milch entspannend bei sich ankündigenden Krämpfen. Des Weiteren können Zubereitungen aus *Anserinae herba* zur Therapie leichter Schleimhautentzündungen im Bereich von Mund und Rachen eingesetzt werden. (Hertwig 1938 S.278; Schönfelder 2002 S.30; Wendelberger 2008 S.46f.; Wichtl 2002 S.48ff.) Interessant ist in diesem Zusammenhang die Diversifizierung der Gattung *Argentina* in ca. 20 pharmazeutisch weitgehend unbeachtete Arten im südost-asiatischen Raum (Ikeda & Ohba 1999).

Der **Tormentillwurzelstock** (*Tormentillae rhizoma*) besteht aus dem von Wurzeln befreiten, getrockneten Rhizom der *Potentilla erecta* (syn. *Tormentilla erecta* L., *Potentilla tormentilla* Neck.), zu Deutsch Blutwurz oder Tormentill. Es sind dieser und die aus ihm hergestellte Tormentilltinktur die bislang einzige Droge und Zubereitung der Gattung *Potentilla*, die als Monographien Eingang in das Europäische Arzneibuch gefunden haben. Die Blätter der Stammpflanze sind gefingert, die gelben Blüten sind im Gegensatz zur in der Gattung *Potentilla* weit verbreiteten Fünzfähigkeit vierzählig. Der Name Blutwurz entstammt der Beobachtung, dass das Rhizom an frischen Brüchen und Schnittflächen rasch eine blutrote Farbe annimmt. Die getrocknete Droge ist dunkelrotbraun, sehr hart und unregelmäßig geformt. Manche Drogenstücke enthalten helle Leitbündel, die wie Kabel aussehend hell aus dem Wurzelstock herausragen. Wie Gänsefingerkraut wird auch Tormentillwurzelstock als Tee zubereitet und zur Behandlung akuter Diarrhoe verwendet. Die Wirksamkeit von Tormentillwurzelextrakt bei Diarrhoe ist durch eine placebokontrollierte klinische Studie an unter Rotaviren-Infektion leidenden Kindern wissenschaftlich belegt (Subbotina et al. 2003). Durch den hohen Gerbstoffgehalt von 17 bis 22%, für Arzneibuchkonformität genügen jedoch 7%, ist die Droge besonders gut geeignet zur äußeren Anwendung als Rachenmittel oder Pinselung bei Entzündungen der Mundschleimhaut. Außerdem ist die Verwendung von Tormentilltee in der Lehre Sebastian Kneipps zur Blutstillung, sowie allgemein zur Behandlung von Geschwüren, Wunden, wunder Haut und Entzündungen der Augenlider bekannt. Allerdings bedingt der Gerbstoffgehalt auch ein häufigeres Auftreten von Magenbeschwerden als Nebenwirkung innerlicher Anwendung. (Europäisches Arzneibuch 2008; Hertwig 1938 S.210; Teuscher et al. 2004 S.367f., Schönfelder 2002 S.29; Wendelberger 2008 S.46f.; Wichtl 2002 S.614ff.)

Potentilla erecta und *Argentina anserina* gelten innerhalb der Verwandtschaft, die ich aus pragmatischen Gründen im Weiteren unter *Potentilla sensu lato* zusammenfasse, als die Vertreter mit der größten Anzahl an beschriebenen Inhaltsstoffen. Der traditionellen Verwendung zufolge eignen sich allerdings auch die ebenfalls in Europa vorkommenden Arten *Potentilla fruticosa* (= *Dasiphora fruticosa*), *Potentilla speciosa*, *Potentilla recta*, *Potentilla reptans* und *Potentilla fulgens* zur Therapie von

Durchfallerkrankungen und Schleimhautbeschwerden, sowie diverser Infektionen. Für die Wurzeln von *Potentilla fulgens* ist außerdem Diabetes mellitus als Indikation überliefert. Berichte zu bestimmten Krebserkrankungen als Einsatzgebiet gibt es über *Potentilla erecta* und *Potentilla fulgens* (Tomczyk et al. 2009).

Den **außereuropäischen Raum** betreffend ist die Anwendung der asiatischen *Potentilla*-Spezies *Potentilla chinensis* Ser. als Antipyretikum, zur Blutstillung und als Frauenheilmittel in Korea bekannt. Auch hier kommt Gerbstoffen die Stellung der als für die Wirkung verantwortlichen Substanzen zu. Für *Potentilla chinensis* konnte eine antitumorale Bioaktivität nachgewiesen werden (WHO 1998 S.225). Des Weiteren werden in Asien *Potentilla multicaulis*, *Potentilla atrosanguinea*, *Potentilla kleiniana*, *Potentilla peduncularis*, *Potentilla freyniana*, *Potentilla discolor* und *Potentilla multifida* traditionell als Heilpflanzen verwendet. Zu den Indikationen zählen wiederum Diarrhoe, Dysmenorrhoe und Hautwunden, aber auch Diabetes mellitus sowie infektiöse und diverse das Immunsystem betreffende Erkrankungen. Die Traditionelle Tibetische Medizin kennt Wurzelextrakte von *Potentilla anserina* zur Therapie bestimmter Virusinfektionen. Pflanzenteile von *Potentilla arguta* und *Potentilla simplex* werden in traditioneller Anwendung in Amerika zur Behandlung von viralen und fungalen Infektionen eingesetzt (Tomczyk et al. 2009).

Eine in vitro durchgeführte Untersuchung zur antimikrobiellen Aktivität von wässrigen Auszügen zwölf ausgesuchter *Potentilla* species ergab mit minimalen Hemmkonzentrationen von 0,1 bis 0,5 mg/ml höchste Wirksamkeit gegen *Helicobacter pylori* (Tomczyk et al. 2008). Dieses Ergebnis sowie aus diversen in vivo durchgeführten Studien gewonnene Daten unterstützen die Erkenntnisse einer klinischen Studie laut der der adjuvante Einsatz von Tormentillwurzelextrakt bei der Therapie ulzerativer Colitis als sinnvoll näher zu beleuchten beurteilt wird (Huber et al. 2007, Tomczyk et al. 2009).

Eine Methode zum quantitativen Screening von *Potentilla* species auf Tilirosid, Methyl-Brevifolincarboxylat und Ellagsäure wurde von Tomczyk et al. entwickelt. Bei diesem Verfahren wird das Extrakt mittels high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) aufgetrennt. Die Detektion der Komponenten erfolgt photodensitometrisch (Tomczyk et al 2010). Das in allen untersuchten Arten gefundene Tilirosid könnte einen chemotaxonomischen Marker der Rosoideae darstellen (Tomczyk 2006). Für aus *Potentilla argentea* isoliertes Tilirosid und Methyl-Brevifolincarboxylat wurde in vitro eine antineoplastisch interessante Hemmung der Topoisomerasen I und II nachgewiesen (Tomczyk et al. 2007).

1.2 REPRODUKTION

Dem vorherrschenden Reproduktionsmodus der Angiospermen entsprechend, findet die Fortpflanzung der Fingerkräuter in deren sexuellen Fortpflanzungsorganen, den Blüten, über einen Generations- und damit assoziierten Kernphasenwechsel statt. In den Blüten werden die Keimzellen oder Gameten, die generative Zelle des Pollens und die Eizelle, gebildet. Gemeinsam mit den sie geschlechtstypisch umgebenden Strukturen sind die Gameten Teil einer eigenständigen Generation, die als Pollen beziehungsweise Embryosack bezeichnet werden. Die Samenanlage beinhaltet den weiblichen Gametophyten und begrenzt sich durch ein oder zwei Integument(e) nach außen. Hier entwickelt sich aus dem Embryo der in ein Nüsschen eingeschlossene Same, das jüngste Stadium der nächsten Pflanzengeneration. Abweichend vom sexuellen Weg der Samenbildung, tritt in *Potentilla* durch Ausfall oder Umgehung der Meiose und Entwicklung des Embryos ohne Befruchtung Agamospermie oder Apomixis auf, eine Form der asexuellen oder klonalen Fortpflanzung, die über die Samen erfolgt.

1.2.1 BLÜTENBAU

Die Blüten von Fingerkräutern folgen gemäß der Zugehörigkeit zu den Rosengewächsen einem zyklischen Grundbau. Ebenfalls der Familie entsprechend handelt es sich bei *Potentilla* um zwittrige Blüten tragende Pflanzen. Ein paar wenige Arten bilden mit andro- beziehungsweise gynodynamischen Blüten Ausnahmen der allgemein strengen Zwitterblütigkeit. Bei den meisten Arten der Gattung *Potentilla sensu lato* findet sich ein Kelch bestehend aus fünf Kelchblättern, die als Wirtel alternierend zu den paarweise verwachsenen Blättern des Außenkelchs gestellt sind. Der Blütenbecher hat die Form einer flachen Schüssel an deren verdicktem Rand, der sogenannten Honigscheibe oder Diskus, sich Kron- und Staubblätter befinden. Von weißlich bis orangegelb sind verschiedene Gelbstufen als Farbe der Kronblätter anzutreffen, bei wenigen Arten tritt eine rote oder reinweiße Kronfarbe auf. Die Zahl der Staubblätter pro Blüte beträgt je nach Art zwischen 4–30. Die Form der Staubbeutel, Antheren, ist von Art zu Art charakteristisch verschieden. Als besonders zur Unterscheidung geeignet gilt der Bau des Bindegliedes, des Konnektivs (*Potentilla* s.str. ist jedoch durch den Besitz nur eines Typs gekennzeichnet, Soják 2008). Die Blütenachse ist hervorstehend gewölbt und mit zahlreichen, zwischen 20 bis 80, Fruchtknoten besetzt. Bei einigen Arten vergrößert sich der Fruchträger zur Blütezeit, jedoch selbst bei denjenigen bei denen er fleischig wird (*Potentilla indica*) fällt er bei der Fruchtreife nicht ab, wie dies bei der Erdbeere der Fall ist. (Graf S.50ff.; Wolf 1908)

1.2.2 EMBRYOSACK UND POLLEN

Gebildet wird der weibliche Gametophyt, der Embryosack oder Megagametophyt, im Inneren des Nuzellus, dem Zentrum der im Fruchtblatt befindlichen Samenanlage. Das

Bildungsgewebe des weiblichen Gametophyten wird **weibliches Archespor** genannt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Angiospermen ist die den Nuzellus umgebende Epidermis der Potentillen mehrschichtig. Zur Spitze hin nimmt die Zahl der Schichten zu und es formt sich eine Epidermiskalotte. Initialzellen des Archespors werden als Archespor Mutterzellen (AMZ) bezeichnet. Sie gehen aus subepidermalem Gewebe hervor und können sich noch mitotisch teilen. Die Archesporzellen entstammen entweder direkt den AMZ oder einer deren Tochterzellen. Diese wiederum sind direkter Ursprungsort der Embryosackmutterzelle (EMZ), die selbst noch diploid ($2n$) ist und somit der sporophytischen Generation angehört. Untersuchungen an pseudogamen *Potentilla* unterschiedlicher Grade an Sexualität haben ergeben, dass die Neigung zur Meiose in Richtung der später gebildeten Zellen abnimmt.

Der Embryosack entsteht aus der chalazalen, das heißt der Mikropyle abgewandten, Embryosackzelle der aus der Meiose der EMZ hervorgegangenen Tetrade, während sich die restlichen drei Zellen zurückbilden. Die zelluläre Ausdifferenzierung des **Embryosacks** findet im Anschluss an die Zellteilungsschritte dessen Entwicklung statt und entspricht dem Polygonum-Typ. In seinem Grundschema besteht der weibliche Gametophyt aus sieben Zellen mit insgesamt acht Zellkernen. Es kommt zur Anlage des aus zwei Synergiden und der von ihnen umgebenen Eizelle bestehenden Eiapparates am mikropylaren Pol, der drei Antipoden am chalazalen Pol, sowie der beiden Polkerne der Zentralzelle. Vereinigen sich die Polkerne vor der Befruchtung wird von einem sekundären Embryosackkern gesprochen. Durch Verschmelzung mit einer der beiden Spermazellen des Pollens entsteht der primäre Endospermkern.

Das **männliche Archespor**, das generative Gewebe der im Querschnitt rechteckigen Anthere, entwickelt sich in deren vier Kanten. Die Pollenurmutterzellen werden nicht zum Archespor gezählt, da sie im Teilungsverhalten typische Eigenschaften vegetativ meristematischer Zellen aufweisen. Erst mehrere mitotische Teilungen später entwickeln sich Tochterzellen der Pollenurmutterzellen zu Pollenmutterzellen (PMZ). Die in der Regel vier haploiden Mikrosporenkerne entspringen den beiden Reduktionsteilungen der Meiose einer PMZ.

Zur Ausbildung des **männlichen Gametophyten** teilt sich der Kern der Mikrospore. Bei dieser sogenannt ersten Pollenkornmitose entstehen eine vegetative und eine vergleichsweise kleine generative Zelle. Pollen der Rosaceae werden in diesem Zweikernstadium ausgeschüttet. In einer späteren zweiten Pollenkornmitose teilt sich die generative Zelle in zwei Spermazellen, wodurch der Pollen dreikernig wird. Kommt der ausgestäubte Pollen auf einer Narbe zu liegen, beginnt er zu keimen, indem sich ein Pollenschlauch ausbildet. Der die beiden Spermazellen führende Pollenschlauch durchwächst den Griffel bis zum Erreichen der Mikropyle des Embryosacks.

(Asker & Jerling 1992 S.49; Graf S.154ff.; Rutishauser 1969; Purves et al. 2002 S.521ff.)

1.2.3 REPRODUKTIONSMECHANISMEN

Der klassische **sexuelle** Weg der Fortpflanzung erfordert doppelte Befruchtung des weiblichen Gametophyten durch die beiden Spermazellen. Hierbei dringt der Pollenschlauch häufig über eine der Synergiden in den Embryosack ein und gibt die Spermazellen ab. Eine von ihnen befruchtet die Eizelle. In der Regel geht ein diploider ($2n$) Keimling aus der sexuellen Reproduktion hervor. Die zweite Spermazelle wandert zu den, den primären Endospermkern darstellenden, Polkernen. Durch Verschmelzung entsteht das meist triploide ($3n$) Endosperm.

Neben dieser üblichen Art der Entstehung von Tochterpflanzen ist bei *Potentilla* und deren Verwandten in verschieden starker Ausprägung die Anlage zu einem oder mehreren Wegen der **asexuellen** Fortpflanzung weit verbreitet. Im Folgenden verwende ich hierfür den Begriff Apomixis im Sinne einer die Blüten involvierenden asexuellen Entwicklung einer Tochtergeneration. Apomixis bezeichnet die Ausbildung eines Embryos ohne dass zuvor eine Reduktionsteilung und Befruchtung stattgefunden hat. Synonym wird der Ausdruck Agamospermie verwendet. Sie kann auch als pseudosexuell beschrieben werden, wobei es allerdings zu Verwechslungen mit dem Spezialfall der Pseudogamie kommen kann. Abgesehen von spontan entstandenen Embryos, die in den bestehenden Embryosack einwandern unterscheidet man zwei Typen apomiktischer Embryosackentstehung: Aposporie und Diplosporie. Diese beiden Wege der Fortpflanzung werden gemeinsam gametophytische Apomixis genannt. In Abgrenzung zur Apogamie, bei der der Embryo aus anderen Zellen des Embryosacks hervorgeht, wird eine asexuelle Fortpflanzung die den Embryo aus einer Eizelle hervorbringt als Parthenogenese bezeichnet. Den unterschiedlichen Definitionen der Pseudogamie ist gemein, dass hier zur Entstehung eines Samens die Polkerne notwendigerweise befruchtet werden müssen, während die Befruchtung der Keimzelle ausbleibt. Ihr steht die induzierte spontane oder autonome Embryogenese gegenüber.

Aposporie bezeichnet das Hervorgehen des Embryosacks aus vegetativen Zellen der Samenanlage. Benannt nach der Gattung bei der der hier vorliegende spezielle Vorgang dieser Gametogenese zuerst beobachtet wurde entstehen apospore Embryonen bei *Potentilla* nach dem *Hieracium*-Typ. Das heißt, die Embryosackentwicklung aus einer eben somatischen Initialzelle entspricht weitgehend jener der sexuellen Fortpflanzung. Das Genom der durch Mitose der Initialzelle entstandenen Embryosackzellen ist jedoch unreduziert. Sie sind genetisch ident mit den Zellen der Mutterpflanze. Im Fall der **Diplosporie** entwickelt sich der Embryosack aus dem generativen Archespor. Im Vergleich zur sexuellen Fortpflanzung findet jedoch keine typische vollständige Meiose statt (Abbruch der Meiose oder Restitutionskernbildung). Auch dieser Weg apomiktischer Gametophytenbildung führt zu unreduzierten, maternalen Embryosackzellen und schließlich Embryonen. Der bei *Potentilla*-Arten gefundene *Antennaria*-Typus lässt sich als reduzierte erste Reduktionsteilung und Ausfallen der zweiten Reduktionsteilung beschreiben. Es entstehen zwei unreduzierte Zellen von

denen eine via Mitosen den achtkernigen Embryosack hervorbringt. Wie der *Hieracium*-Typ der Aposporie stellt auch der *Antennaria*-Typ der Diplosporidie eine Weiterentwicklung des sexuellen *Polygonum*-Typs der Embryosackentstehung dar. Studien an aposporischem Weißdorn (*Crataegus*; Rosaceae, *Spiraeoideae*, Tribus *Pyreae*) ergaben, dass das Verhältnis von maternalem zu paternalem Beitrag zur DNA des Endosperms bei Apomikten nicht 2:1 betragen muss. Das in Samen tetraploider, 4x, Individuen gefundene decaploide, 10x, Endosperm entstammt vermutlich der Verschmelzung einer reduzierten Spermazelle mit zwei unreduzierten Polkernen des Embryosacks (Talent & Dickinson 2007a). Auch die Beteiligung beider Spermazellen an der Bildung des Endosperms eines Apomikten ist möglich (Talent & Dickinson 2007b). Bestäubung durch Pollen entfernt verwandter Arten, sowie männliche Sterilität und Ausweichen auf Pollen von Biotypen anderer Ploidieniveaus zur Initiation der Samenbildung, wie bei *Potentilla collina* beobachtet (Asker & Jerling 1992 S.117), sind weitere Varianten der Vielfalt der apomiktischen bzw. pseudogamen Fortpflanzung.

Angesichts des mehrzelligen Archisporiums bei Rosengewächsen sind hier Grenzfälle in der Unterscheidung von Aposporidie und Diplosporidie beschrieben. Gerade auch bei *Potentilla* existiert ein Übergang von generativen zu benachbarten somatischen Zellen, der mitunter die Möglichkeit einer eindeutigen Zuordnung einschränkt.

Automixis bezeichnet die Embryogenese durch Verschmelzung zweier reduzierter Zellen mütterlichen Ursprungs im Embryosack bzw. über meiotisch rekombinierter jedoch chromosomal unreduzierter EMZ.

Unter Androgenese versteht man eine Art „männlicher Parthenogenese“ bei an sich sexuellen Pflanzen. Hier kommt es zu einem Eindringen der Spermazelle in die Eizelle und einem anschließenden Zugrundegehen des Kerns der Eizelle, sowie dem Entstehen eines haploiden Embryos paternalen Ursprungs. Eine Art bei der Nachkommen potentiell durch Androgenese entstehen könnten ist die diploide *Potentilla argentea*, ein fakultativer Apomikt. *Potentilla argentea* wird gemeinhin als obligater Apomikt betrachtet, jedoch wurde auch bei ihr Sexualität beobachtet (Holm et al 1996a, b, 1997). Die Existenz einer absoluten Bindung an Apomixis als Fortpflanzungsweg erscheint fraglich. Andererseits ergaben embryologische Studien an *Potentilla intermedia* obligate Aposporidie dieser Art. Deren genaue evolutionäre Herkunft, die in einer Kreuzung von *Potentilla argentea* und *Potentilla norvegica* vermutet wird, konnte noch nicht geklärt werden (Asker 1970).

Bei Apomikten ist das Auftreten von **Polyplloidie** und **Hybridisierung** weit verbreitet. Die meisten der Pflanzen die sich über gametophytische Apomixis vermehren weisen polyploide Genome auf, während deren sexuelle Verwandte zumeist diploid sind. Häufig existieren mehrere Niveaus dieser Vervielfältigung des Genoms (Ploidieniveaus) einer apomiktischen Art, entstanden durch Befruchtung einer unreduzierten Eizelle. Haploide Parthenogenese einer polyploiden Art kann wiederum

zu einer Herabsetzung der Genomgröße zu niedrigeren Ploidieniveaus führen. Ein Beispiel hierfür sind hochpolyploide *Potentilla collina* mit einem Chromosomensatz von $2n = 84$, unter deren Nachkommen Individuen mit $2n = 42$ zu finden sind. Es handelt sich um ein häufiges Zusammentreffen, hingegen kann nicht behauptet werden, Polyploidie würde zwingend mit Apomixis in Zusammenhang stehen, da die größere Zahl der Polyploiden sexuell ist. Viele Apomikten sind hybridogenen Ursprungs, aber auch hier ist keine verpflichtende Verknüpfung zulässig. Es gibt hybride Vertreter der Gattung *Potentilla*, die keine Apomikten sind, sowie (selten) nicht hybridogen entstandene Apomikten. Eine Hybridisierung zwischen entfernt verwandten apomiktischen Arten kann bei Arten mit vielzelligem Archospor zu Arten mit vorwiegend oder ausschließlich sexueller Fortpflanzung zurückführen. Auch die Kreuzung von *Potentilla argentea* unterschiedlicher Ploidiestufen untereinander führt mitunter zum Erhalt sexueller Tochterpflanzen.

Allgemein lässt sich über Apomixis sagen, dass es sich um einen Reproduktionsmodus zur weitgehenden Fixierung eines sich bewährenden Genoms handelt. Deren Vorteil könnte weiters in der vergleichsweise raschen Vermehrung ohne Befruchtungspartner liegen. Fakultative Apomixis stellt eine Erweiterung der Fortpflanzungsmöglichkeiten einer Art dar. Während sexuelle Pflanzen in der Regel diploid und deren Apomikten häufig geradzahlig polyploid sind, kommt triploiden sowie aneuploiden trisomischen Individuen wie sie für *Potentilla argentea* im Zusammenhang mit dem Auftreten diploid-tetraploid-haploider Zyklen beschrieben wurden eine Sonderstellung zu. Anorthoploidie spielt auch in anderen Arten der Gattung *Potentilla* eine bedeutende Rolle.

(Asker & Jerling 1992; Rutishauser 1969)

1.2.4 FRÜCHTCHEN

Bei erfolgreicher Befruchtung oder Anregung einer ungeschlechtlichen Embryogenese entsteht aus den zahlreichen Fruchtknoten einer Blüte potentiell je eine Nussfrucht, die als Nüsschen bezeichnet wird. Aber auch eine Bezeichnung als Einblatt-Frucht ist in der Literatur zu finden (Graf S.53). Gemäß der Definition einer Nussfrucht handelt es sich um Schließfrüchte mit trockener Fruchtwand. Da aus einer Blüte mehrere dieser Früchte in Sammelfrucht zusammengefasst hervorgehen, werden die Einzelfrüchte Früchtchen genannt (Fischer et al. 2005 S.101, 103). Die Länge der einzelnen Früchtchen beträgt etwa einen Millimeter. Die Nüsschen können behaart oder unbehaart sein und auch die Farbe und äußere Struktur der Fruchtwand, sowie die Größe des gesamten Früchtchens variieren nach Art. Wolf legte bei seiner Systematik der Potentillen neben der Behaarung besonderes Augenmerk auf die Form der Griffel. Er unterschied gemäß der Form sechs Haupttypen. Anhand derer teilte er die Gattung in Subsektionen ein. Die neuen phylogenetischen Erkenntnisse unterstützen die morphologischen Kriterien Wolfs zur Artumgrenzung sowie der Abgrenzung dieser infragenerischen Gruppen (Wolf

1908), die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen diesen Taxa haben jedoch grundlegende Korrekturen erfahren (Eriksson et al. 1998, Dobeš & Paule 2010).

Bestehend aus zwei Keimblättern und einer Keimwurzel bildet der Embryo das zentrale und weit größte Element des Früchtchens. Typisch für Keimlinge der Rosaceae ist er leicht gekrümmt. Des Weiteren ist vielen Rosengewächsen ein schmales bis als nahezu vernachlässigbar beschriebenes Endosperm zu Eigen. *Potentilla monspeliensis* wurde zur zeichnerischen Dokumentation des als schmal bezeichneten Endosperms ausgewählt. *Potentilla anserina*, *Potentilla palustris* und *Potentilla tridentata* sind Beispiele für Arten deren Embryo von nahezu keinem Endosperm umgeben ist (Martin 1946). In seiner Funktion als Nährgewebe ist die Ausprägung des Endosperms abhängig vom Entwicklungsstadium des Samens. Bei vollentwickelten Samen der Familie Rosaceae ist entweder nur eine dünne Schicht oder gar kein Endosperm mehr zu finden, wie dies bei Pflanzen des Tribus *Potentilleae* Focke der Fall sei (Kalkman in Kubitzki 2004 S.347 & S.366 , Karssen in Kigel et al. 1995 S.345).

2 ZIELSETZUNG DER DIPLOMARBEIT

Eines der Probleme bei der Erforschung des variablen Reproduktionsmodus von *Potentilla sensu lato* (Rosaceae) stellt die in morphologischen Untersuchungen festgestellte im Größenvergleich zum Embryo dürftige Ausprägung des Endosperms als schmale den Embryo umgebende Zone dar (Martin 1946). Anhand eines breit angelegten durchflusszytometrischen Screenings wurde die Durchflusszytometrie aus Saatmaterial extrahierter Zellkerne als geeignete Methode für die Erforschung der Reproduktionswege von Pflanzen bezüglich des Vorliegens einer asexuellen Fortpflanzung etabliert. Hierbei wurden Zellkerne der Samen 32 verschiedener monokotyler und dikotyler Arten isoliert und deren DNA mittels DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gefärbt. Die relative Fluoreszenz der markierten DNA wurde mit einem FACSTAR^{PLUS}-Gerät (Becton-Dickinson) gemessen. Zur Messung kam bei Dikotylen jeweils ein Pool von Zellkernen, die aus bis zu 50 Samen der entsprechenden Art gewonnen wurde. Das Gerät namens PLOIDY ANALYZER der Firma Partec erwies sich ebenfalls als zur Messung der Samen-DNA geeignet. Für *Potentilla argentea* standen Verhältnisse der Genomgröße von Embryo und Endosperm von 2:3 und 2:5 zu erwarten. Im Rahmen dieser Studie konnte keine klare Abgrenzung der die DNA des Embryos respektive des Endosperms anzeigenden Erhebungen im Diagramm (*peaks*) und somit kein Ergebnis erzielt werden (Matzk et al. 2000).

Ziel meiner Diplomarbeit ist es, in Anlehnung an die eben erwähnte Publikation eine geeignete Methode zum durchflusszytometrischen Informationsgewinn zur Reproduktion der Gattung *Potentilla sensu lato* zu erarbeiten, anhand der sich (ungeachtet deren Ploidiestufen $n = a \cdot x$) sexuell entstandene Individuen von aus Apomixis hervorgegangenen Samen unterscheiden lassen. Im Gegensatz zu Matzk et al. werde ich in den einzelnen Proben jeweils lediglich die aus einem Früchtchen extrahierten Zellkerne zur Messung bringen.

Hierbei wird ein Vergleich der Geräte Partec Ploidy Analyser und FACSCalibur (Becton-Dickinson) inklusive der für die beiden Geräte ermittelten Verfahren zur Extraktion und Färbung der DNA angestrebt. Hauptziel ist es für eine möglichst große Zahl von Arten eine zuverlässige Darstellung der Größenverhältnisse der Zellkern-DNA-Gehalte von Embryo und Endosperm zu erlangen, sowie daraus erste Rückschlüsse über deren Reproduktionsweg zu ziehen und deren Deckung mit bisherigen Beobachtungen zu ermitteln.

Ein weiterer Bereich meiner Diplomarbeit werden Untersuchungen zu Morphologie und Anatomie der Nussfrüchtchen sein. Hierbei werde ich von Früchtchen der Arten *Potentilla velutina* und *Potentilla pusilla* mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms zur Mikroskopie geeignete Schnitte herstellen. Diese werden anschließend teils mittels Phloroglucin-Salzsäure oder Safranin und Astrablau gefärbt in Euparal® fixiert. Daraus plane ich eine makroskopische Übersicht über ein Nüsschen im Längsschnitt zu

erstellen, aus der unter anderem Information über die Größe des Embryos und des Endosperms, sowie zur Abgrenzung der einzelnen Schichten des Früchtchens gewonnen werden soll. Fotos von Ausschnitten der Präparate in verschiedenen Vergrößerungen und einzelne anatomische Zeichnungen sollen beiträgend Aufschluss über die unterschiedlichen Gewebearten geben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Als Träger des meisten Erbmaterials ist der Zellkern von besonderem Interesse für die Erforschung der pflanzlichen Phylogenie und Reproduktion. Der Ersatz enzymatischer Isolation durch Homogenisierung des Gewebes mittels Rasierklingen zur Gewinnung der Zellkerne, sowie die Möglichkeit die darin enthaltene DNA selektiv und stöchiometrisch mittels Fluorochromen zu färben ließen die Durchflusszytometrie zur Methode der Wahl werden, um den DNA-Gehalt der Zellkerne zu messen. Gemessen wird die relative Intensität der Fluoreszenz. Die Möglichkeit den Side Scatter als weiteren Parameter mitzubestimmen und eine Video-Kontrolle des Probenflusses gelten als empfehlenswert. Die gleichzeitige Messung der DNA von Embryo und Endosperm eines Samens ermöglicht Rückschlüsse auf dessen reproduktive Entstehung (Doležel et al. 2007; Doležel et al. 2007 in: Doležel et al 2007). Um Begriffsverwechslungen mit mikroskopischen Methoden der Karyotypisierung (Suda et al. 2006) zu vermeiden möchte ich betonen, dass sich meine Arbeit rein auf die durchflusszytometrisch gemessene Intensität der Gesamtfluoreszenz der einzelnen Zellkerne bezieht.

Das von mir verwendete Saatmaterial stammt aus Wildsammlungen und Botanischen Gärten. Es besteht vor allem aus Früchtchen deutscher Populationen. Die für meine Messungen getroffene Auswahl umfasst nach derzeitiger Bestimmung 47 Arten, die vier verschiedenen Gattungen der Gattung *Potentilla sensu lato* zugeordnet sind, sowie bei einigen Arten Populationen unterschiedlicher Standorte und Unterarten. In Summe setzt sich mein Probenmaterial aus den Früchtchen 80 getrennter Populationen zusammen. Zu den Früchtchen der einzelnen Arten und Standorten existiert Herbarmaterial dessen taxonomische Zuordnung unter Umständen Revision bedarf.

Zur **Probenvorbereitung** werden die Nüsschen einzeln in eine Petrischale (5,5 cm Durchmesser) gelegt, mit einer Rasierklinge (Wilkinson, Astra) der Breite nach halbiert und durch ein Binokular der Keimling beurteilt. Nur Früchtchen deren Same voll entwickelt ist werden als Probenmaterial ausgewählt. Die Kriterien sind, dass Embryo und Endosperm das Innere des Früchtchens ausfüllen, fleischig sind und beige bis grau schimmern. Außenfarbe und Beschaffenheit der Fruchtwand wird hierbei keine Beachtung geschenkt. Pro Population (Materialnummer) und Gerät werden zwei Proben aufbereitet, pro Probe werden die Zellkerne eines Früchtchens extrahiert. Die beiden Klingen einer Rasierklinge zu trennen und des Weiteren die Länge der Schneide zu halbieren erleichtert die Handhabung.

Die Extraktion der Zellkerne erfolgt mittels Seed-Buffer und unterscheidet sich ob der unterschiedlichen Fluorochrome leicht für die beiden verwendeten Durchflusszytometer.

Zusammensetzung des Seed-Buffers (200 ml)

0,21 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O (Fluka)
1,0 g	NaCl (Roth)
2,42 g	Tris (Roth)
0,18 g	Triton-X-100 (Merck)
1,8 g	Na-Citrat x 2H ₂ O

Die eingewogenen Substanzen werden in destilliertem Wasser gelöst. Mittels HCl conc. wird die Lösung auf pH7 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Anschließend wird der fertige Buffer durch einen Spritzenfilter (Porengröße 20 µm) filtriert und gekühlt aufbewahrt. (modifiziert nach Matzk et al. 2001)

Fluorochrom	Bindungsmodus	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- wellenlänge (nm)	Geeignete Anregung
Propidium- Iodid	Interkalation, unselektiv	538	617	Ar ⁺ -Laser (488nm) grüner Festkörperlaser (532 nm)
4',6-diamidino- 2-phenylindol	AT-selektiv	359	461	Bogenlampe (UV-Spektrum)

Tabelle 1 Fluorochrome nach Doležel et al. 2007

3.1.1 PLOIDY ANALYSER (PARTEC)

Der Ploidy Analyser (partec) ist ein speziell für die Anwendung in Botanik und Agrarwissenschaften entwickeltes Durchflusszytometer. Die Tastatur zur Einstellung und Steuerung sowie ein Bildschirm zur Beobachtung laufender Messungen sind in das Gerät integriert. Als Hüllstrom und zum Spülen der Kapillare zwischen den Messungen dient bidestilliertes Wasser. Der für meine Messungen zur Verfügung stehende Ploidy Analyser enthält eine HBO Quecksilberdampfampe als anregende Lichtquelle. Dementsprechend ist hier DAPI das Fluorochrom der Wahl zur Markierung der in den einzelnen Zellkernen enthaltenen DNA.



Abbildung 1 partec Ploidy Analyser

Histogram Resolution	512
Sample Prerun Time	2,00 sec
Clean Time	5,00 sec.
Display	1 Parameter
Peak Analysis	ON
Auto File Storage	ON
Data Storage	HIST
Transfer Type	FCS
All other settings	OFF
Software Version	CA3 1.315 9/1998
GAIN	nach Bedarf variiert
RATE	etwa 10/sec.
L-L (lower level)	variiert, ab 10

Tabelle 2 Geräteeinstellungen Ploidy Analyser

Das Fluorochrom DAPI ist dem Isolationspuffer bereits bei der Zubereitung zuzufügen. Auf 200 ml Buffer kommen 0,2 mg DAPI (2 ml DAPI stock solution, 10 mg/ 100 ml).

In der weitem **Probenvorbereitung** werden die zur Messung ausgewählten Früchtchen mit je 1 ml Isolationspuffer versetzt. Das entspricht 2µg DAPI pro Probe. Mit der (geviertelten) Rasierklinge wird das Früchtchen zerkleinert. Nach dem Zerkleinern wird die Probe ein paar Minuten stehen gelassen. Für jede Probe wird eine frische Klinge verwendet. Anschließend wird der die markierten Zellkerne enthaltende Puffer mit Hilfe eines CellTrics[®]-Filters (Maschenweite 20 µm) in ein Rundboden-Plastik-Messröhrchen abgetrennt und die Probelösung zur Messung gebracht.

3.1.2 FACSCALIBUR (BECTON, DICKINSON AND COMPANY)

Das Durchflusszytometer BD FACSCalibur[™] wurde zur Anwendung in weiten Bereichen der biomedizinischen Forschung und Klinik entwickelt. Es handelt sich um ein Multiparametersystem. Die Anregung der Fluoreszenz geschieht durch zwei Laser, einem Argon-Laser (488 nm) und einem roten Dioden-Laser (etwa 635 nm) (Becton, Dickinson and Company 2009). Die Steuerung und Aufzeichnung der Messungen erfolgt weitgehend über einen dem Gerät angeschlossenen Macintosh[®] Computer und die Software BD CellQuest[™] Pro v.5.2.1, mit der die erhaltenen Messdaten auch ausgewertet werden. Das verwendete Fluorochrom ist Propidiumiodid (PI). Gemessen werden Kanal P-2 (SideScatter (SSC)) und Kanal P4 (FL 2) in linearem Modus mit den in nachfolgender Tabelle angeführten weiteren Einstellungen (instrument settings).

Kanal	Detektor	Voltage	AmpGain	Threshold
P1	FSC	E00	8,31	Primary Parameter: P2
P2	SSC	520	1,0	Value: 52
P3	FL1	600	1,0	<u>Compensation:</u> -
P4	FL2	500	1,0	
P5	FL3	650	1,0	

Tabelle 3 Geräteeinstellungen BD FACSCalibur

Den Zufluss des den Hüllstrom bildenden FACS-Puffers sowie dessen Abfluss gemeinsam mit der gemessenen Probe bewerkstelligt das FACSCFlow[™] Supply System. Als am Gerät selbst einzustellende Flussgeschwindigkeit wird *lo* gewählt.

Zusammensetzung des FACS-Puffers (5 l):

40,6 g	NaCl
1,3 g	KH ₂ PO ₄
11,75 g	Na ₂ HPO ₄
1,4 g	KCl
2,15 g	LiCl
1,0 g	NaN ₃
1,8 g	Na-EDTA

pH 7,37; sterilfiltriert

Die **Isolation** der Nuklei des Embryos sowie des Endosperms aus den Nüsschen erfolgt für die Messung durch das BD FACSCalibur mit Isolationspuffer wie er oben beschrieben wurde ohne Fluorochromzusatz. Pro Nüsschen werden 0,5 ml Isolationspuffer verwendet. Das Zerkleinern und Abfiltrieren der in den Puffer extrahierten Nuklei wird in gleicher Weise durchgeführt wie zur Analyse durch den Ploidy Analyser. Allerdings erfolgt hier die Filtration in Eppendorfgefäße und den Proben wird in einem Zwischenschritt je 20 µl RNase stock solution (3 mg/ml) zugefügt, um Fehler durch in RNA interkalierendes Propidiumiodid zu vermeiden. Inkubiert wird etwa 40 min bei 30°C. 15 Minuten bis ein paar Stunden vor der Messung wird abschließend das Flourochrom hinzugegeben. Jede Probe wird mit 50 µl PI stock solution (1 µg/µl) versetzt und zur Messung in ein Rundboden-Plastikmessröhrchen überführt.



Abbildung 2 BD FACSCalibur

3.1.3 AUSWERTUNG

In einer Darstellung der relativen Intensität der Fluoreszenz gegen die Zahl der detektierten Kerne ergeben sich im Histogramm Erhebungen, *peaks*, deren mittlere Fluoreszenzwerte im Verhältnis den Mengen an DNA in den Zellkernen der Früchtchen entsprechen. Für Embryos ist das in der Regel $2n$, für Endosperm stehen je nach zugrundeliegendem Fortpflanzungsmodus $3n$ oder $5n$ zu erwarten. Da es sich um mitotisch aktives Gewebe handelt, sind Peak-Paare der Gestalt $2C - 4C$ und $3C - 6C$ beziehungsweise $5C - 10C$ als Abbild vorliegender G2-Phasen der entsprechenden Zellkerne möglich (Greilhuber et al. in Doležel et al. 2007). Die absoluten Werte der Messungen, die von der als C-value angegebenen Genomgröße sowie der Feineinstellung des Durchflusszytometers abhängen, sind für diese Untersuchung nicht maßgeblich. Auch ist die Verwendung eines Standards hier nicht nötig.

Für den **Ploidy Analyzer** erfolgt die Datenauswertung über das Computerprogramm FloMax Software© Version 2.4d. Die Daten der einzelnen Messungen werden in das vorgegebene Histogramm-Schema geladen und die Peaks über die Funktion Gating Region Range entlang der Abszisse eingegrenzt. Zur Berechnung der Verhältnisse der Genomgrößen der Zellkerne von Embryo und Endosperm werden die Mittelwerte (Mean-X) der so entstandenen Bereiche (RN1, RN2, ...) entlang der Fluoreszenz-Skala herangezogen.

Zur Auswertung der durch das **FACSCalibur** gewonnen Daten ist ausschlaggebend, dass sowohl Fluoreszenz als auch SideScatter bestimmt wurden. Zunächst werden die Daten in einen DotPlot geladen, der die Fluoreszenz (Abszisse) gegen den Side Scatter (Ordinate) zeigt. In dieser Darstellung werden Häufungen von Messpunkten umgrenzt und als Regions (R1, R2, ...) definiert. Zur Kontrolle der Regionen werden diese in eine Histogrammdarstellung, Fluoreszenz gegen Zahl der Detektionen, der gesamten Messung kopiert. Ein DensityPlot der Messung kann bei der Orientierung hilfreich sein. Aus einer Statistik der innerhalb der definierten Bereiche liegenden Messungen lassen sich die Mittelwerte X-Mean der einzelnen Regions ablesen, die zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Bei beiden Messgeräten sind es die Verhältniszahlen der Fluoreszenzwerte von Embryo- und Endosperm-DNA aus denen Rückschlüsse auf den jeweiligen Fortpflanzungsmodus der Individuen im Hinblick auf die unterschiedlichen Arten gezogen werden. Da pro Gerät und Art nur zwei Individuen gemessen werden, kann die Auswertung rein deskriptiv und orientierend sein (Greilhuber et al. in Doležel et al. 2007). Der CV (Coefficient of variation), angegeben in Prozent, dient als Qualitätsmerkmal der einzelnen Peaks.

3.2 MIKROSKOPIE

Die **Schnitte** zur Mikroskopie der Früchtchen werden mittels Rotationsmikrotom (Microm HM 325) gefertigt. Hierfür werden je zwei bis drei Früchtchen zur chemischen Fixierung in einen Block Kunstharz (Fixiermedium + Härter I & II) gegossen, der auf ein Tischchen aus Hartplastik geklebt wird.

Zusammensetzung des Fixiermediums (FAA – Formaldehyd, Acetic acid, Alcohol):

Ethanol (70%)	700ml
Formaldehyd (40%)	200ml
Eisessig	100ml

Vor dem Einbetten werden die Früchtchen im Exsiccator entlüftet und zur besseren Durchdringung vorsichtig mit einer Insektennadel angestochen. .

Die fertigen Präparate werden unmittelbar vor dem Schneiden erwärmt und das Harz so eng um die Früchtchen wie möglich und nach unten spitz zulaufend zurechtgeschnitten. Anschließend werden die Proben senkrecht in das Mikrotom eingespannt. Die Schnittfläche wird mit destilliertem Wasser befeuchtet. Harz und Früchtchen werden an der Schnittfläche leicht feucht gehalten und durch regelmäßig zügiges Drehen der Kurbel nicht zu rasch über die Klinge gezogen. Die Schnitte werden mit einer feinen Pinzette in einen Tropfen destilliertes Wasser auf einen entfetteten Objektträger gelegt. Hier können sie falls erforderlich mit feinen Präpariernadeln von anhaftendem Kunstharz befreit und in eine geeignetere Lage gedreht werden. Auf dem Objektträger fixiert werden die Schnitte durch Trocknen auf einer etwa 70°C heißen Heizplatte. Die fixierten Objekte können gefärbt werden.



Abbildung 3 Arbeitsplatz Mikrotom

Klinge C; symmetrisch

Klingenneigung 9

Schnittdicke 5 – 10 µm

Tabelle 4 Microm HM 325 Einstellungen

Phloroglucinol-Salzsäure-Färbung

Phloroglucin färbt verholzte Zellwände (Lignin) rosa.

Reagenzien: Phloroglucinol-Lösung; 2N HCl; destilliertes Wasser.

Durchführung: Auf die zu färbenden Objekte wird wenig Phloroglucinol-Lösung aufgebracht und ein paar Minuten einwirken gelassen. Danach wird ein wenig 2n HCl zugetropft. Die Färbelösung wird mit saugfähigem Papier von den Objekten gezogen und die gefärbten Objekte mit ein paar Tropfen Wasser gewaschen, die wiederum von der Seite abgesaugt werden.

Safranin-Astrablau-Färbung

Unverholzte Zellwände werden durch Astrablau blau, verholzte Zellwände durch Safranin rosa bis rot gefärbt.

Reagenzien: 0,5% Astra-Blau in 0,5%iger Essigsäure; 0,5%ige Safraninlösung (wässrig); destilliertes Wasser.

Durchführung: Die beiden Färbelösungen werden gemischt, sodass etwa 25 Teile Astrablau-Lösung auf einen Teil Safraninlösung kommen. Die Objekte werden für ein paar Minuten in ein Bad dieser Mischung gelegt. Danach wird überschüssiger Farbstoff vorsichtig mit destilliertem Wasser vom Objektträger gespült.

(Braune et al. 1994)

Die getrockneten Objekte werden als Dauerpräparate in Euparal® gebettet und mit einem Deckglas geeigneter Größe bedeckt. **Mikroskopiert** werden die fertigen Dauerpräparate.



Abbildung 4 Arbeitsplatz Mikroskop

Mikroskop	Nikon Optiphot-2
Kamerasystem	Nikon DS-5M-L1
Okular	10x
Objektive	2x; 4x; 10x; 20x; 40x; 60x

Tabelle 5 Nikon Mikroskop – Daten

Überblicke ganzer Schnitte sowie Ausschnitte einzelner Objekte werden in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert. Anatomische Zeichnungen werden entweder frei Hand oder mit Hilfe eines Zeichentubus angefertigt. Anhand von Fotos geringer vergrößerter (Längs-)Schnitte wird eine makroskopische Darstellung des Schichtbaus der Früchtchen erstellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die nach den im vorangehenden Kapitel ausführlich beschriebenen Methoden durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen haben eine Messbarkeit der Zellkern-DNA des Embryos sowie Endosperms für viele, aber nicht alle gemessenen Populationen ergeben. Über die Bestimmung der Mittelwerte der Fluoreszenz und deren Verhältnis konnten für sexuelle Arten beziehungsweise Individuen Werte um 1,5 berechnet werden. Das entspricht einem erwarteten Verhältnis der Zellkern-DNA-Gehalte von 2:3 für einen $2n$ Embryo und ein $3n$ Endosperm, die aus der doppelten Befruchtung hervorgegangen sind. Einige bekannt apomiktische Arten konnten mit Verhältniswerten von etwa 2,5 bis 3,5 eindeutig als solche identifiziert werden. Die Ergebnisse ein paar einzelner Messungen sind nicht den Erwartungen entsprechend oder aufgrund von Mehrdeutigkeit gesondert zu besprechen. Bei nicht auswertbaren Messungen konnte zumeist lediglich eine gehäufte Fluoreszenz einer Intensität beobachtet werden. Diese ist vermutlich der DNA der embryonalen Zellkerne zuzuordnen. Das Fehlen eines zweiten *peaks* deutet auf eine vergleichsweise geringe Ausbildung oder ein Fehlen des Endosperms hin. Bei manchen – fraglich – apomiktischen Früchtchen setzt sich der Fluoreszenzwert für das Endosperm aus der Vermessung von nur circa 20 Zellkernen zusammen. Durch die Messung von mindestens zwei Individuen einer Population pro Gerät ließen sich lediglich für drei Populationen jeweils an einem Gerät keine Häufungen von gemessener Fluoreszenz erkennen (*Potentilla nitida* L. (FACSCalibur), *Potentilla valderia* L. (Ploidy Analyser) *Potentilla villosa* (FACSCalibur)). Die besagten Populationen von *Potentilla nitida* und *Potentilla valderia* konnten am jeweils anderen Gerät durch Messung dreier respektive zweier Individuen als sexuell bestimmt werden. Eine auswertbare Messung von *Potentilla villosa* am Ploidy Analyser deutet auf das Vorliegen von Apomixis hin. Gelegentlich treten *peaks* auf die im Fluoreszenz-Verhältnis von 2:1 zu einem (zahlenmäßig prominenten) dem Embryo zugeordneten *peak* stehen. Diese werden als G2-Phase mitotischer Zellkerne des embryonalen Gewebes gewertet und scheinen, sofern sie eindeutig sind, nicht in der Übersicht aus den Messungen bestimmter Verhältniswerte auf, wie auch vereinzelt messbare G2-Phasen endospermaler Zellkerne. Die in der Regel eindeutige Zuordenbarkeit G2-Phasen indizierender Fluoreszenzhäufungen unterstützt die Zuverlässigkeit der Methode. Bisweilen starke Fluoreszenz im Hintergrund erschwert bei einigen Proben das Eingrenzen der Messwerte und den Erhalt eines entsprechend richtigen Mittelwerts aus den ausgewählten Bereichen. Die allermeisten Populationen wiesen eine gute Qualität der Früchtchen auf. Häufig genügten zwei bis drei Früchtchen, um zwei Früchtchen zur Messung zu bringen. Eine Population, *Potentilla erecta* (L.) Rauschel Materialnummer

Ptl2889, wurde wegen der sichtbar schlechten Qualität von 10 geöffneten leeren Früchtchen nicht zur Messung gebracht.

Der coefficient of variation (CV; Variationskoeffizient) für am Ploidy Analyser durchgeführte, in vollem Umfang auswertbare Messungen liegt bei Werten des Embryos häufig um 9. Jedoch gibt es auch zahlreiche Messungen deren CV der embryonalen Zellkerne bei etwa 5 liegt. Die Messungen durch das FACSCalibur weisen folgende relative Standardabweichung der von Hand in einer zweiparametrischen Darstellung (SideScatter gegen Fluoreszenz) eingegrenzten *peaks* auf: Für Endospermzellkernen zugeordnete Messungen ergibt sich ein CV von etwa 3. Für *peaks* embryonaler Zellkerne schwankt der CV zwischen 2,16 und 8,73 mit zahlreichen Messungen um einen CV von 4,5. Der CV dem Endosperm zugeordneter Fluoreszenzhäufung liegt zumeist zwischen 3 und 4.

4.1.1 METHODENENTWICKLUNG DURCHFLUSSZYTOMETRIE

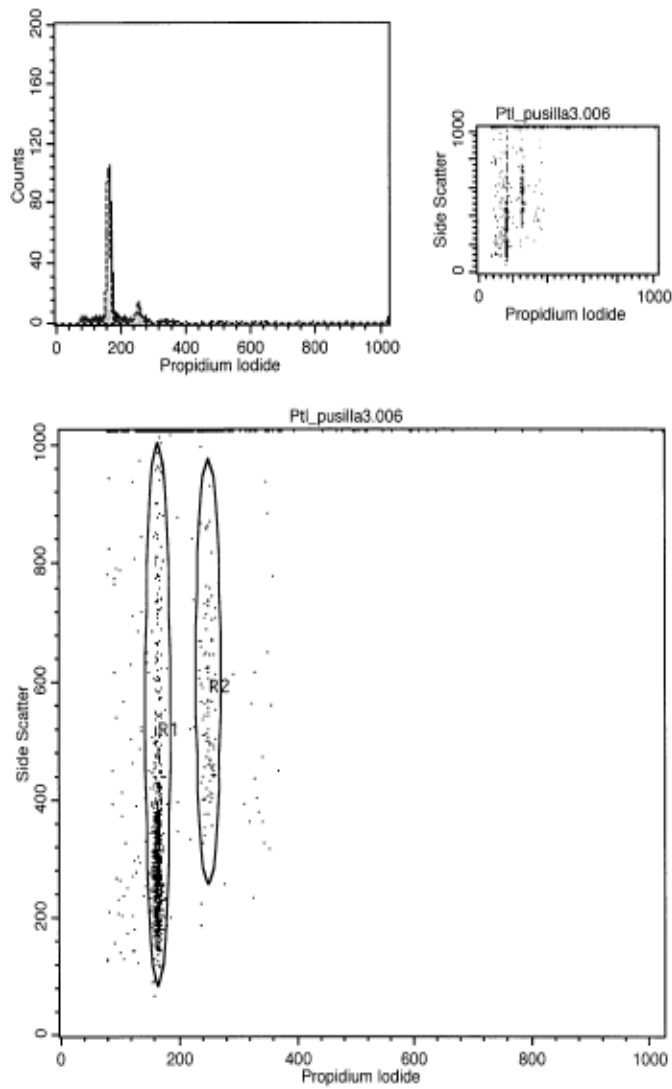
Eine erfolgreiche Messung erfordert ersten Versuchen am Ploidy Analyser zufolge vitale Samen als Ausgangsmaterial. Als zur Auswahl geeignet hat sich ein Aufschneiden der einzelnen Früchtchen im Querschnitt und optische Beurteilung des Embryos und Endosperm durch ein Binokular erwiesen. Das Innere eines Früchtchens sollte ausgefüllt sein von fleischigem Gewebe, das matt weiß, beige oder grau glänzt. Bisweilen lässt sich ein rosa Häutchen erkennen, das den Embryo und das Nährgewebe durchgehend anliegend umgibt. Ungeeignete Früchtchen weisen ein Inneres auf, das die Schale nicht ausfüllt. Häufig wirken Embryo und Endosperm angetrocknet bis ganz trocken. Auch ist bei diesem vermutlich nicht gesunden Keimgewebe öfters ein grau-grünes umgebendes Häutchen zu finden.

Ergebnisse von Messungen bei denen durch Entfernung der Fruchtwand vor der Zerkleinerung und Isolation der Zellkerne nur der Same verwendet wurde sind mit denen ganzer Früchtchen vergleichbar. Die Durchflusszytometrie des Isolats der parallel aufgearbeiteten Fruchtwände führte zu keiner Detektion von Fluoreszenz. Daraus ergibt sich, dass die Isolation der Zellkerne aus zerkleinerten ganzen Früchtchen erfolgen kann. Unreife Früchtchen deren Wand noch grün war haben sich den Messergebnissen meiner Proben der Arten *Potentilla chinensis* Ser. und *Potentilla hyparctica* Malte zufolge ebenfalls als verwendbar herausgestellt.

Aus einem Früchtchen können ausreichend Zellkerne erhalten werden, um eine Messung durchzuführen. Somit kann eine Probe einem Individuum entsprechen. Durch das Poolen von 4 bis 6 Früchtchen konnte am Ploidy Analyser in einzelnen Versuchen keine Verbesserung der Messung erzielt werden.

Aus mehreren getesteten Isolationspuffern (Otto I+II, Zitronensäure-Triton®-X-100-Buffer und Seed-Buffer) hat sich für beide Geräte, Ploidy Analyser und FACSCalibur, die Verwendung des modifizierten Seed-Buffers als einzig zielführend erwiesen. DAPI

muss bereits vor der Isolation und kann nicht knapp vor der Messung der fertig vorbereiteten Probe zugefügt werden. Das Homogenisieren der Früchtchen wird erleichtert wenn die Klängen einer Doppelklinge getrennt und in der Länge halbiert werden. Ein Stehenlassen der im Seed-Buffer (inklusive DAPI) zerkleinerten Früchtchen vor dem Filtrieren für 5 bis 10 Minuten verbessert meiner Beobachtung nach die Qualität durch den Ploidy Analyser bewerkstelligter Messungen. Die Probenvorbereitung benötigt durch den Zwischenschritt des RNase-Verdaus mehr Zeit. Dadurch sowie durch die aufwändigere Einschalt-Routine empfiehlt sich, alle Proben eines Tages parallel vorzubereiten. Etwa 25 Proben sind auf diesem Weg an einem Tag bewältigbar. Das spätere zufügen des Fluorochroms Propidiumiodid zu den fertig vorbereiteten Proben mindestens 15 Minuten vor der Messung ist problemlos. Über Nacht können sie im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei einmaligem Versuch der erneuten Messung derselben Proben am Folgetag konnte ich dadurch keine Änderung der Qualität der Messungen beobachten.



Region Statistics

File: PtI_pusilla3.006 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PtI_pusilla3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 06-Oct-09 Gate: No Gate
 Gated Events: 1500 Total Events: 1500
 X Parameter: Propidium iodide (Linear) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px/Py
R1	955	63.67	63.67	163.53	163.47	326.09	300.08	2, 1
R2	100	6.67	6.67	249.99	249.89	562.42	546.35	2, 1

Abbildung 5 Beispiel eines Auswertungsblattes FACSCalibur, *Potentilla pusilla*

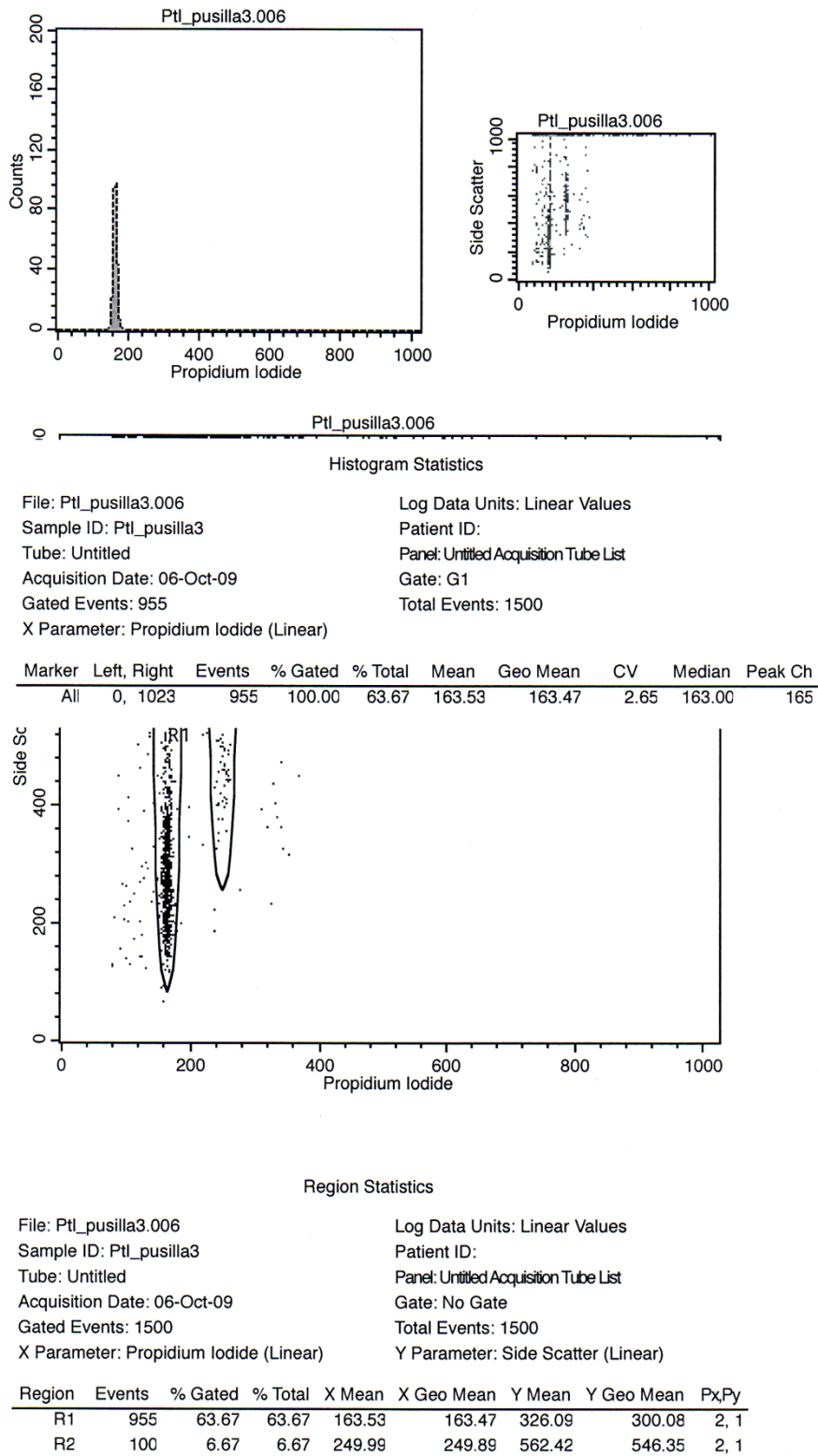
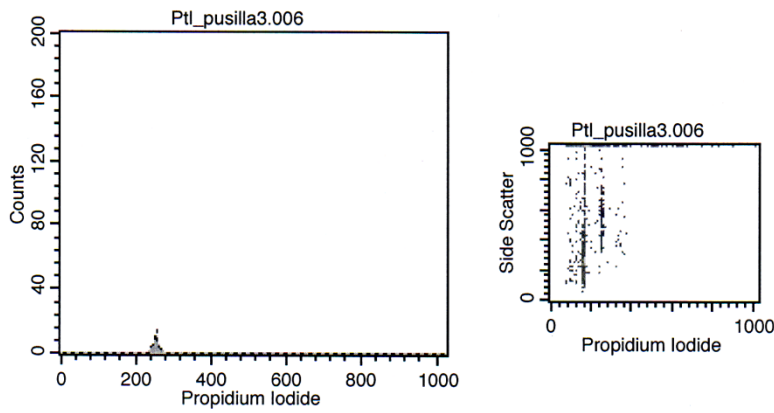


Abbildung 6 Auswertungsblatt FACSCalibur a; *Potentilla pusilla*

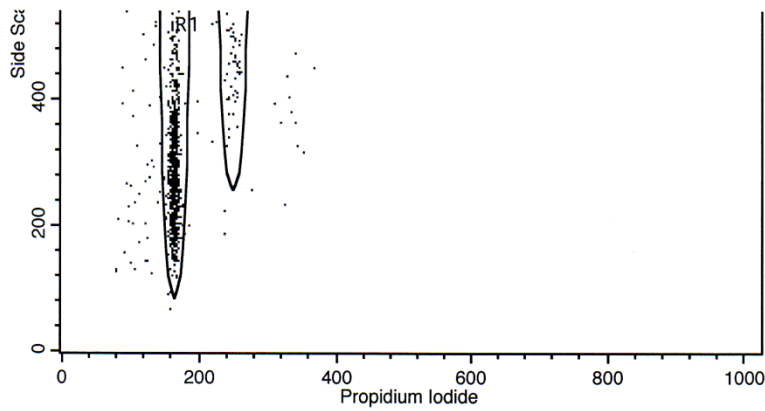


PtI_pusilla3.006

Histogram Statistics

File: PtI_pusilla3.006 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PtI_pusilla3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 06-Oct-09 Gate: G2
 Gated Events: 100 Total Events: 1500
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	100	100.00	6.67	249.99	249.89	2.85	251.00	251



Region Statistics

File: PtI_pusilla3.006 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PtI_pusilla3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 06-Oct-09 Gate: No Gate
 Gated Events: 1500 Total Events: 1500
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	955	63.67	63.67	163.53	163.47	326.09	300.08	2, 1
R2	100	6.67	6.67	249.99	249.89	562.42	546.35	2, 1

Abbildung 7 Auswertungsblatt FACSCalibur b; *Potentilla pusilla*

4.1.2 DATENÜBERSICHT DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die folgenden Tabellen stellen eine Auflistung der Resultate der einzelnen durchflusszytometrischen Messungen dar. Die Ergebnisse der am Ploidy Analyser durchgeführten Messungen finden sich geordnet nach Taxa und Materialnummer der Populationen in

Tabelle 6 Übersicht Verhältniswerte Ploidy Analyser⁴. Ergebnisse der Messungen durch das Gerät FACSCalibur sind entsprechend in Tabelle 7 Übersicht Verhältniswerte FACSCalibur, Früchtchenqualität⁴ verzeichnet. Diese Tabelle enthält auch Angaben zur Früchtchenqualität der einzelnen Populationen in Form einer Gegenüberstellung der Zahlen letztendlich verwendeter und nach optischer Beurteilung als ungeeignet verworfener Früchtchen. Es handelt sich bis auf wenige Arten, bei denen Angaben aus Einzelmessungen am Ploidy Analyser hinzugefügt wurden, um parallel zur am FACSCalibur durchgeführten Messreihe aufgezeichnete Beobachtungen.

Aufgeführt sind die Verhältniswerte der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität der dem Embryo und dem Endosperm jeweils zugeordneten Fluoreszenzhäufungen. Einzelne Werte entspringen dem Verhältnis zweier nicht eindeutig zugeordneter *peaks*. Diese werden nachfolgend gesondert besprochen. Daten als sexuell bewerteter Individuen sind durch rote Schriftfarbe gekennzeichnet, Daten vermutlicher Apomikten durch blaue. Konnte ich Daten nicht zuordnen, sind diese in schwarzer Schriftfarbe gehalten. Für Populationen bei deren Messung am betreffenden Gerät höchstens eine dem Embryo zugeordnete Fluoreszenz eingegrenzt werden konnte, ist dies als „Em“ vermerkt, konnten für eine Population keine *peaks* gemessen werden, so ist das explizit eingetragen als „kein Ergebnis“. Leere Zellen bedeuten, dass für die betreffende Population an diesem Gerät keine Messung durchgeführt wurde. Des Weiteren ist festgehalten bei welchen Messungen die exakte Abgrenzung einzelner *peaks* durch starke Hintergrundfluoreszenz erschwert wurde („viel Hintergrund“), und wenn, wie vor allem bei Apomikten beobachtet, sich der dem Endosperm zugeordnete *peak* aus der Fluoreszenz weniger Zellkerne zusammensetzt („En gering“). Entsprechen einander errechnete Verhältnisse einiger Messungen schlechter Qualität und liegt keine eindeutig auswertbare Messung der betreffenden Population vor, sind diese Daten in einem Wert zusammengefasst, der als ungefähre Angabe („um“) eingetragen ist.

Tabelle 6 Übersicht Verhältniswerte Ploidy Analyser

Art	Materialnummer	Verhältniswerte Ploidy Analyser
Drymocallis geoides M.Bieb.	Ptl2755	Em
Drymocallis geoides M.Bieb.	Ptl2895	En gering 3,01 En gering 3,22
Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa (Lindl.) Rydb.	Ptl2710	Em
Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa (Lindl.) Rydb.	Ptl2756	1,64 1,57

Drymocallis rupestris (L.) Soják	Ptl2905	1,65
Drymocallis rupestris (L.) Soják	Ptl2920	um 1,64
Farinopsis salesoviana (Steph.) Chrtek & Soják (= Potentilla salesoviana Steph.)	Ptl2830	Em
Potentilla (Argentina) leuconota D. Don.	Ptl2706	1,59 1,61 1,6
Potentilla adscharica Sommier & Levier ex R.Keller	Ptl2868	viel Hintergrund 1,52
Potentilla alchemilloides Lapeyr.	Ptl2703	um 1,45
Potentilla argentea L.	Ptl2712	
Potentilla argentea var. calabra (Ten.) Fiori & Paol.	Ptl2801	1,54
Potentilla atosanguinea Lodd. ex. D.Don.	Ptl2810	1,49 1,57 1,56 1,68 1,53
Potentilla aurea L.	Ptl2935	1,52 1,52 1,53
Potentilla aurea L.	Ptl2941	1,53 1,59 1,52 1,51
Potentilla calabra Ten.	Ptl2708	Em
Potentilla carniolica Kern.	Ptl2858	3,02
Potentilla caulescens L.	Ptl2785	1,51 1,45
Potentilla caulescens L.	Ptl2880	Em
Potentilla chinensis Ser.	Ptl2723	1,65
Potentilla clusiana Jacq.	Ptl2786	1,51 1,55 1,6
Potentilla crantzii (Crantz) Beck		Em
Potentilla crantzii (Crantz) Beck ex Fritsch	Ptl2709	
Potentilla crantzii (Crantz) Beck ex Fritsch	Ptl2820	
Potentilla delphinensis Gren. & Godr.	Ptl2851	Em
Potentilla erecta (L.) Räuschel	Ptl2894	Em
Potentilla fissa Nutt.	Ptl2726	Em
Potentilla gracilis Dougl. ex Hook	Ptl2944	Em
Potentilla gracilis var. fastigiata	Ptl2711	1,72 & 10,13

(Nutt.) S.Wats.		
Potentilla gracilis var. glabrata (Lehm.) Hitchc.	Ptl2888	
Potentilla grandiflora L.	Ptl2892	1,57 1,53 1,59
Potentilla grandiflora L.	Ptl2897	Em
Potentilla hippiana Lehm.	Ptl2758	3,12 1,74
Potentilla hippiana Lehm.	Ptl2930	3,15
Potentilla hyparctica Malte	Ptl2842	1,61 1,57
Potentilla incana Gaertn. Mey. & Scherb.	Ptl2659	
Potentilla longifolia Willd. ex Schlecht.	Ptl2862	1,54
Potentilla megalantha Takeda	Ptl2660	1,56 1,47 1,53
Potentilla megalantha Takeda	Ptl2843	Em
Potentilla multifida L.	Ptl2729	3,44 3,35
Potentilla multifida L.	Ptl2741	4,23 3,32 2,63
Potentilla nitida L.	Ptl2969	1,54 1,53 1,53
Potentilla norvegica L.	Ptl2714	Em
Potentilla norvegica L.	Ptl2948	Em
Potentilla nuttallii Lehm.	Ptl2655	Em
Potentilla ornithopoda Tausch	Ptl2715	3,54 3,51 3,95
Potentilla ornithopoda Tausch	Ptl2716	3,47 3,47 3,41
Potentilla pensylvanica L.	Ptl2656	Em
Potentilla pensylvanica Welsh. & Johnston	Ptl2765	viel Hintergrund 1,62 viel Hintergrund 1,64
Potentilla pulcherrima Lehm.	Ptl2718	En gering 3,33 En gering 3,24
Potentilla pusilla Host	Ptl7143	
Potentilla pusilla Host	Ptl7144	um 1,57
Potentilla pusilla Host	Ptl7145	
Potentilla pusilla Host	Ptl7146	
Potentilla pyrenaica Ram. ex DC.	Ptl2919	

Potentilla pyrenaica Ram. ex DC.	Ptl2950	Em
Potentilla recta L.	Ptl2719	
Potentilla recta L.	Ptl2771	
Potentilla recta L.	Ptl2772	Em
Potentilla recta L.	Ptl2811	
Potentilla recta L.	Ptl2879	
Potentilla recta L.	Ptl2912	
Potentilla recta L.	Ptl2929	Em
Potentilla speciosa Willd.	Ptl2661	1,5 1,47
Potentilla speciosa Willd.	Ptl2670	viel Hintergrund 1,64 1,63
Potentilla sterilis (L.) Garcke	Ptl2788	
Potentilla supina L. ssp. supina	Ptl2787	1,49
Potentilla supina L. ssp. supina	Ptl2887	um 1,54
Potentilla thurberi A.Gray ex Lehm.	Ptl2699	Em
Potentilla thuringiaca Bernh.	Ptl2720	Em
Potentilla thuringiaca Bernh.	Ptl2917	
Potentilla umbrosa Stev.	Ptl2721	1,56 1,54
Potentilla valderia L.	Ptl2846	kein Ergebnis
Potentilla villosa Pall. ex Pursh	Ptl2807	3,37
Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla arguta Pursh)	Ptl2650	1,58 1,37 1,63 1,54 1,69 (Same) 1,58 (Same) 1,7 (Same)
Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla arguta Pursh)	Ptl2844	1,61 1,64 1,47 1,5 1,51 1,54 1,52
Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla cuneata Wall. & Lehm.)	Ptl2665	1,54
Sibbaldia cuneifolia (Bertol.) Paule & Soják	Ptl2906	1,52 1,64 1,51 1,55 1,50 (Same) 1,57 (Same) 1,55 (Same)

		1,56 (Same)
Sibbaldia tridentata (Aiton) Paule & Sojak	Ptl2679	Em
Sibbaldia tridentata (Aiton) Paule & Sojak (=Potentilla tridentata Sol.)	Ptl2761	Em

Tabelle 7 Übersicht Verhältniswerte FACSCalibur, Früchtchenqualität

Art	Materianummer	geeignet: verworfen	Verhältniswerte FACSCalibur
Drymocallis geoides M.Bieb.	Ptl2755	02:01	1,52 1,6
Drymocallis geoides M.Bieb.	Ptl2895	02:01	2,71
Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa (Lindl.) Rydb.	Ptl2710	02:00	1,48 1,43
Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa (Lindl.) Rydb.	Ptl2756	02:01	1,47 6,12
Drymocallis rupestris (L.) Sojak	Ptl2905	02:00	Em
Drymocallis rupestris (L.) Sojak	Ptl2920	02:03	1,5
Farinopsis salesoviana (Steph.) Chrtek & Sojak (= Potentilla salesoviana Steph.)	Ptl2830	02:01	1,44 (Same)
Potentilla (Argentina) leuconota D. Don.	Ptl2706	02:00	1,5 1,56
Potentilla adscharica Sommier & Levier ex R.Keller	Ptl2868		
Potentilla alchemilloides Lapeyr.	Ptl2703		
Potentilla argentea L.	Ptl2712	02:00	2,63 2,92
Potentilla argentea var. calabra (Ten.) Fiori & Paol.	Ptl2801	10:02	
Potentilla atrosanguinea Lodd. ex. D.Don.	Ptl2810	10:02	1,39 1,4
Potentilla aurea L.	Ptl2935	07:01	1,46 2,7
Potentilla aurea L.	Ptl2941	08:10	2,81 1,47
Potentilla calabra Ten.	Ptl2708	10:03	Em
Potentilla carniolica Kern.	Ptl2858	02:01	Em
Potentilla caulescens L.	Ptl2785	02:04	1,55
Potentilla caulescens L.	Ptl2880	02:02	1,49
Potentilla chinensis Ser.	Ptl2723	02:00	1,58
Potentilla clusiana Jacq.	Ptl2786	02:05	1,54
Potentilla crantzii (Crantz Beck			

Potentilla crantzii (Crantz) Beck ex Fritsch	Ptl2709	02:01	1,44 1,46
Potentilla crantzii (Crantz) Beck ex Fritsch	Ptl2820	02:00	Em
Potentilla delphinensis Gren. & Godr.	Ptl2851	02:03	Em
Potentilla erecta (L.) Räuschel	Ptl2894	02:00	1,51
Potentilla fissa Nutt.	Ptl2726	02:03	1,53 1,51
Potentilla gracilis Dougl. ex Hook	Ptl2944	02:01	Em
Potentilla gracilis var. fastigiata (Nutt.) S.Wats.	Ptl2711	02:00	Em
Potentilla gracilis var. glabrata (Lehm.) Hitchc.	Ptl2888	02:00	Em
Potentilla grandiflora L.	Ptl2892	02:00	1,47 1,35
Potentilla grandiflora L.	Ptl2897	02:01	2,49
Potentilla hippiana Lehm.	Ptl2758	02:00	Em
Potentilla hippiana Lehm.	Ptl2930	02:02	Em
Potentilla hyparctica Malte	Ptl2842	02:02	1,6 1,5
Potentilla incana Gaertn. Mey. & Scherb.	Ptl2659	02:00	En gering 2,65 2,63
Potentilla longifolia Willd. ex Schlecht.	Ptl2862	02:00	1,47 En=7 1,46
Potentilla megalantha Takeda	Ptl2660	02:00	Em
Potentilla megalantha Takeda	Ptl2843	02:00	1,48
Potentilla multifida L.	Ptl2729	02:00	Em
Potentilla multifida L.	Ptl2741	02:00	Em
Potentilla nitida L.	Ptl2969	02:01	kein Ergebnis
Potentilla norvegica L.	Ptl2714	02:00	2,3 1,47
Potentilla norvegica L.	Ptl2948	02:01	Em
Potentilla nuttallii Lehm.	Ptl2655	02:00	En gering 2,85 2,94
Potentilla ornithopoda Tausch	Ptl2715	02:00	3,14 3,74
Potentilla ornithopoda Tausch	Ptl2716	02:00	3,07
Potentilla pensylvanica L.	Ptl2656	02:00	viel Hinterg. 2,54 2,69-/ 2,94
Potentilla pensylvanica Welsh. & Johnston	Ptl2765	02:01	1,48
Potentilla pulcherrima Lehm.	Ptl2718	02:00	2,22
Potentilla pusilla Host	Ptl7143		1,5 1,53
Potentilla pusilla Host	Ptl7144		
Potentilla pusilla Host	Ptl7145		

Potentilla pusilla Host	Ptl7146		1,37 1,49 1,48
Potentilla pyrenaica Ram. ex DC.	Ptl2919	02:01	En gering 1,5
Potentilla pyrenaica Ram. ex DC.	Ptl2950	02:00	1,34
Potentilla recta L.	Ptl2719	02:01	En gering 2,79
Potentilla recta L.	Ptl2771	02:01	Em
Potentilla recta L.	Ptl2772	02:01	Em
Potentilla recta L.	Ptl2811	02:00	2,87 2,85
Potentilla recta L.	Ptl2879	02:03	Em
Potentilla recta L.	Ptl2912	02:00	2,83
Potentilla recta L.	Ptl2929	02:02	3,05 3,01
Potentilla speciosa Willd.	Ptl2661	02:02	1,46 1,35
Potentilla speciosa Willd.	Ptl2670	02:00	Em
Potentilla sterilis (L.) Garcke	Ptl2788	02:01	viel Hintergr. 1,53 viel Hintergr. 1,5
Potentilla supina L. ssp. supina	Ptl2787	02:00	1,45
Potentilla supina L. ssp. supina	Ptl2887	02:00	Em
Potentilla thurberi A.Gray ex Lehm.	Ptl2699	02:01	Em
Potentilla thuringiaca Bernh.	Ptl2720	02:06	Em
Potentilla thuringiaca Bernh.	Ptl2917	02:05	Em
Potentilla umbrosa Stev.	Ptl2721	02:00	1,42
Potentilla valderia L.	Ptl2846	02:02	1,5 1,48
Potentilla villosa Pall. ex Pursh	Ptl2807	02:00	kein Ergebnis
Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla arguta Pursh)	Ptl2650	23:35	1,51 1,45
Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla arguta Pursh)	Ptl2844	13:00	1,5 1,42
Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla cuneata Wall. & Lehm.)	Ptl2665	02:00	1,29
Sibbaldia cuneifolia (Bertol.) Paule & Soják	Ptl2906		
Sibbaldia tridentata (Aiton) Paule & Soják	Ptl2679	02:00	1,36
Sibbaldia tridentata (Aiton) Paule & Soják (= Potentilla tridentata Sol.)	Ptl2761	02:00	1,43 1,5

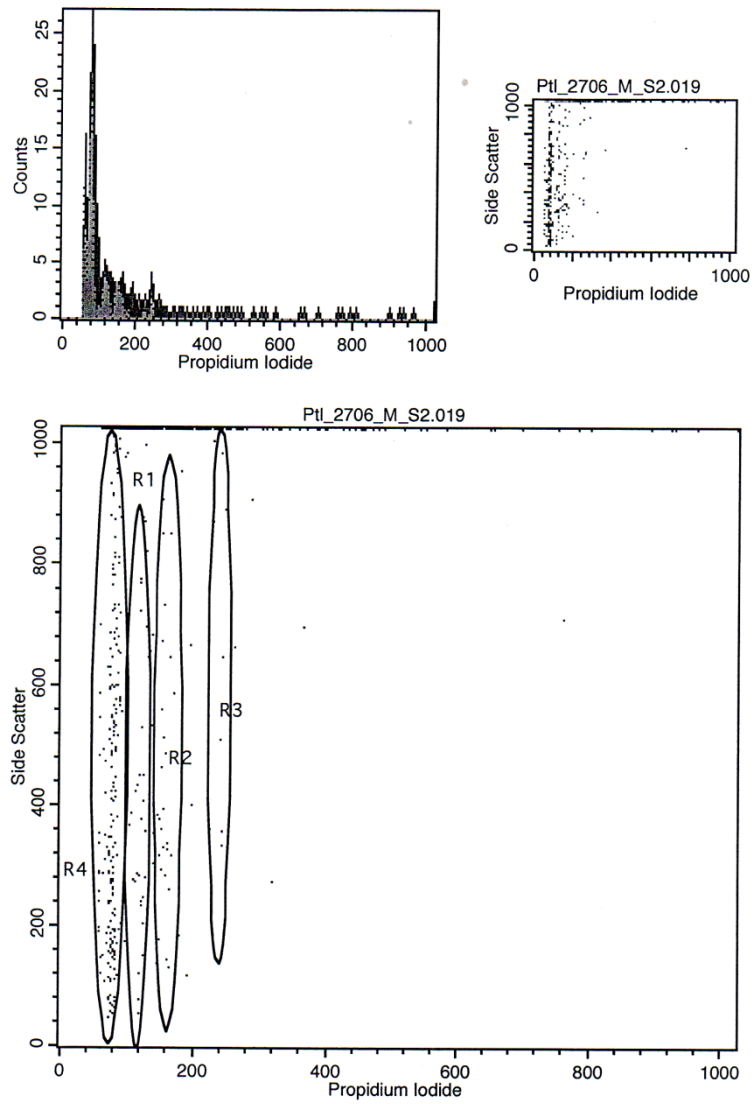
4.1.3 ZUSAMMENFASSUNG UND BEISPIELE

Für den überwiegenden Teil der Populationen kann den Messungen zufolge **Sexualität** angenommen werden. Bei einigen Arten stützt sich diese Annahme auf die Messungen an einem Gerät. Der Grund hierfür liegt zumeist darin, dass bei keiner der Messungen durch das andere Gerät vollständige Auswertbarkeit gegeben war. Bei anderen Arten ergaben Messungen an beiden Geräten Verhältniswerte, die alle auf Sexualität schließen lassen. Populationen für welche letzteres zutrifft sind *Drymocallis rupestris* (L.) Sojak (Ptl2920), *Potentilla leuconota* D.Don (Ptl2706), *Potentilla atrosanguinea* Lodd.ex D. Don (Ptl2810), *Potentilla caulescens* L. (Ptl2785), *Potentilla chinensis* Ser. (Ptl2723), *Potentilla clusiana* Jaq. (Ptl2786), *Potentilla grandiflora* L. (Ptl2892), *Potentilla hyparctica* Malte (Ptl2842), *Potentilla longifolia* Wild. ex Schlecht. (Ptl2862), *Potentilla pennsylvanica* Welsh. & Johnston (Ptl2765), *Potentilla speciosa* Wild. (Ptl2661), *Potentilla supina* L. ssp. *supina* (Ptl2787), *Potentilla umbrosa* Stev. (Ptl2721), *Potentilla cuneata* Edgew. (Ptl2650, Ptl2844, Ptl2665).

Alle Messungen von Früchtchen der Gattung *Sibbaldia*, bei denen Zellkerne des Endosperms detektiert wurden, ergaben Sexualität.

Bei Messungen an beiden Geräten **lediglich** die Fluoreszenz der **embryonalen DNA** eingrenzbar war bei folgenden Populationen: *Potentilla calabra* Ten (Ptl2708), *Potentilla delphinensis* Gren. & Godr. (Ptl2851), *Potentilla gracilis* Dougl. ex Hook (Ptl2944), *Potentilla norvegica* L. (Ptl2948), *Potentilla recta* L. (Ptl2772), *Potentilla thurberi* A. Gray ex Lehm. (Ptl2699), *Potentilla thuringiaca* Bernh. (Ptl2720). Hier, wie bei allen Individuen bei denen nur eine als embryonal zu interpretierende Fluoreszenzhäufung auftrat, ist eine Interpretation, dass es sich um reife Samen handelte. Das Nährgewebe könnte bereits zu sehr verbraucht gewesen sein, um der Empfindlichkeit der Methode entsprechend messbar zu sein.

Bei 23 Populationen geben die errechneten Verhältniswerte Hinweis auf Apomixis oder machen eine gesonderte Betrachtung der Messung erforderlich. Auf diese wird im folgenden Unterkapitel 4.1.4 *Einzelresultate* näher eingegangen.



Region Statistics

File: Ptl_2706_M_S2.019
 Sample ID: Ptl_2706_M_S2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 27-Nov-09
 Gated Events: 630
 X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 630
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	32	5.08	5.08	119.72	119.51	388.34	326.34	2, 1
R2	29	4.60	4.60	156.86	156.67	457.90	404.16	2, 1
R4	200	31.75	31.75	76.70	76.36	414.21	325.40	2, 1
R3	7	1.11	1.11	241.57	241.49	655.00	604.64	2, 1

Abbildung 8 FACSCalibur *Argentina leuconota*, Embryo und Endosperm je mit G2

4.1.4 EINZELRESULTATE

Drymocallis geoides M.Bieb.

Bei Population Ptl2755 handelt es sich den Messungen durch das FACSCalibur zufolge erwartungsgemäß um sexuelle Samen. Durch den Ploidy Analyser konnte für diese Population nur von DNA des Embryos stammende Fluoreszenz gemessen werden. Ptl2895 legt mit einem Verhältnis der beiden eingrenzbaren Messungen von Fluoreszenz von 2,71 eine Interpretation als Apomikten nahe. Die Messungen der Population Ptl2895 durch den Ploidy Analyser ergeben mit Verhältniswerten von 3,01 und 3,22 der Fluoreszenz der beiden eingrenzbaren Häufungen zueinander ebenfalls eine Interpretation als Apomikten.

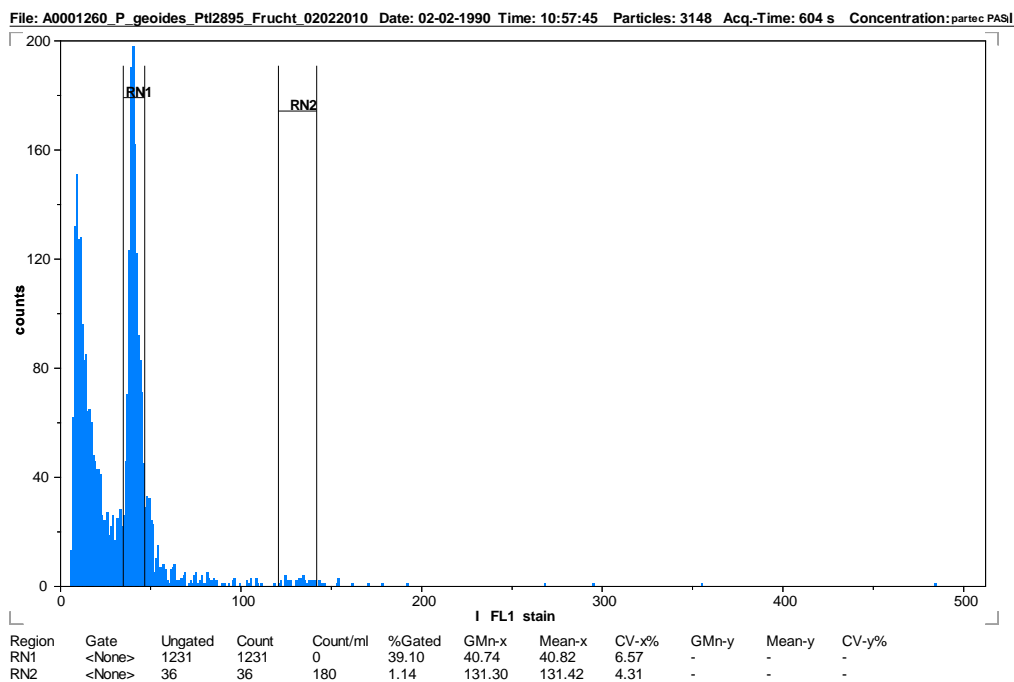
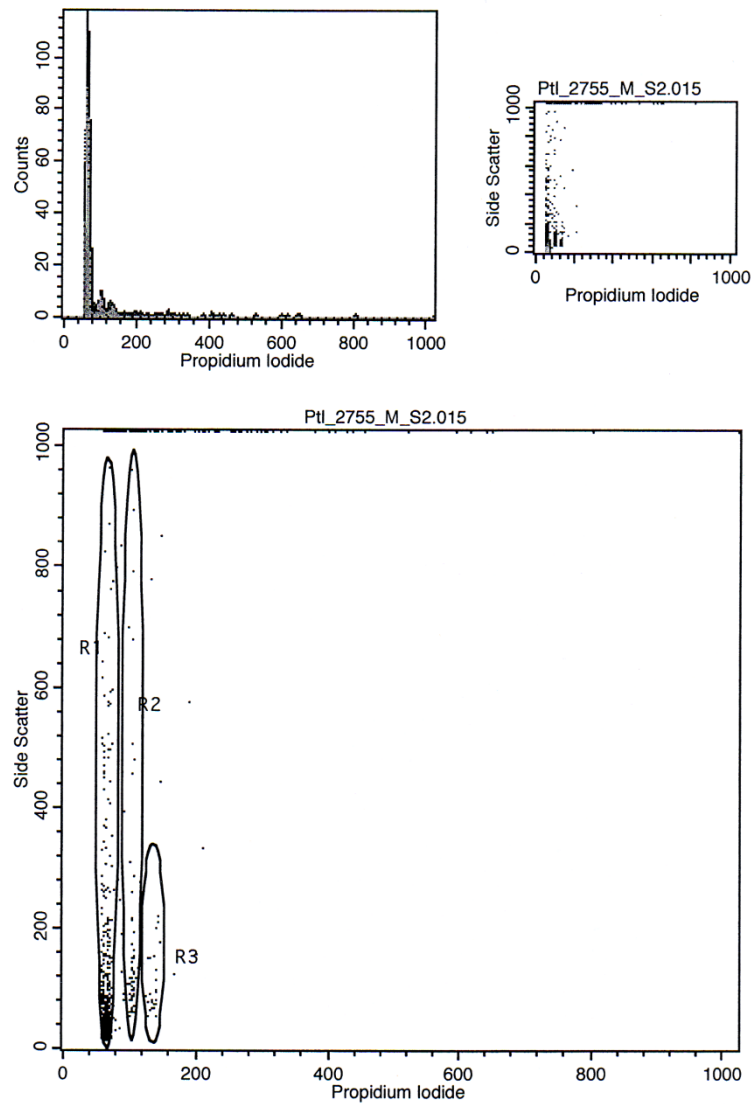


Abbildung 9 Ploidy Analyser, *Drymocallis geoides* Ptl2895



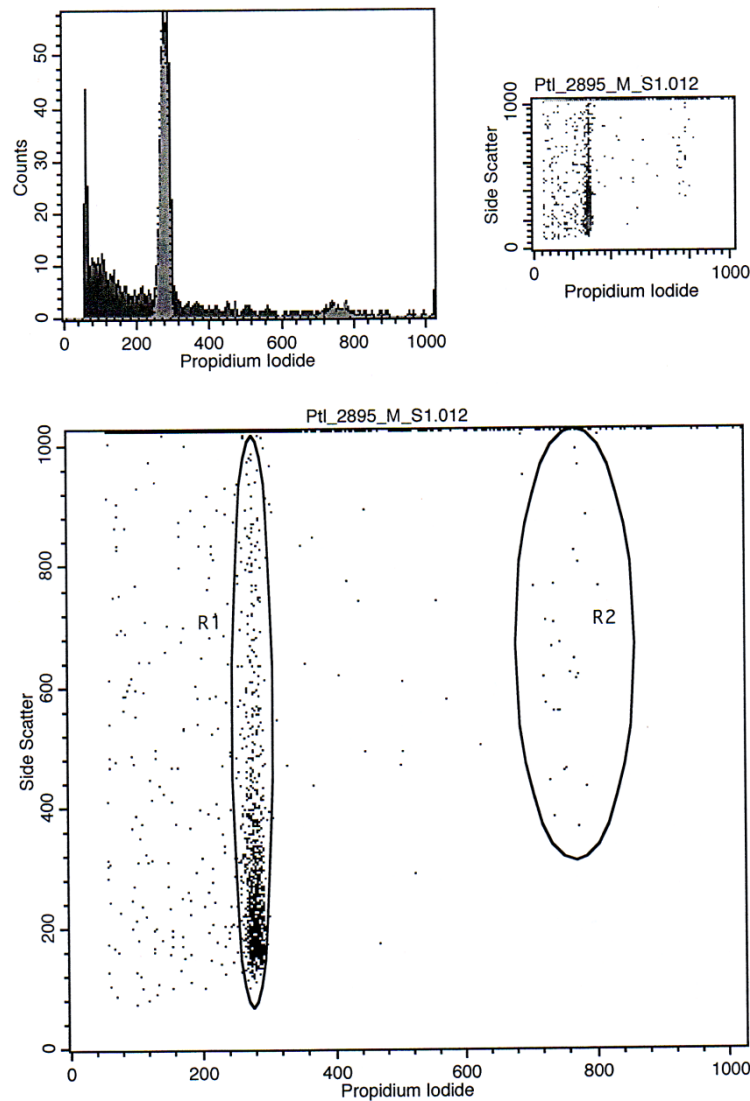
Region Statistics

File: PtI_2755_M_S2.015
 Sample ID: PtI_2755_M_S2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 30-Nov-09
 Gated Events: 1200
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 1200
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	890	74.17	74.17	64.97	64.87	78.67	48.61	2, 1
R2	61	5.08	5.08	103.89	103.82	201.38	144.93	2, 1
R3	25	2.08	2.08	136.96	136.84	111.20	101.25	2, 1

Abbildung 10 FACSCalibur, *Dryocallis geoides* PtI2755



Region Statistics

File: Pt1_2895_M_S1.012 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Pt1_2895_M_S1 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 30-Nov-09 Gate: No Gate
 Gated Events: 2310 Total Events: 2310
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	1077	46.62	46.62	278.92	278.79	295.99	259.34	2, 1
R2	32	1.39	1.39	754.72	754.40	703.34	673.38	2, 1

Abbildung 11 FACSCalibur, *Dryocallis geoides* Pt12895

***Dryocallis glandulosa subsp. glandulosa* (Lindl.) Rydb.**

Die in allen weiteren Messungen für beide Populationen als sexuell bestimmte Art hat für Pt12756 durch das FACSCalibur einen Verhältniswert von 6,12 ergeben. Eine Hypothese wäre ein haploider Embryo und ein Endosperm welches aus reduzierten Polkernen und einer doppelten Befruchtung durch unreduzierte Zellen des Pollens hervorgegangen ist. Eine weitere Möglichkeit wäre Bestäubung durch einen Pollen eines anderen Ploidieniveaus oder einer anderen Art.

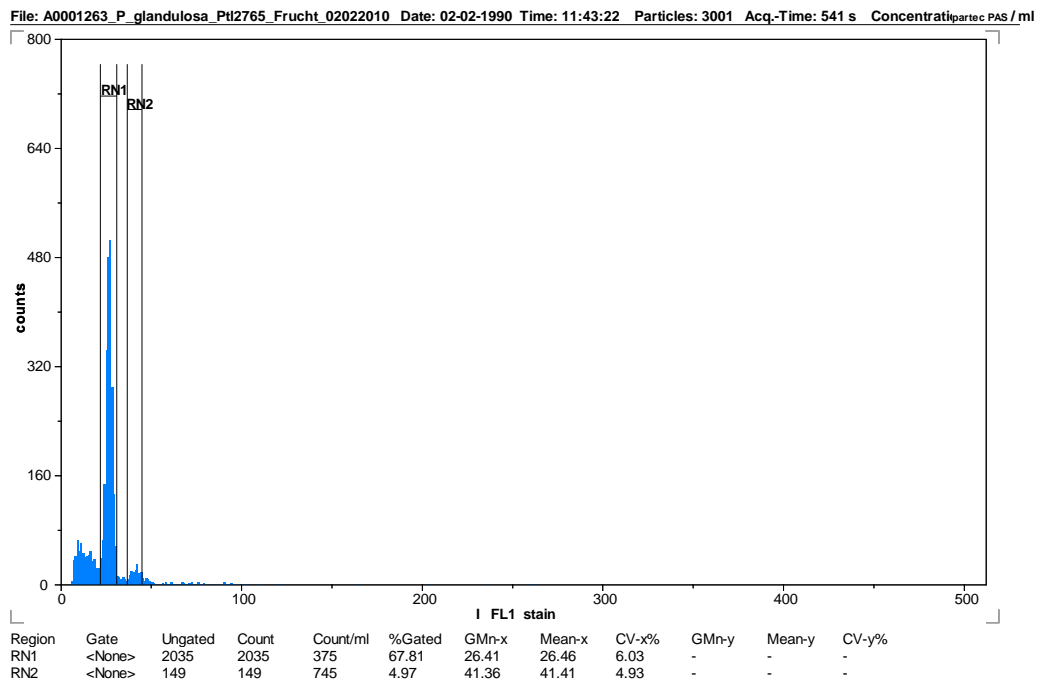
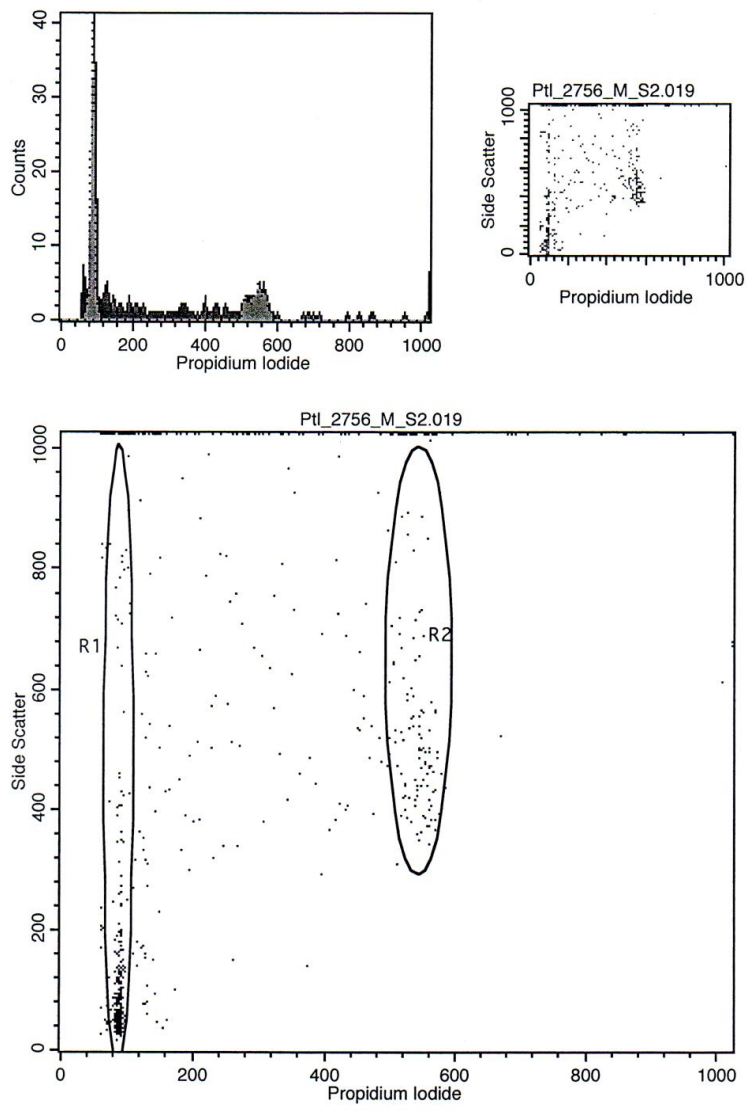


Abbildung 12 Ploidy Analyser, *Dryocallis glandulosa* Pt12786



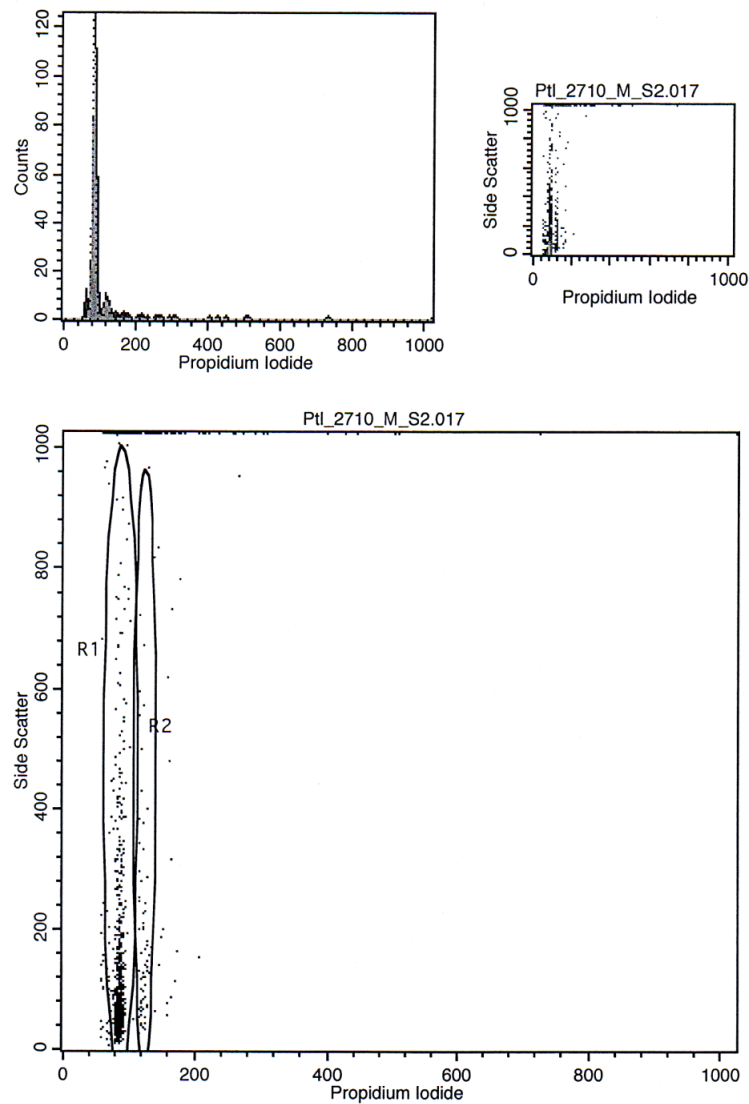
Region Statistics

File: Ptl_2756_M_S2.019
 Sample ID: Ptl_2756_M_S2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 30-Nov-09
 Gated Events: 675
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 675
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	304	45.04	45.04	88.51	88.40	134.44	85.88	2, 1
R2	103	15.26	15.26	541.32	540.97	523.88	509.22	2, 1

Abbildung 13 FACSCalibur, *Dryocallis glandulosa* Ptl2756



Region Statistics

File: Ptl_2710_M_S2.017
 Sample ID: Ptl_2710_M_S2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 30-Nov-09
 Gated Events: 1185
 X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 1185
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	931	78.57	78.57	85.21	85.12	118.78	75.44	2, 1
R2	70	5.91	5.91	121.61	121.52	188.27	137.22	2, 1

Abbildung 14 FACSCalibur, *Dryocallis glandulosa* Ptl2710

Potentilla argentea

Population Ptl2801, *Potentilla argentea* var. *calabra* (Ten.) Fiori & Paol., ergab durch den Ploidy Analyser mit einem Individuum Sexualität. Von *Potentilla argentea* L., Ptl2712, wurden am FACSCalibur zwei apomiktische Individuen identifiziert. Die Verhältniswerte betragen hier 2,63 und 2,92.

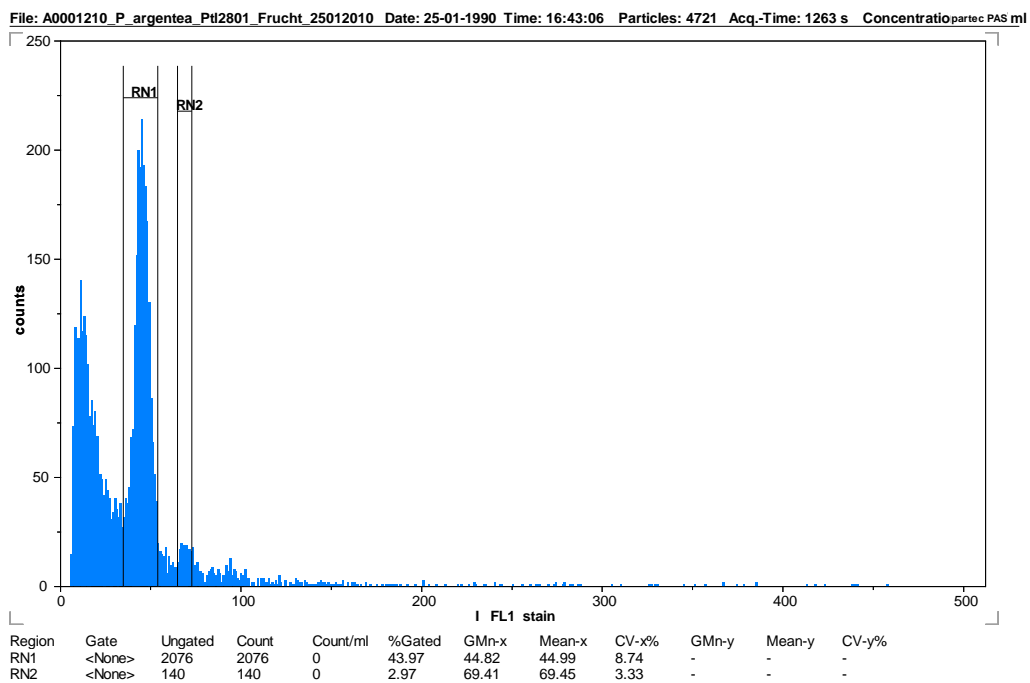
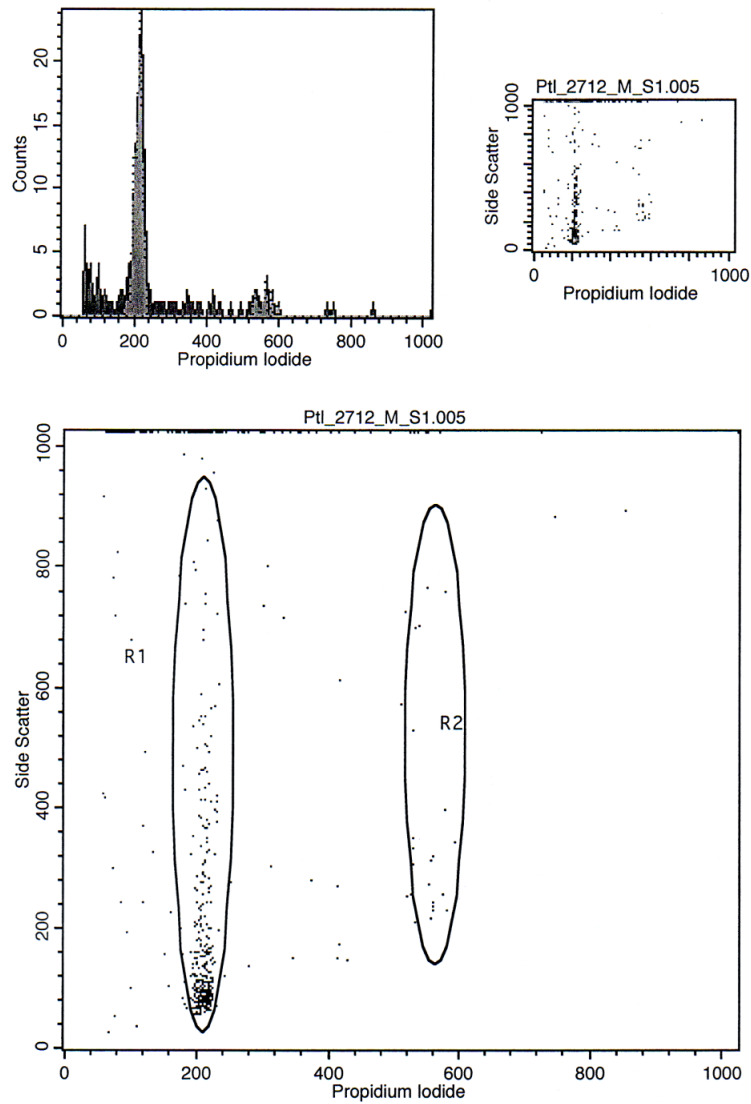


Abbildung 15 Ploidy Analyser, *Potentilla argentea* Ptl2801



Region Statistics

File: Pt1_2712_M_S1.005
 Sample ID: Pt1_2712_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 01-Dec-09
 Gated Events: 570
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 570
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	381	66.84	66.84	211.38	211.17	177.81	135.38	2, 1
R2	19	3.33	3.33	555.53	555.20	393.47	356.82	2, 1

Abbildung 16 FACSCalibur, *Potentilla argentea* Pt12712

***Potentilla aurea* L.**

Für *Potentilla aurea* haben die Messungen durch den Ploidy Analyser für beide Populationen, Ptl2935 und Ptl2941, Sexualität ergeben. Durch die am FACSCalibur durchgeführten Messungen liegt für beide Populationen je ein sexuelles und ein apomiktisches Ergebnis vor. Die Verhältniswerte betragen hier 1,46 und 2,7 für Ptl2935, sowie 1,47 und 2,81 für Ptl2941.

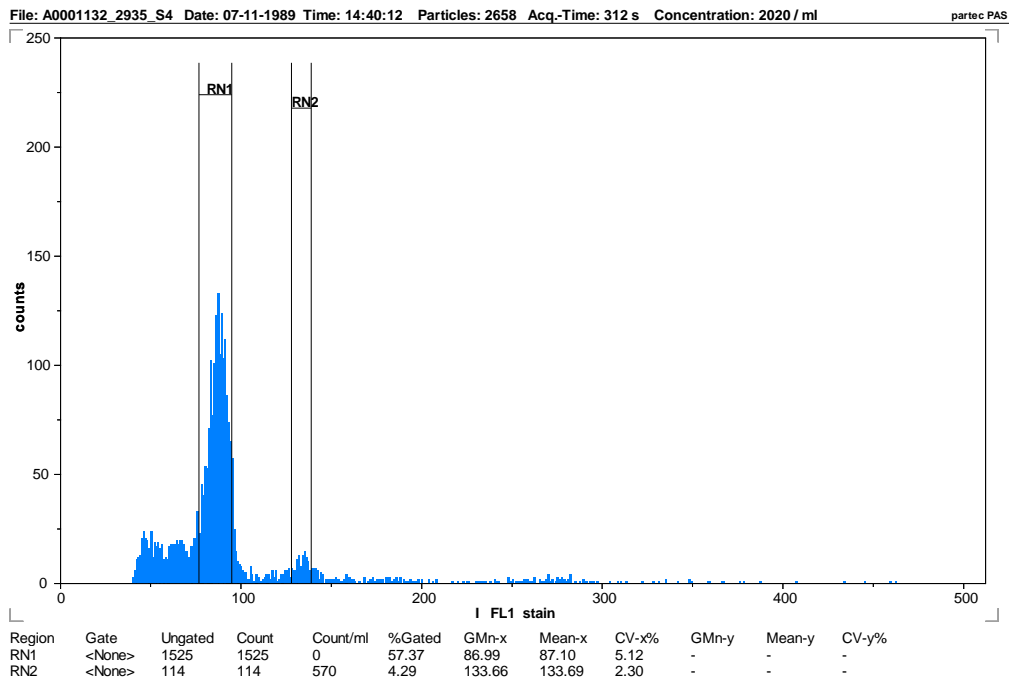


Abbildung 17 Ploidy Analyser, *Potentilla aurea* Ptl2935

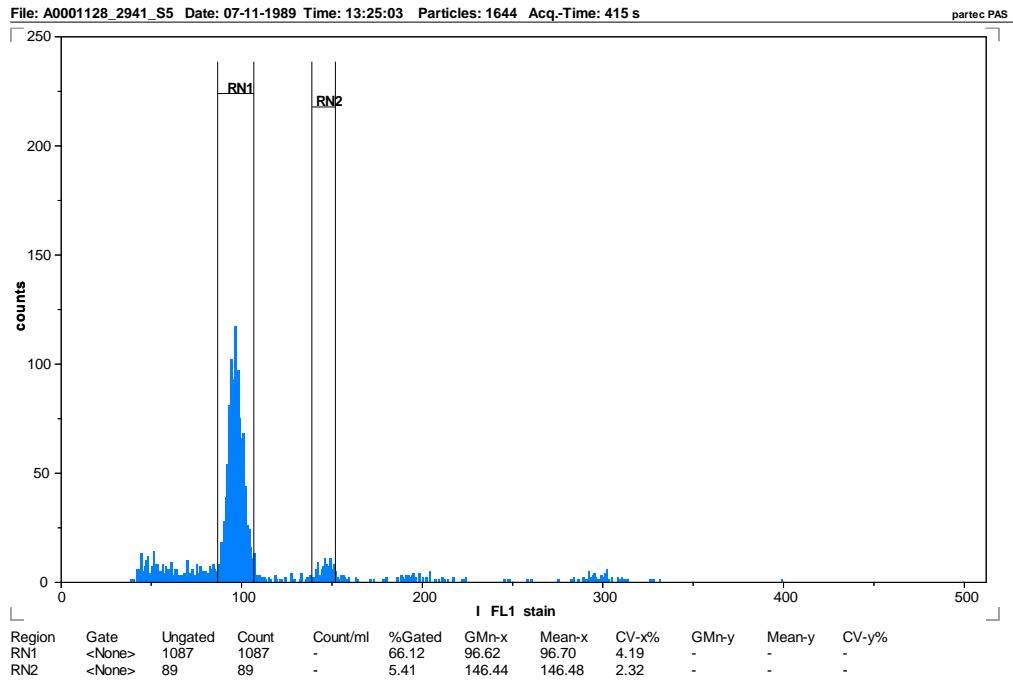
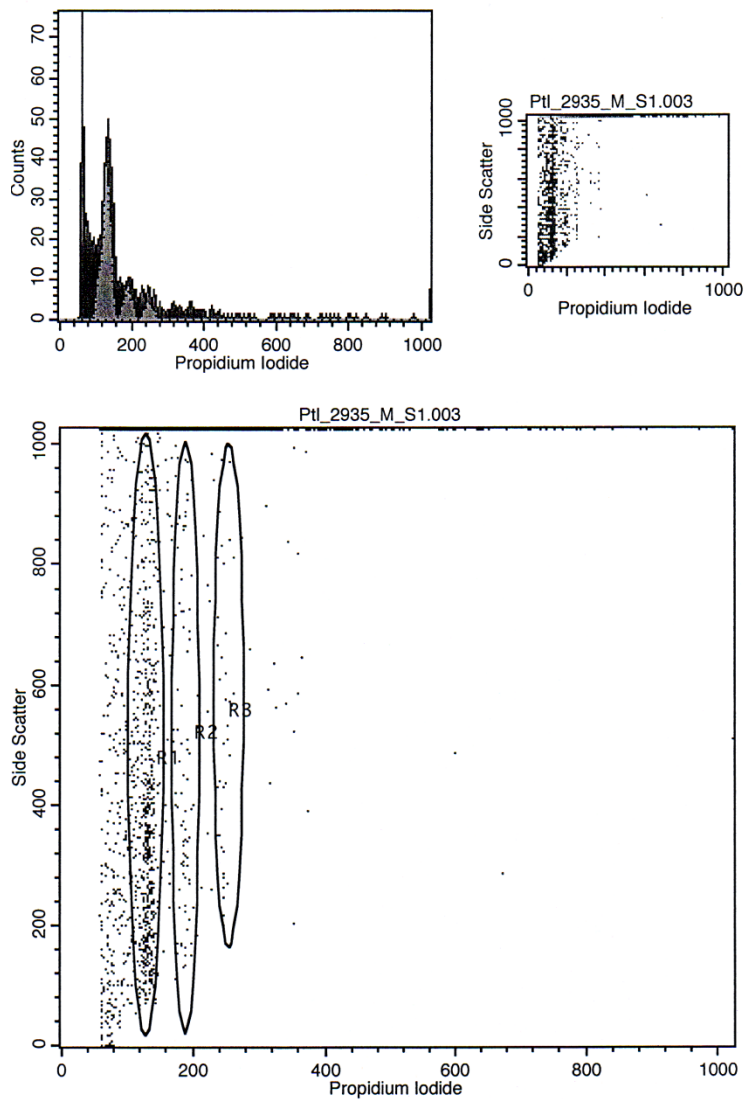


Abbildung 18 Ploidy Analyser, *Potentilla aurea* Ptd2941

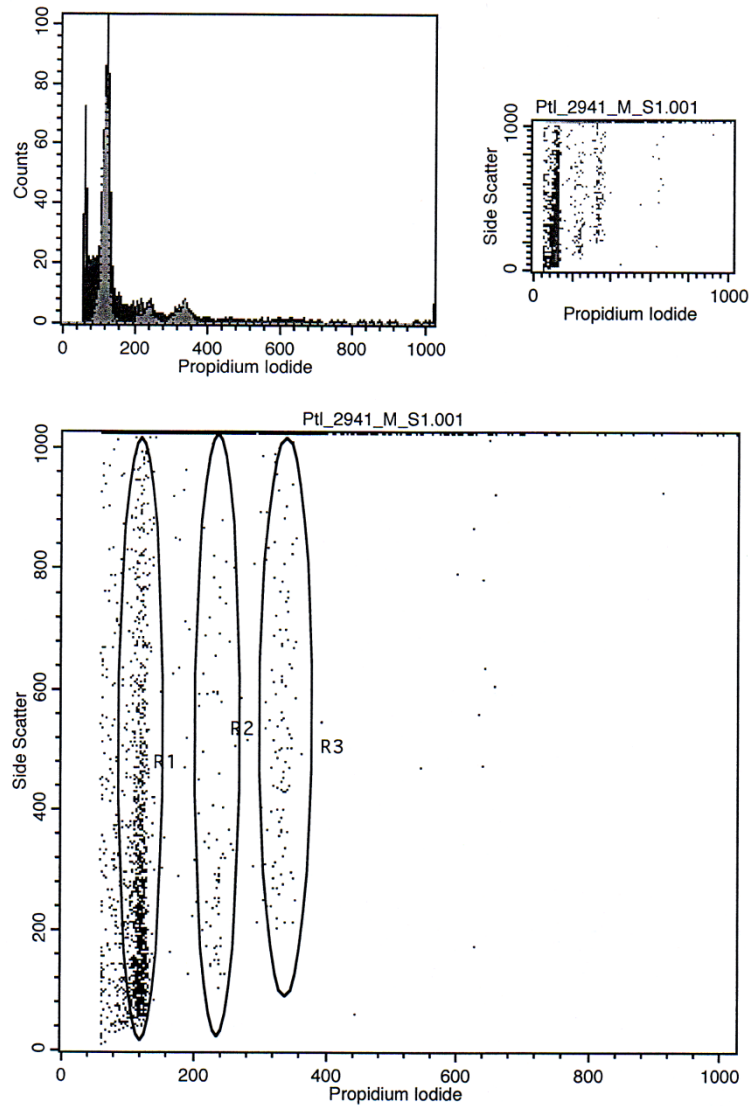


Region Statistics

File: Ptl_2935_M_S1.003 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Ptl_2935_M_S1 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 27-Nov-09 Gate: No Gate
 Gated Events: 2550 Total Events: 2550
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	678	26.59	26.59	128.49	128.11	420.95	352.40	2, 1
R2	90	3.53	3.53	187.30	187.10	488.96	423.18	2, 1
R3	39	1.53	1.53	247.08	246.98	517.51	475.17	2, 1

Abbildung 19 FACSCalibur, *Potentilla aurea* Ptl2935



Region Statistics

File: Ptl_2941_M_S1.001
 Sample ID: Ptl_2941_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 27-Nov-09
 Gated Events: 3165
 X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 3165
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	1261	39.84	39.84	118.04	117.74	305.96	234.95	2, 1
R2	74	2.34	2.34	233.01	232.61	405.41	344.58	2, 1
R3	103	3.25	3.25	332.16	331.90	535.51	496.38	2, 1

Abbildung 20 FACSCalibur, *Potentilla aurea* Ptl2941

***Potentilla carniolica* Kern.**

In einer einzigen in vollem Umfang auswertbaren Messung durch den Ploidy Analyser lässt das Verhältnis von 3,02 auf ein Vorliegen von Apomixis schließen.

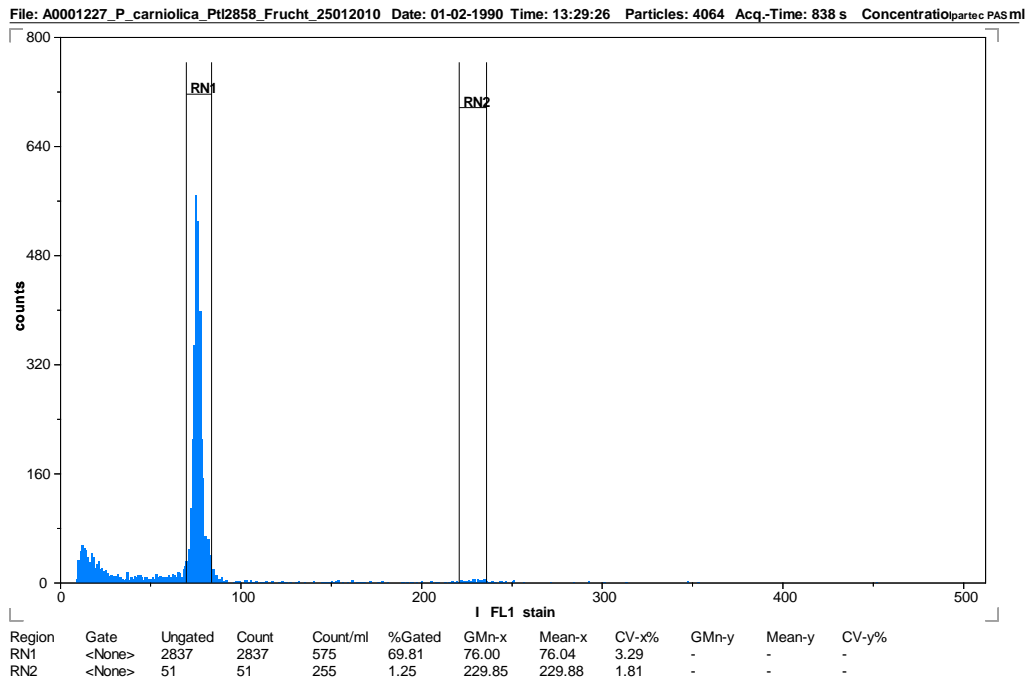


Abbildung 21 Ploidy Analyser, *Potentilla carniolica* Pt12868

***Potentilla gracilis* var. *fastigiata* (Nutt.) S.Wats.**

Messung dieser Art, Population Ptl2711, durch den Ploidy Analyser ergab für ein Individuum Verhältniswerte von 1,72 und 10,13. Vor dem Hintergrund, dass bei weiteren Messungen dieser Art sowie Messungen anderer Unterarten der *Potentilla gracilis* zu keinen auswertbaren Daten führten kann dieses Ergebnis nicht näher beurteilt werden. Für *Potentilla gracilis* wird allgemein Sexualität angenommen.

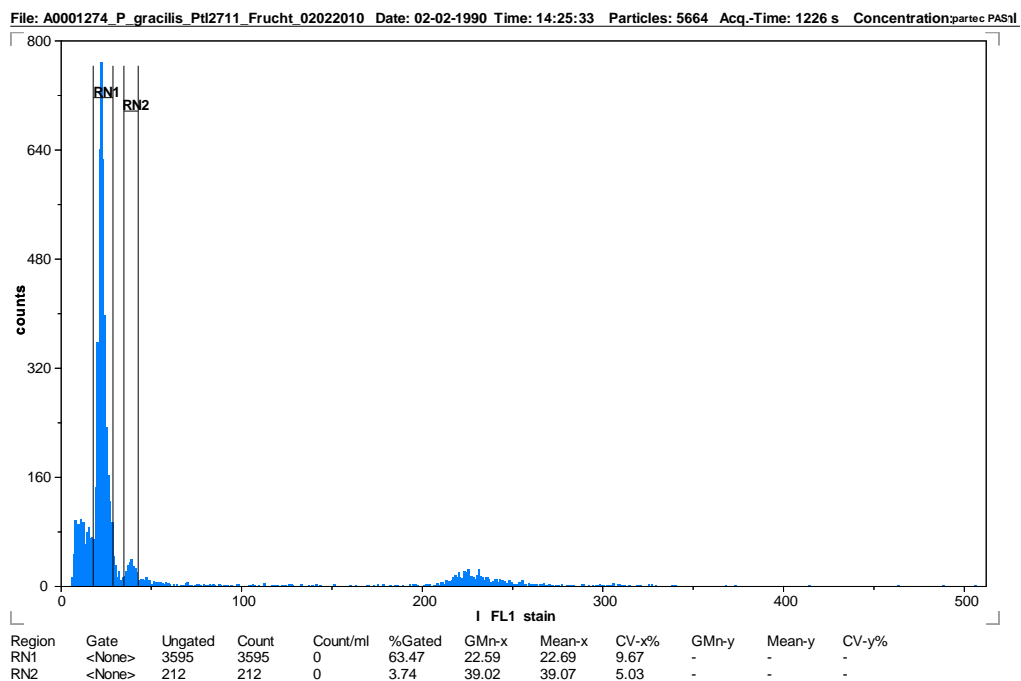


Abbildung 22 Ploidy Analyser, *Potentilla gracilis* Ptl2711

***Potentilla grandiflora* L.**

Für Population Ptl2892 ergab sich an beiden Geräten eine eindeutige Interpretation als sexuell. Eine Messung der Population Ptl2897 ergab ein Verhältnis von 2,49 (FACSCalibur).

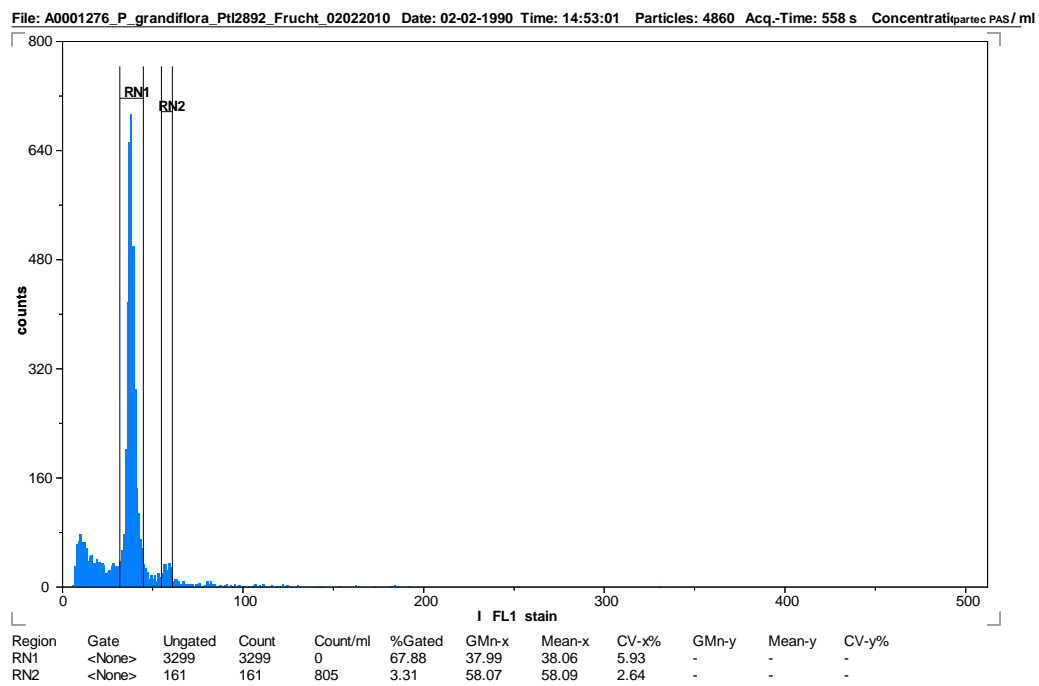
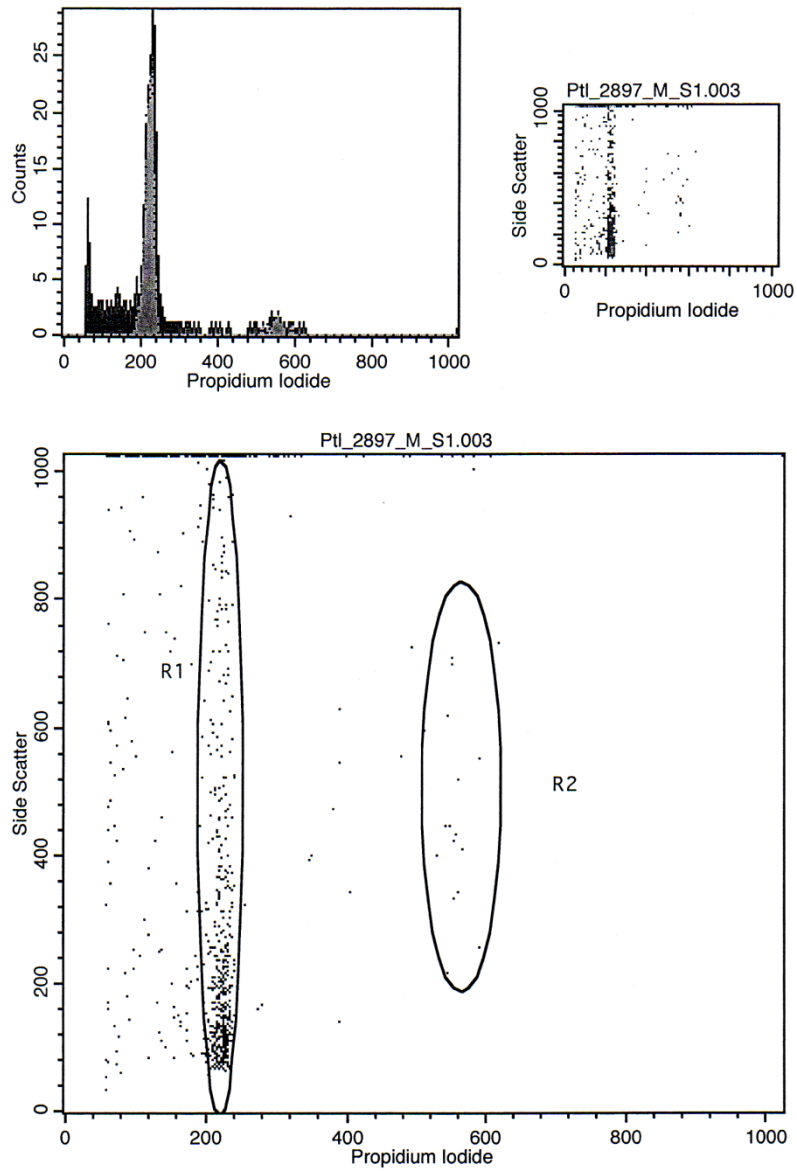


Abbildung 23 Ploidy Analyser, *Potentilla grandiflora* Ptl2892



Region Statistics

File: PtI_2897_M_S1.003 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PtI_2897_M_S1 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 01-Dec-09 Gate: No Gate
 Gated Events: 810 Total Events: 810
 X Parameter: Propidium iodide (Linear) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	463	57.16	57.16	221.80	221.60	264.94	200.75	2, 1
R2	16	1.98	1.98	553.31	553.00	461.75	439.20	2, 1

Abbildung 24 FACSCalibur, *Potentilla grandiflora* PtI2897

***Potentilla hippiana* Lehm.**

Mit Verhältniswerten von 3,12, 1,74 und 3,15 weisen die Ergebnisse der Messungen durch den Ploidy Analyser für beide Populationen auf Apomixis hin. Bei Messungen durch das FACSCalibur ließ sich jeweils lediglich eine dem Embryo zugeordnete Fluoreszenz bestimmen.

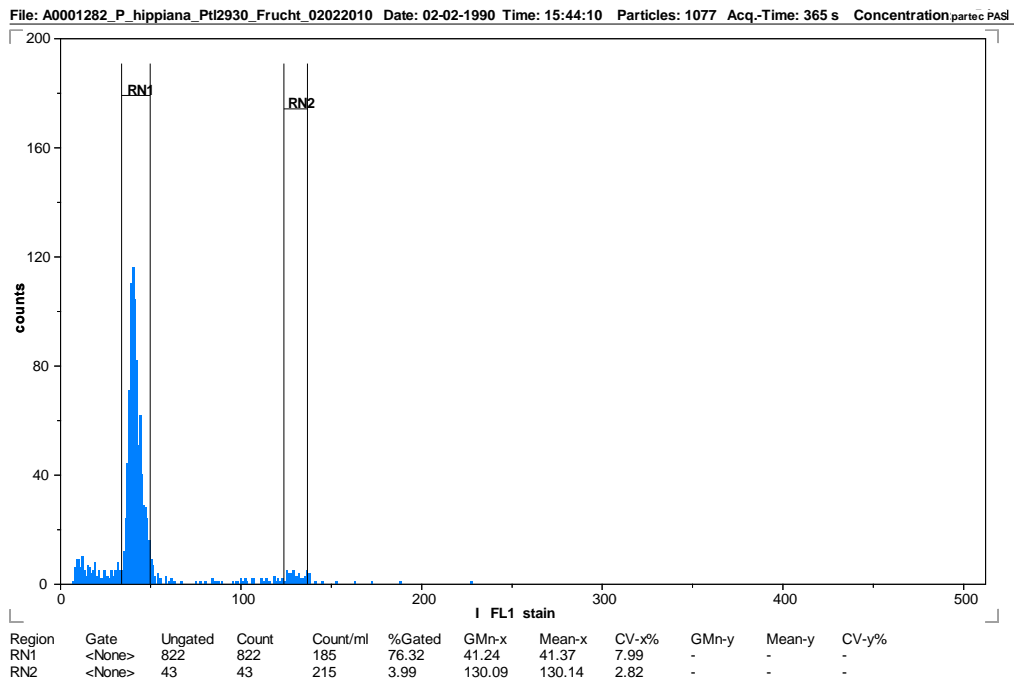
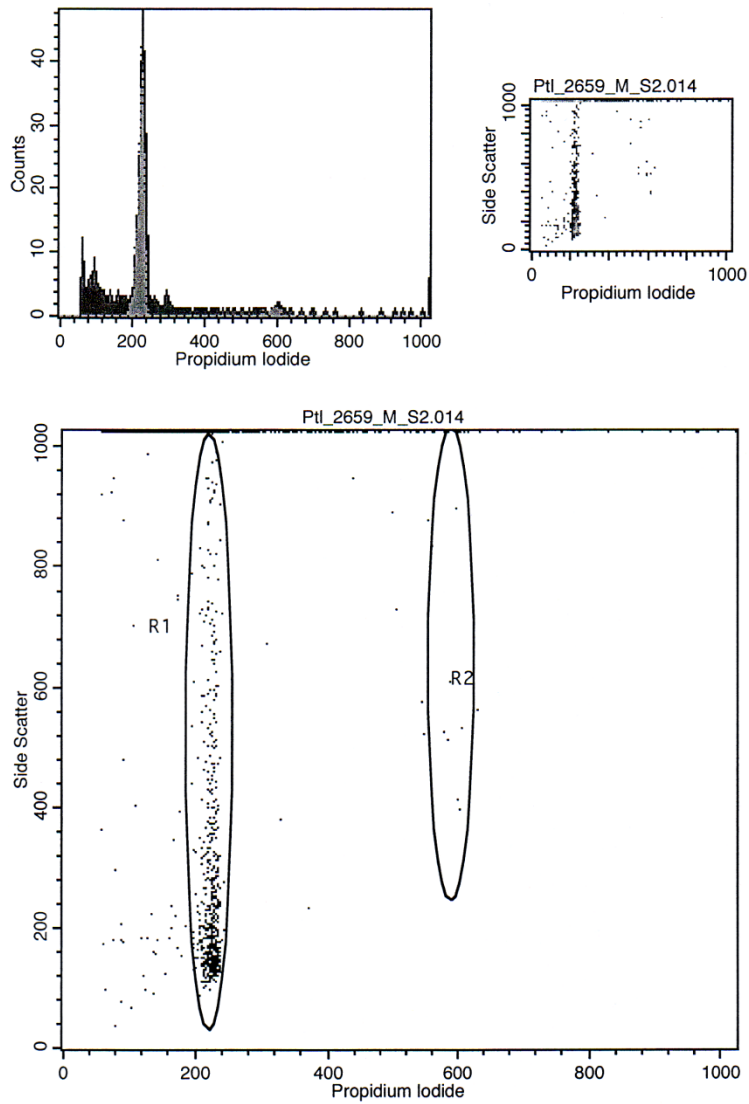


Abbildung 25 Ploidy Analyser, *Potentilla hippiana* Ptl2930

***Potentilla icana* Gaertn. Mey. & Scherb.**

Verhältnisse von 2,65 und 2,63 der Intensität der jeweils gemessenen Fluoreszenzen zueinander lassen bei geringen Endosperm-Counts den vorsichtigen Schluss auf ein Vorliegen von Apomixis bei beiden Individuen zu. Die Daten stammen aus Messungen durch das FACSCalibur.



Region Statistics

File: Ptl_2659_M_S2.014
 Sample ID: Ptl_2659_M_S2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 01-Dec-09
 Gated Events: 1170
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 1170
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	611	52.22	52.22	223.96	223.80	280.81	233.78	2, 1
R2	9	0.77	0.77	589.00	588.84	637.89	605.22	2, 1

Abbildung 26 FACSCalibur, *Potentilla incana* Ptl2659

***Potentilla multifida* L.**

Den Messungen durch den Ploidy Analyser zufolge handelt es sich bei beiden Populationen um Apomikten. Für Ptl2729 liegt das Größenverhältnis der DNA von Embryo und Endosperm bei 3,44 und 3,35, für Ptl2741 bei 4,23, 3,32 und 2,63. Durch das FACSCalibur konnten keine Ergebnisse erzielt werden, da sich hier lediglich dem Embryo zugeordnete Fluoreszenz eingrenzen ließ.

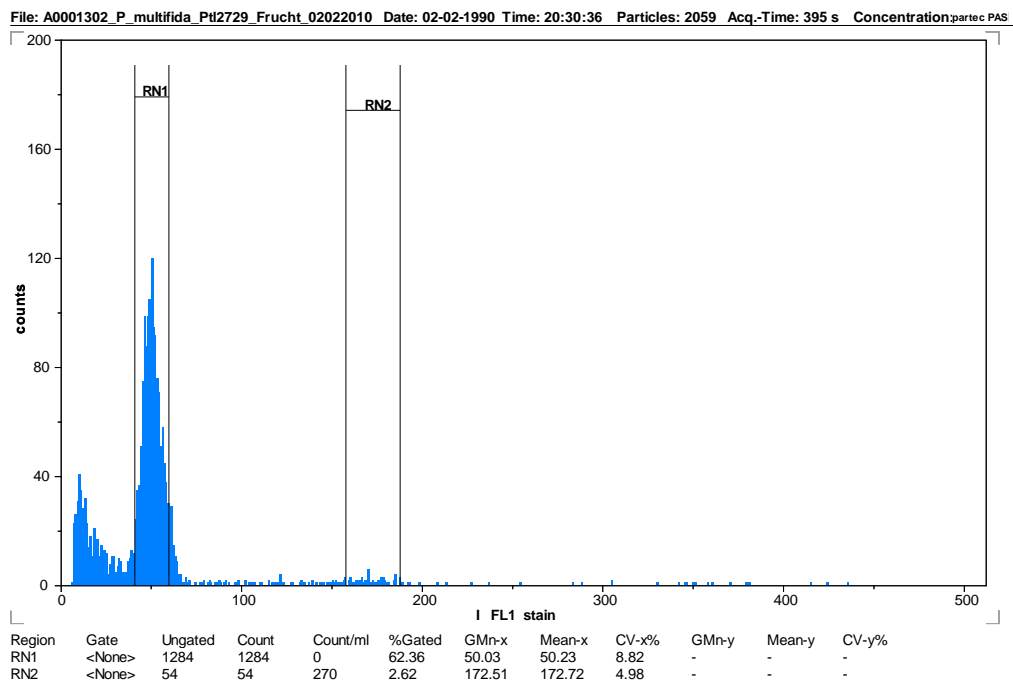
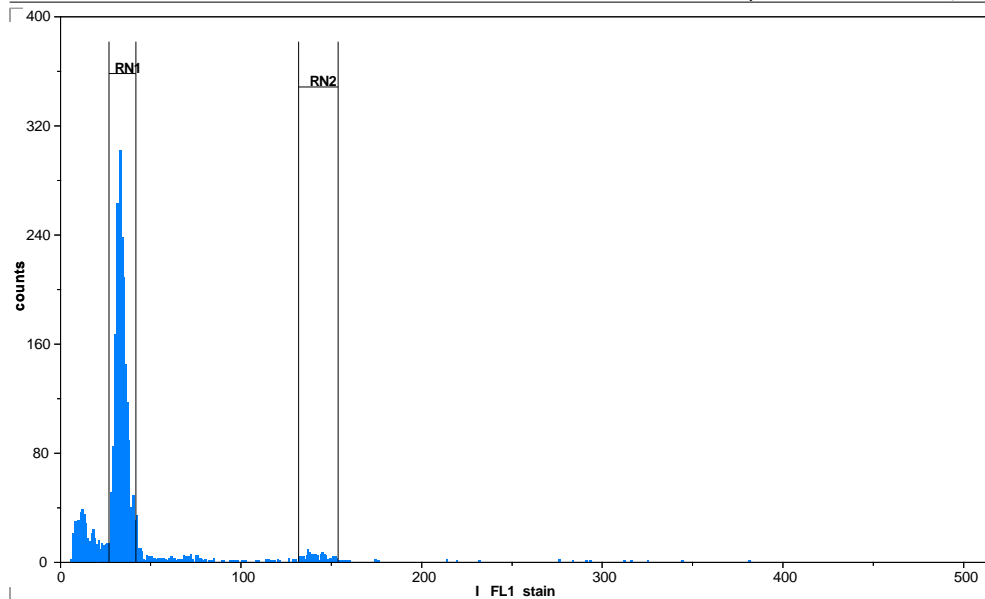


Abbildung 27 Ploidy Analyser, *Potentilla multifida* Ptl2729

File: A0001304_P_multifida_Ptl2741_Frucht_03022010 Date: 03-02-1990 Time: 10:21:11 Particles: 2812 Acq.-Time: 534 s Concentration:partec PASnl

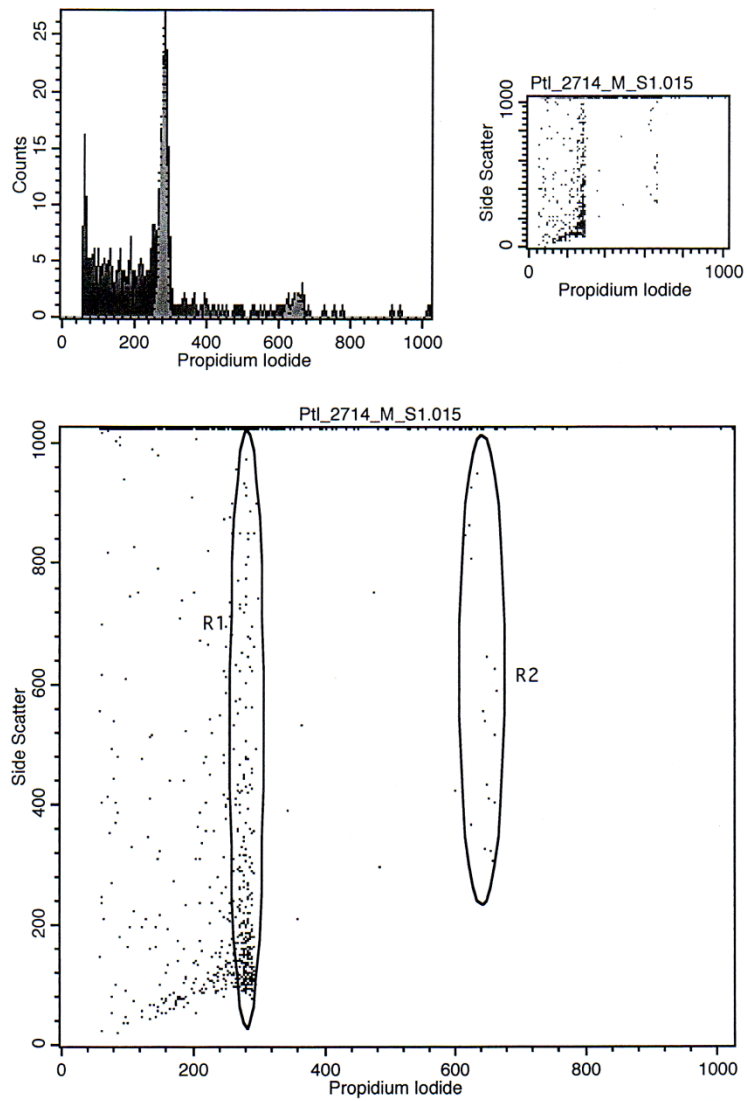


Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	GMn-x	Mean-x	CV-x%	GMn-y	Mean-y	CV-y%
RN1	<None>	2082	2082	855	74.04	33.46	33.60	9.17	-	-	-
RN2	<None>	95	95	475	3.38	142.18	142.29	4.03	-	-	-

Abbildung 28 Ploidy Analyser, *Potentilla multifida* Ptl2741

Potentilla norvegica L.

Messungen durch das FACSCalibur haben für Ptl2714 mit errechneten Werten von 2,3 und 1,47 sowohl Hinweis auf Apomixis als auch auf Sexualität ergeben. Ersterer Wert könnte jedoch auch von einer G2-Kernphase embryonaler Zellen herrühren. Unterstützt wird diese Möglichkeit dadurch, dass für Ptl2714 bei Messungen am Ploidy Analyser und für Ptl2948 an beiden Messgeräten jeweils lediglich Fluoreszenz embryonaler Kerne detektiert wurde.



Region Statistics

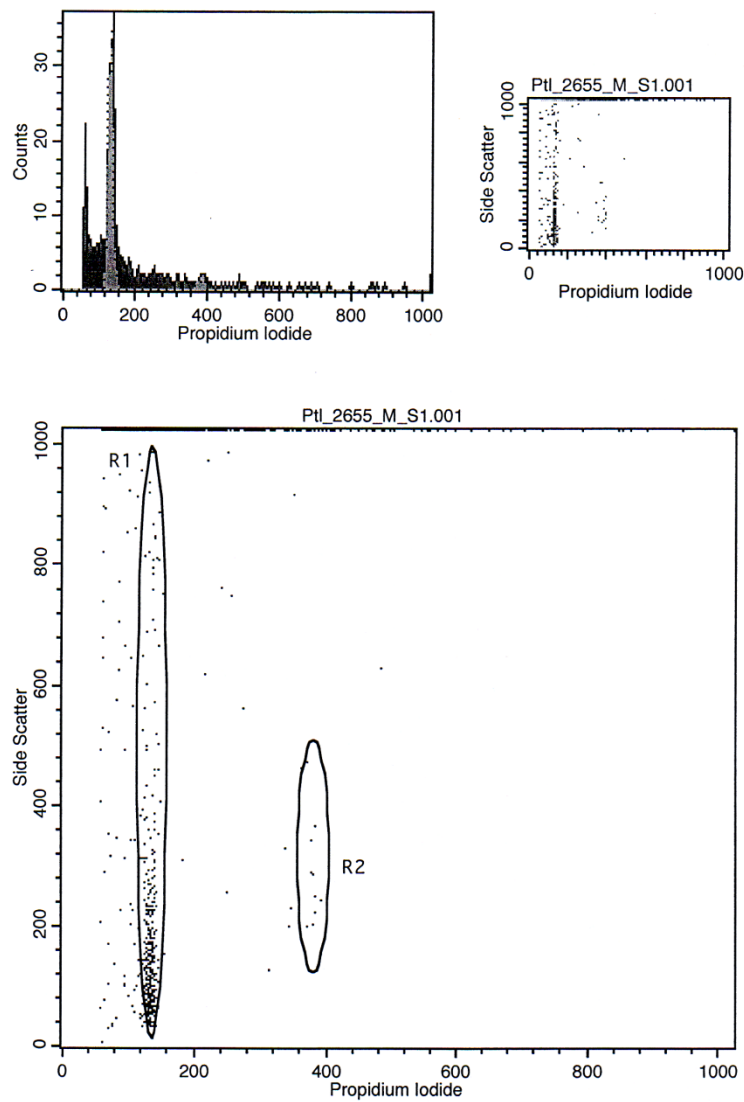
File: Ptl_2714_M_S1.015	Log Data Units: Linear Values
Sample ID: Ptl_2714_M_S1	Patient ID:
Tube: Untitled	Panel: Untitled Acquisition Tube List
Acquisition Date: 01-Dec-09	Gate: No Gate
Gated Events: 975	Total Events: 975
X Parameter: Propidium Iodide (Linear)	Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	335	34.36	34.36	279.95	279.85	264.50	203.61	2, 1
R2	19	1.95	1.95	643.79	643.61	601.16	558.99	2, 1

Abbildung 29 FACSCalibur, *Potentilla norvegica* Ptl2714

***Potentilla nuttallii* Lehm.**

Aus den Messungen durch das FACSCalibur geht für Ptl2655 mit Verhältniswerten von 2,85 und 2,94 Apomixis hervor. Durch den Ploidy Analyser konnte keine Messung des Endosperms erzielt werden.



Region Statistics

File: Pt1_2655_M_S1.001
 Sample ID: Pt1_2655_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 02-Dec-09
 Gated Events: 945
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 945
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	387	40.95	40.95	133.93	133.82	193.64	140.44	2, 1
R2	11	1.16	1.16	381.73	381.66	273.82	261.22	2, 1

Abbildung 30 FACSCalibur, *Potentilla nuttallii* Pt12655

Potentilla ornithopoda Tausch

Für beide Populationen konnte an beiden Messgeräten Apomixis festgestellt werden. Die aus den Messungen errechneten Größenverhältnisse von embryonaler zu endospermaler DNA reichen von 3,07 (Ptl2716, FACSCalibur) bis 3,95 (Ptl2715, Ploidy Analyser).

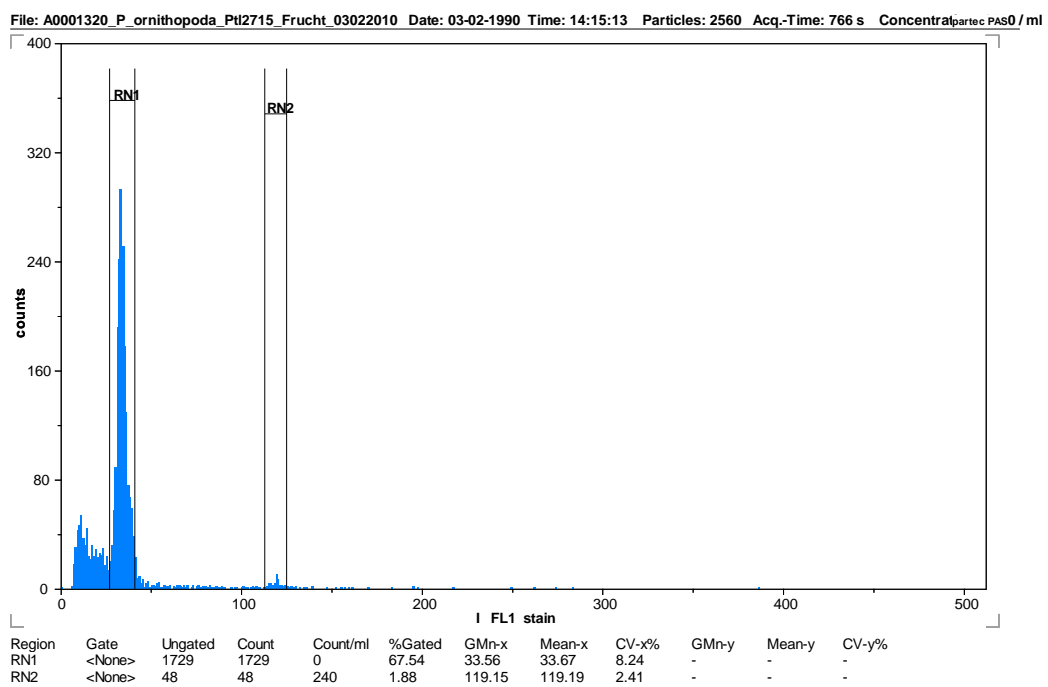


Abbildung 31 Ploidy Analyser, *Potentilla ornithopoda* Ptl2715

File: A0001324_P_ornithopoda_Ptl2716_Frucht_03022010 Date: 03-02-1990 Time: 15:06:19 Particles: 2412 Acq-Time: 691 s Concentralpartec PAS5 / ml

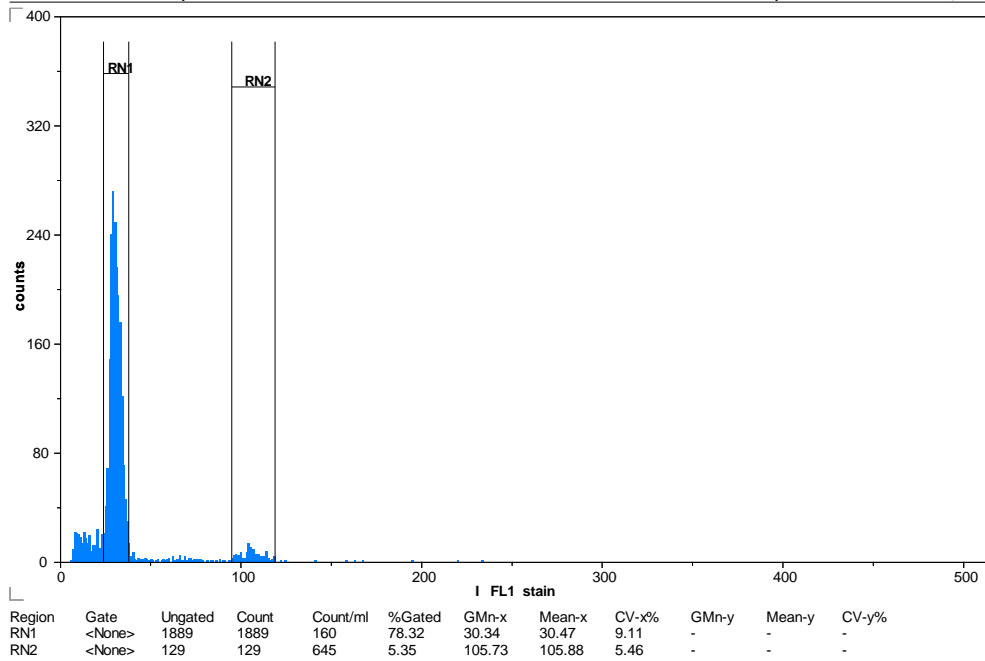
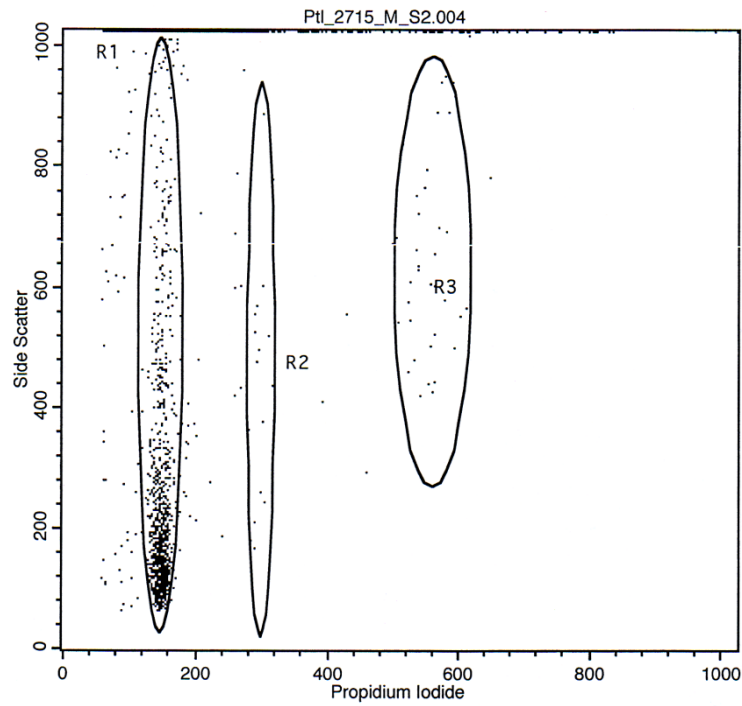
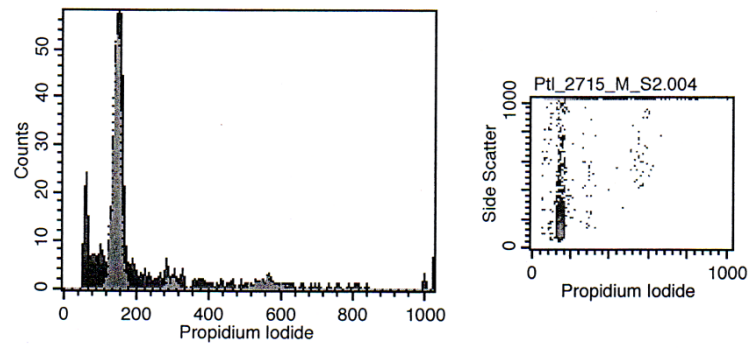


Abbildung 32 Ploidy Analyser, *Potentilla ornithopoda* Ptl2716



Region Statistics

File: Ptl_2715_M_S2.004 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Ptl_2715_M_S2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 02-Dec-09 Gate: No Gate
 Gated Events: 1935 Total Events: 1935
 X Parameter: Propidium iodide (Linear) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	1085	56.07	56.07	147.97	147.72	238.56	189.56	2, 1
R2	18	0.93	0.93	295.78	295.59	403.33	358.86	2, 1
R3	34	1.76	1.76	553.15	552.54	633.09	616.43	2, 1

Abbildung 33 FACSCalibur, *Potentilla ornithopoda* Ptl2715

Potentilla pensylvanica

Für *Potentilla pensylvanica* L., Ptl2656, geht aus den Messungen durch das FACSCalibur Apomixis hervor, wobei bei der zweiten Messung keine eindeutige Eingrenzbarkeit gegeben war und das Verhältnis zwischen 2,69 und 2,94 liegt.

Potentilla pensylvanica Welsh. & Johnston, Ptl2765, wurde an beiden Geräten als sexuell bestimmt.

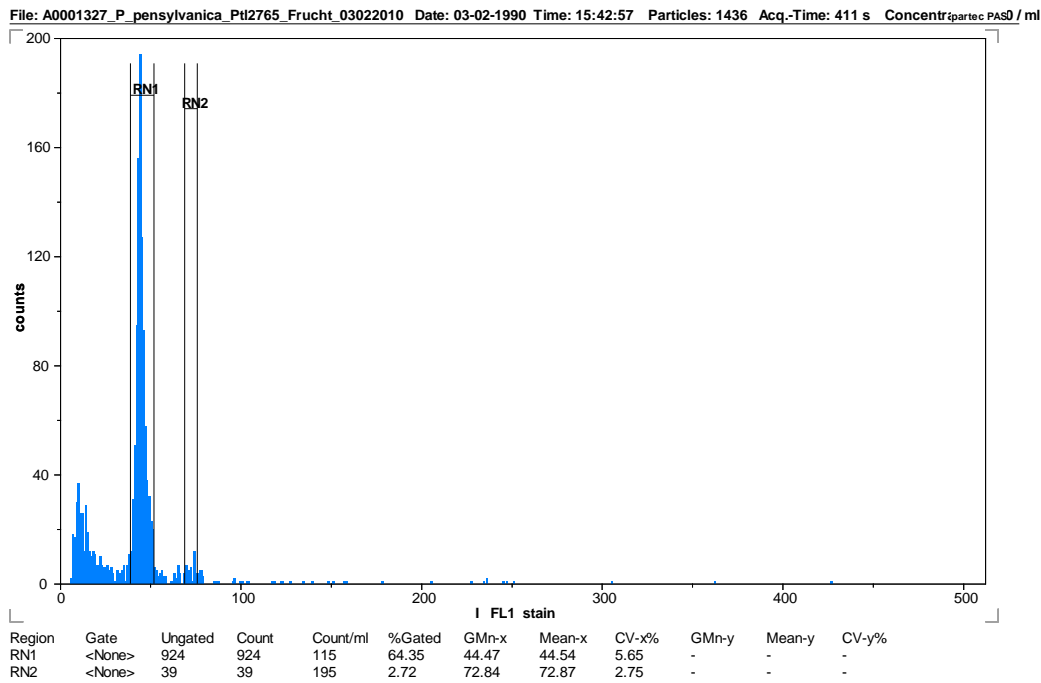
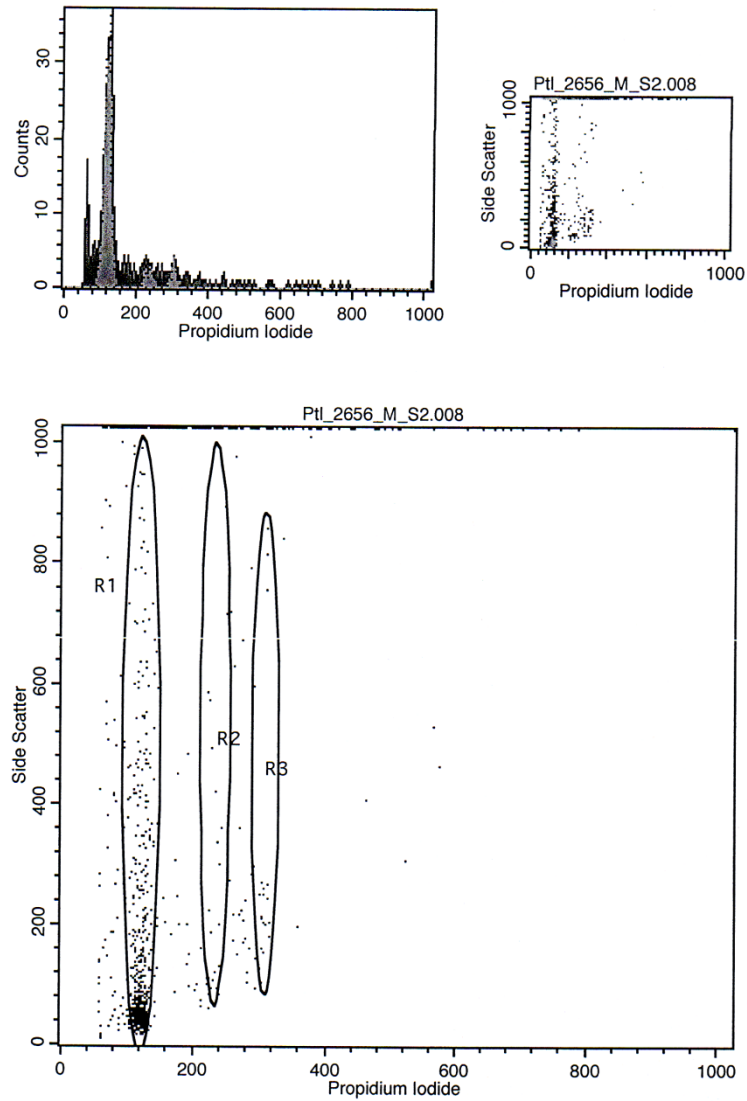


Abbildung 34 Ploidy Analyser, *Potentilla pensylvanica* Ptl2765



Region Statistics

File: Pt1_2656_M_S2.008
 Sample ID: Pt1_2656_M_S2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 02-Dec-09
 Gated Events: 1005
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 1005
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	559	55.62	55.62	120.83	120.54	165.73	93.87	2, 1
R3	21	2.09	2.09	307.10	307.03	307.19	251.91	2, 1
R2	22	2.19	2.19	235.27	235.10	301.77	231.01	2, 1

Abbildung 35 FACSCalibur, *Potentilla pensylvanica* Pt12656

***Potentilla pulcherrima* Lehm.**

Bei geringer Zahl gemessener Zellkerne des Endosperms ergaben die Messungen durch den Ploidy Analyser mit Verhältniswerten von 3,33 und 3,24 Apomixis. Das am FACSCalibur erzielte Ergebnis eines Verhältnisses von 2,22 kann sowohl von einem apomiktisch entstandenen Endosperm als auch einer G2-Phase embryonaler Kerne stammen.

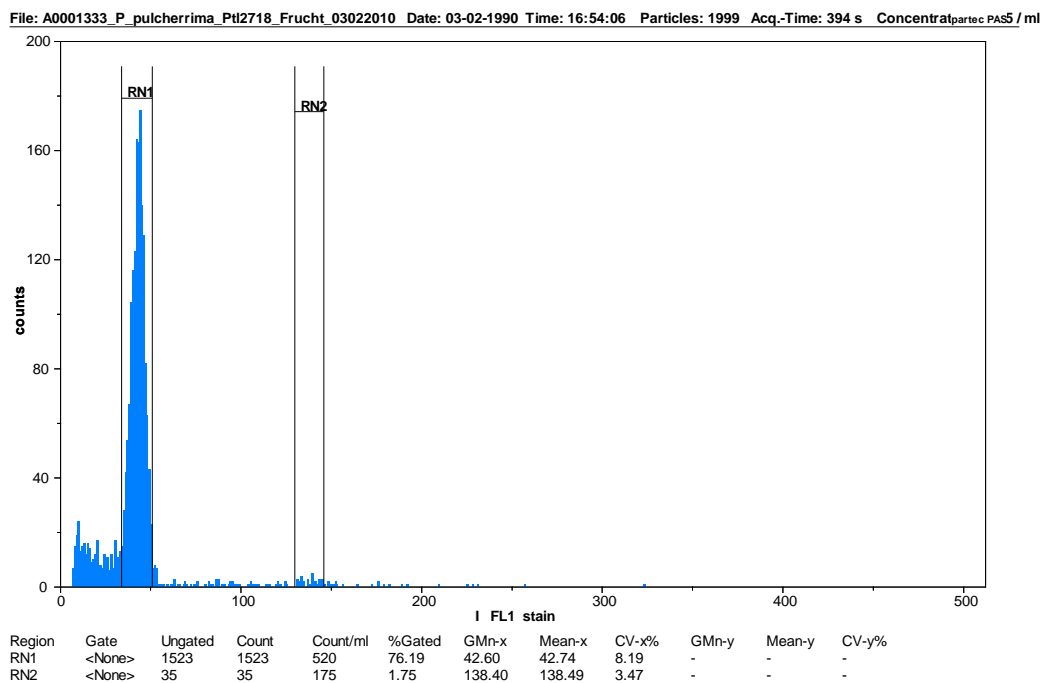
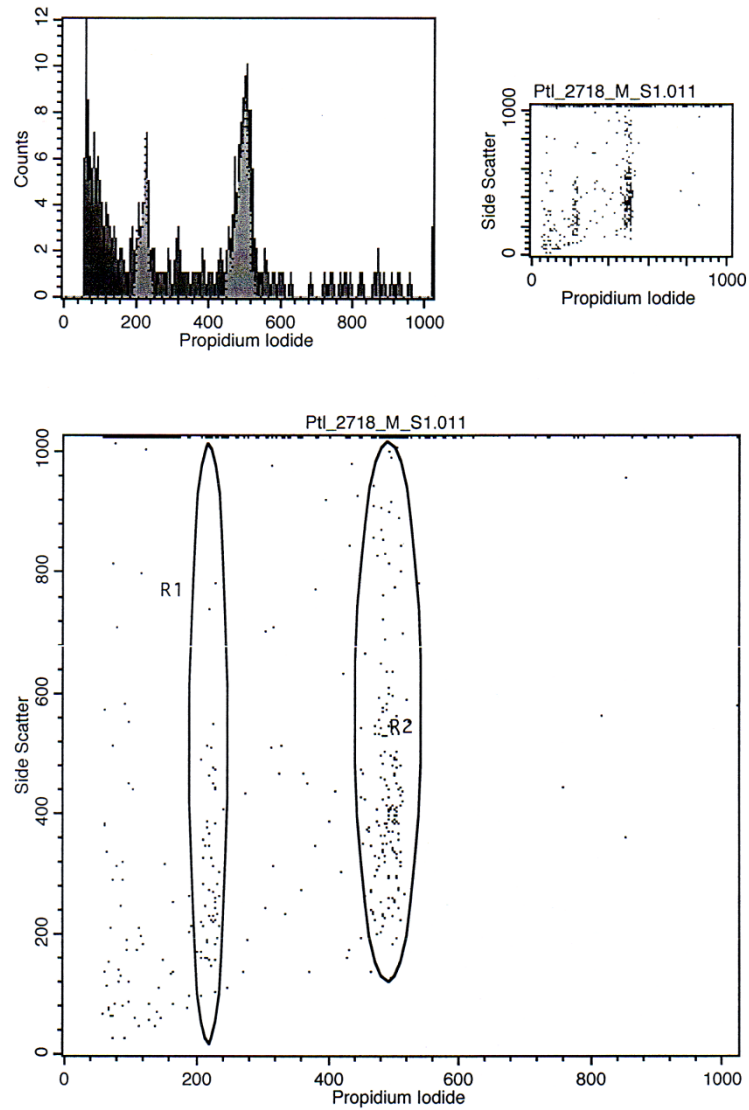


Abbildung 36 Ploidy Analyser, *Potentilla pulcherrima* Ptl2718



Region Statistics

File: Ptl_2718_M_S1.011
 Sample ID: Ptl_2718_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 02-Dec-09
 Gated Events: 630
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

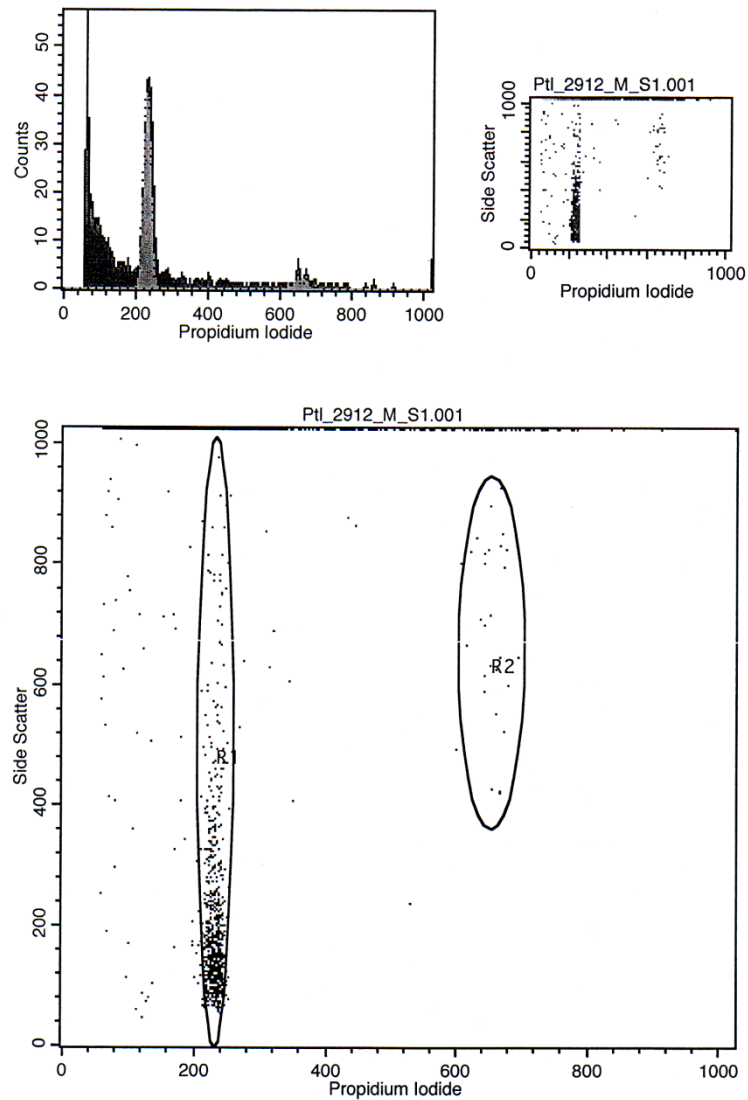
Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 630
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px/Py
R1	57	9.05	9.05	221.26	221.10	305.88	276.55	2, 1
R2	172	27.30	27.30	490.90	490.65	452.13	418.16	2, 1

Abbildung 37 FACSCalibur, *Potentilla pulcherrima* PtI2718

Potentilla recta L.

Alle Messungen die in vollem Umfang auswertbar waren ergaben Apomixis. Das heißt von sieben gemessenen Populationen konnte für vier durch das FACSCalibur Apomixis festgestellt werden. Vergleicht man die Daten der Populationen Ptl2811 (2,87 & 2,85) und Ptl2929 (3,05 & 3,01) so besteht zwischen den Populationen ein größerer gemessener Unterschied im Größenverhältnis der DNA der beiden Zelltypen als innerhalb der betreffenden Populationen. Bei den Messungen zweier Populationen durch den Ploidy Analyser konnte jeweils nur Fluoreszenz embryonaler Zellkerne bestimmt werden.



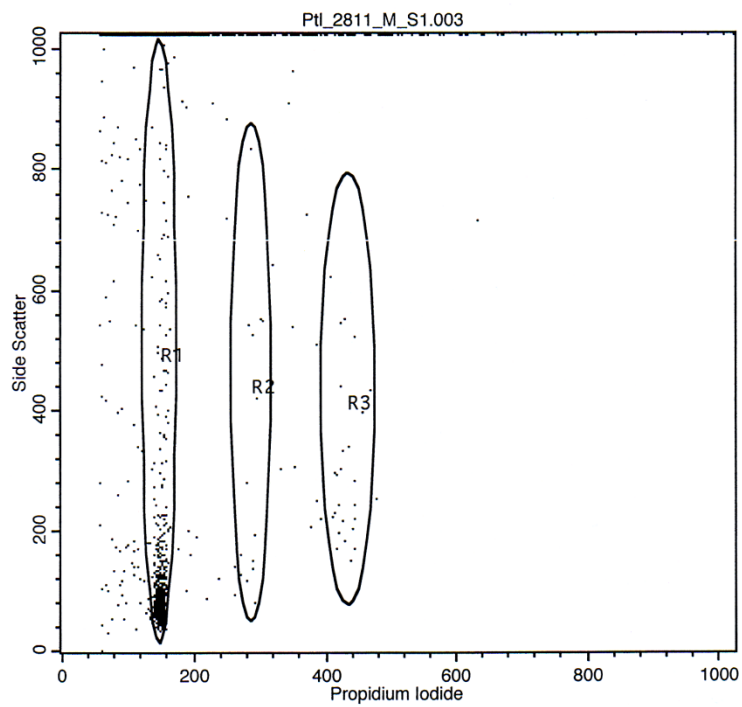
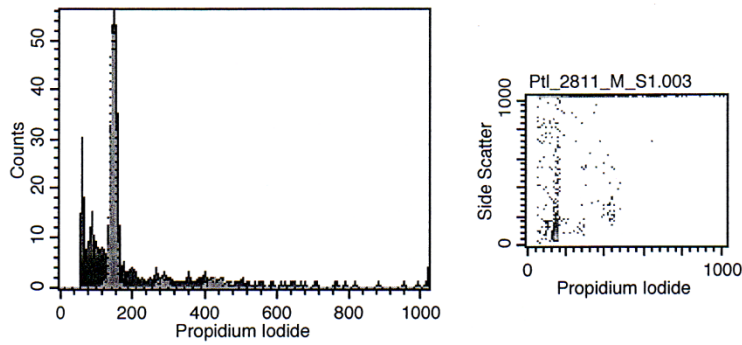
Region Statistics

File: Ptl_2912_M_S1.001
 Sample ID: Ptl_2912_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 03-Dec-09
 Gated Events: 2010
 X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 2010
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	792	39.40	39.40	231.39	231.24	207.86	172.57	2, 1
R2	27	1.34	1.34	655.30	655.05	692.11	675.68	2, 1

Abbildung 38 FACSCalibur, *Potentilla recta* Ptl2912



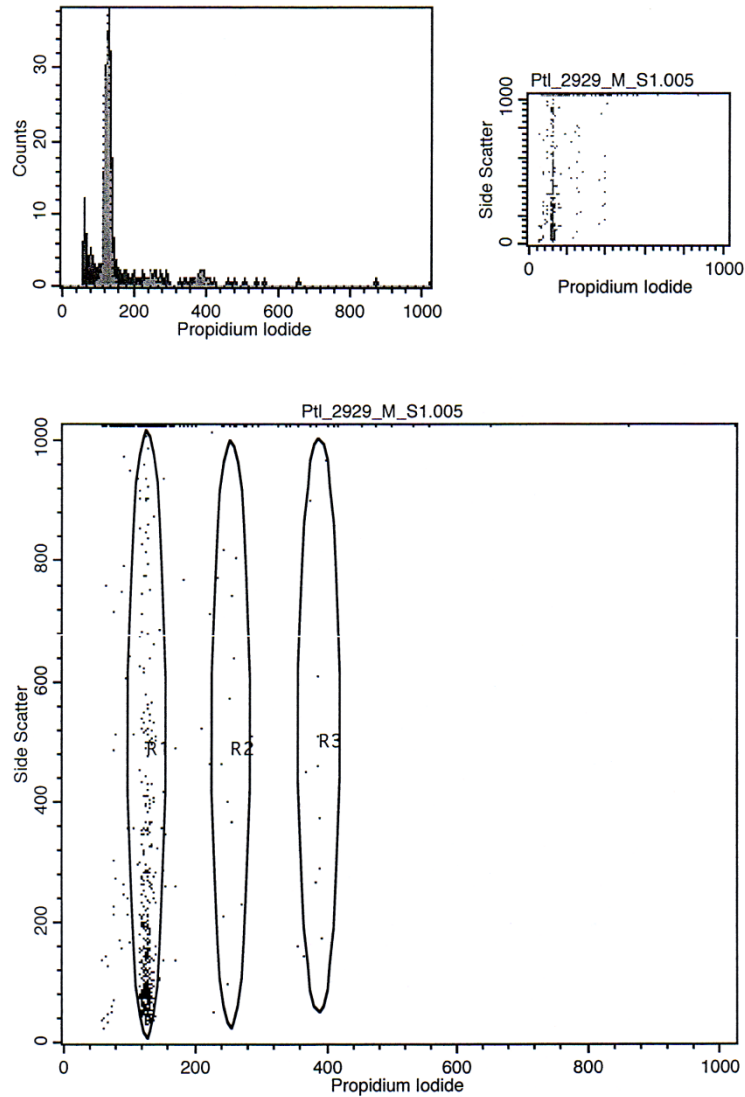
Region Statistics

File: Ptl_2811_M_S1.003
 Sample ID: Ptl_2811_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 03-Dec-09
 Gated Events: 1470
 X Parameter: Propidium Iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 1470
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	705	47.96	47.96	149.29	149.20	124.90	93.48	2, 1
R2	14	0.95	0.95	287.21	287.06	332.71	258.86	2, 1
R3	27	1.84	1.84	428.26	427.93	308.00	284.69	2, 1

Abbildung 39 FACSCalibur, *Potentilla recta* Ptl2811



Region Statistics

File: Ptl_2929_M_S1.005
 Sample ID: Ptl_2929_M_S1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 03-Dec-09
 Gated Events: 675
 X Parameter: Propidium iodide (Linear)

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 675
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	PxPy
R1	453	67.11	67.11	126.41	126.26	217.13	144.52	2, 1
R3	10	1.48	1.48	385.90	385.79	498.90	440.38	2, 1
R2	12	1.78	1.78	251.58	251.40	508.08	431.22	2, 1

Abbildung 40 FACSCalibur, *Potentilla recta* Ptl2929

***Potentilla villosa* Pall. ex Pursh**

Eine Messung durch den Ploidy Analyser deutet mit einem Ergebnis von 3,37 auf Apomixis hin. Durch das FACSCalibur war keine zuordenbare Fluoreszenz messbar.

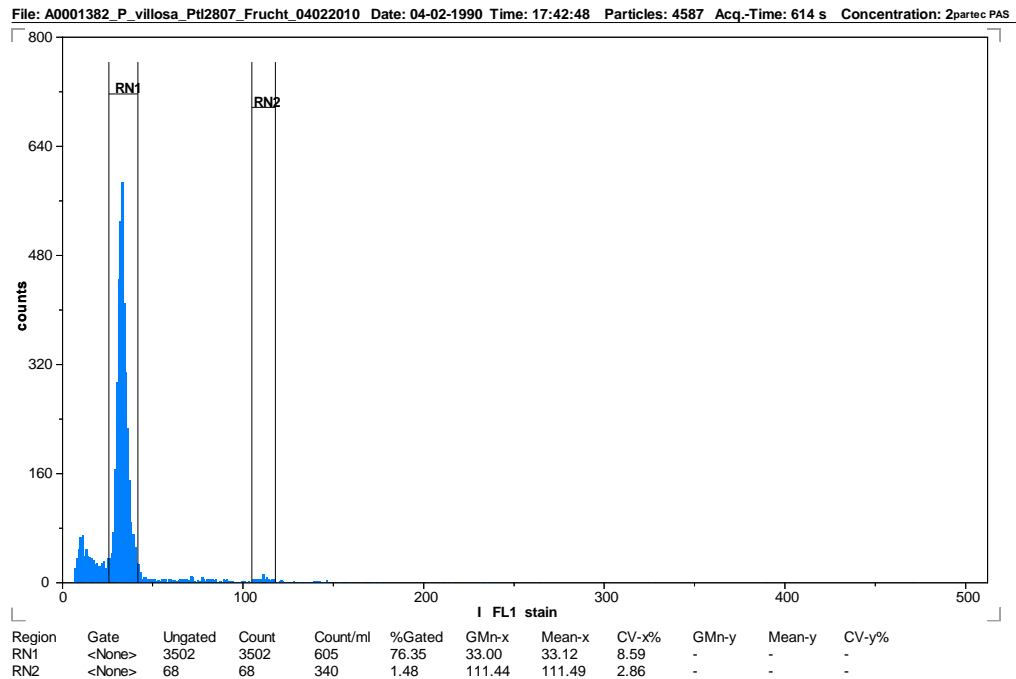


Abbildung 41 Ploidy Analyser, *Potentilla villosa* Pt12807

4.2 MIKROSKOPIE

Nach der in Kapitel 3 Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweise konnten Schnitte und mikroskopische Dauerpräparate angefertigt werden. Aus Fotos von Längsschnitten in 40facher Vergrößerung wurde aus diesen Präparaten ein morphologisches Modell der *Potentilla*-Früchtchen konstruiert.



Abbildung 42 Beispiel eines der zur Konstruktion des morphologischen Modells verwendeten Längsschnittes, *Potentilla velutina*

Bei Betrachtung der Präparate in stärkeren Vergrößerungen lassen sich die Gewebe anatomisch charakterisieren. Die Dokumentation und Darstellung erfolgte in Form von Fotos und Zeichnungen. Die Zeichnungen wurden bei 400facher sowie 600facher Vergrößerung angefertigt. Hier abgedruckt entsprechen sie dem 400fachen der tatsächlichen Größe. Zur Charakterisierung der Fruchtwand haben sich die Färbungen als hilfreich erwiesen.

4.2.1 MORPHOLOGIE

Es zeigte sich, dass der zweikeimblättrige Embryo mit Keimwurzel (Radicula) von einem schmalen, aber klar zu erkennenden und abgrenzbaren Endosperm umgeben ist. An dieses schließt sich über weite Strecken nahtlos eine wenige Zellen dicke Schicht an, die dem unter „Durchflusszytometrie“ beschriebenen „rosa Häutchen“ entspricht. Hierbei handelt es sich um die Samenschale (Testa). Die äußerste Schicht des Früchtchens bildet die Fruchtwand. Fotos größerer Vergrößerungen lassen vermuten, dass es sich bei der von mir als zuäußerst liegend gezeichneten um Exo- und Mesokarp der Fruchtwand (Perikarp) handelt. Die bei größeren Vergrößerungen als heterogen erkennbare, noch näher zu bestimmende Schicht darunter fasse ich als Endokarp der Fruchtwand auf.

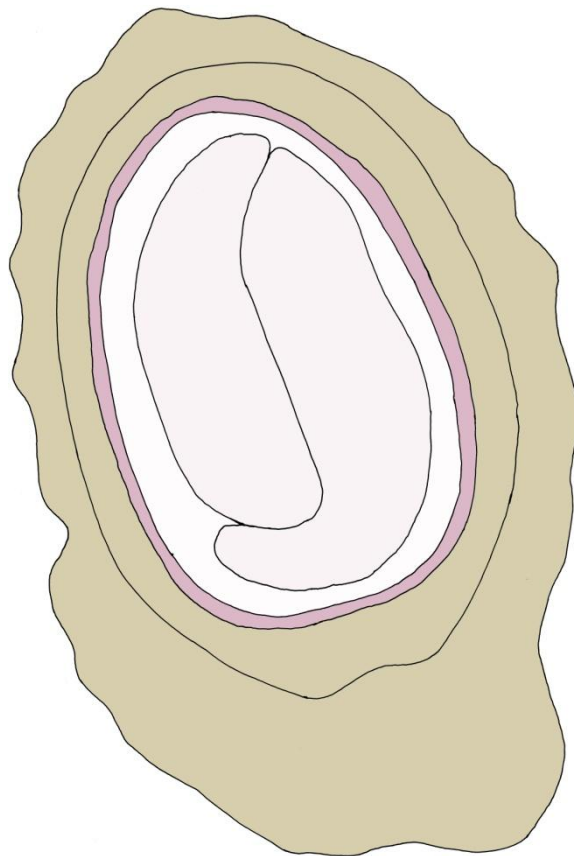


Abbildung 43 morphologisches Modell eines *Potentilla*-Früchtchens, farbig

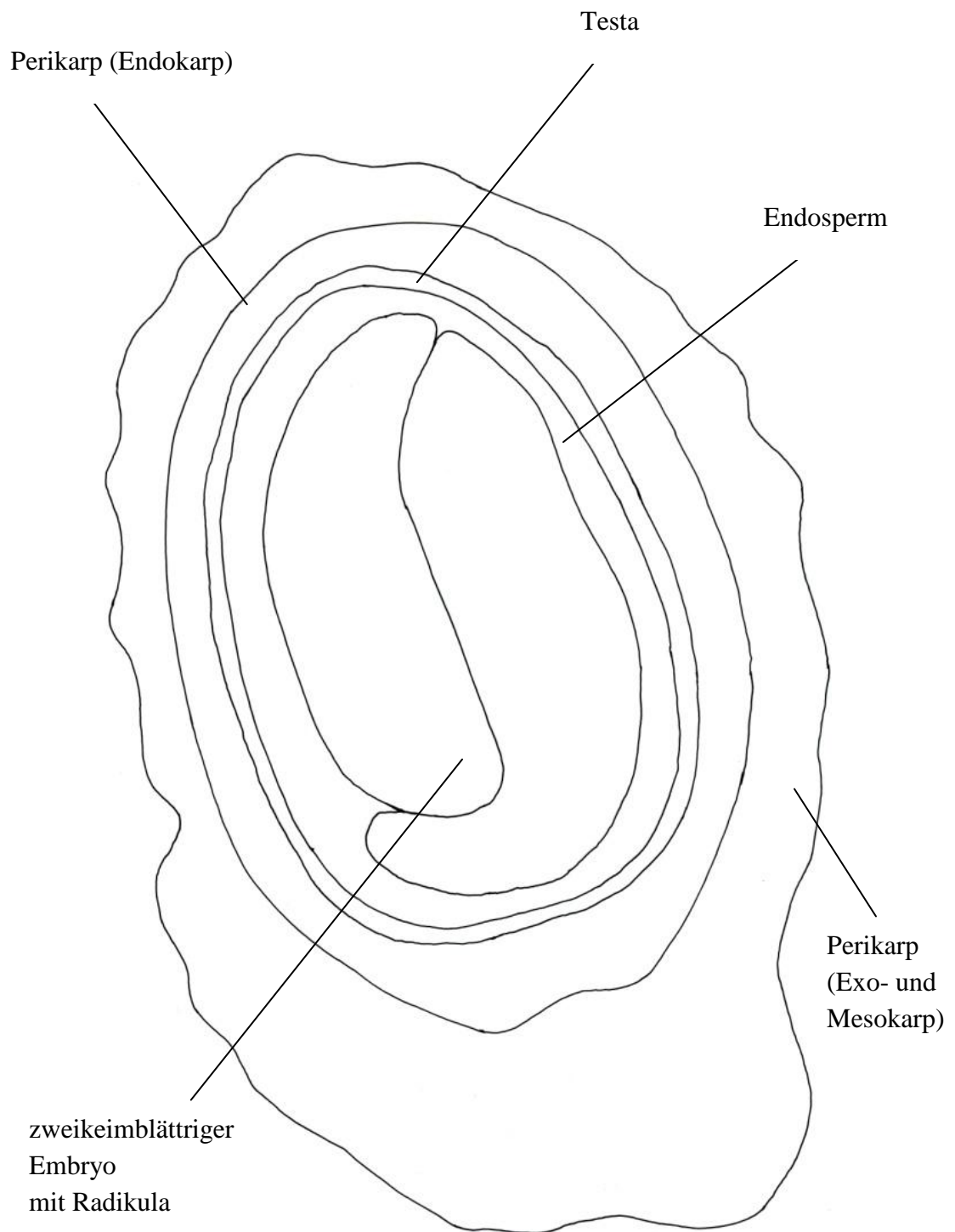


Abbildung 44 morphologisches Modell eines *Potentilla*-Früchtchens

Dunkelfeld und Polarisation erleichtern die Unterscheidung der einzelnen Schichten.

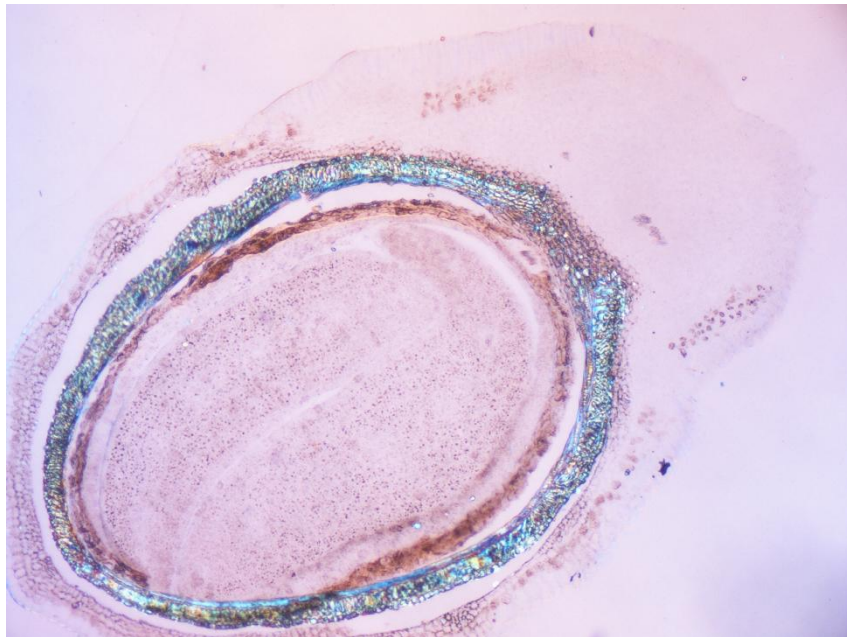


Abbildung 45 Schnitt eines Früchtchens, *Potentilla velutina* (10x vergrößert, Dunkelfeld)

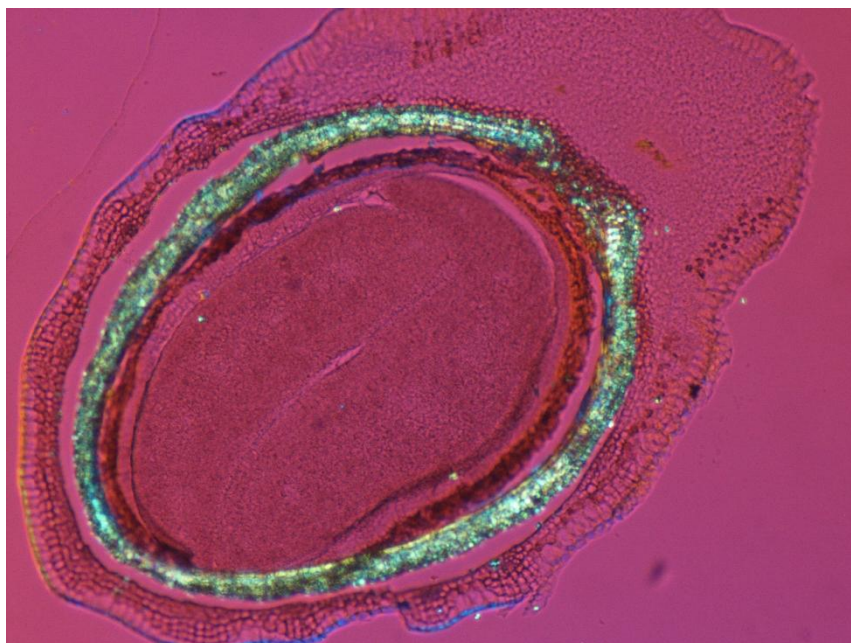


Abbildung 46 Schnitt eines Früchtchens, *Potentilla velutina* (10x vergrößert, polarisiert + Dunkelfeld)

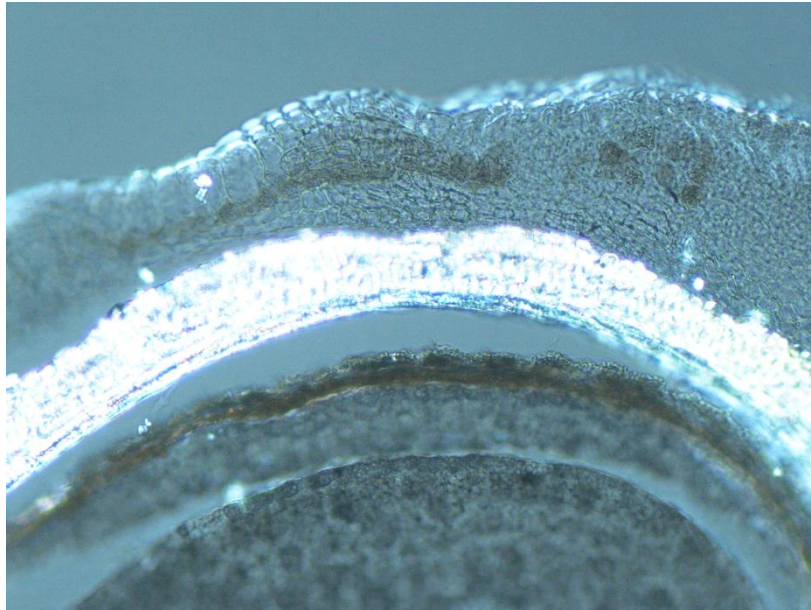


Abbildung 47 Schnitt eines Früchtchens, *Potentilla velutina* (100x vergrößert, Dunkelfeld)

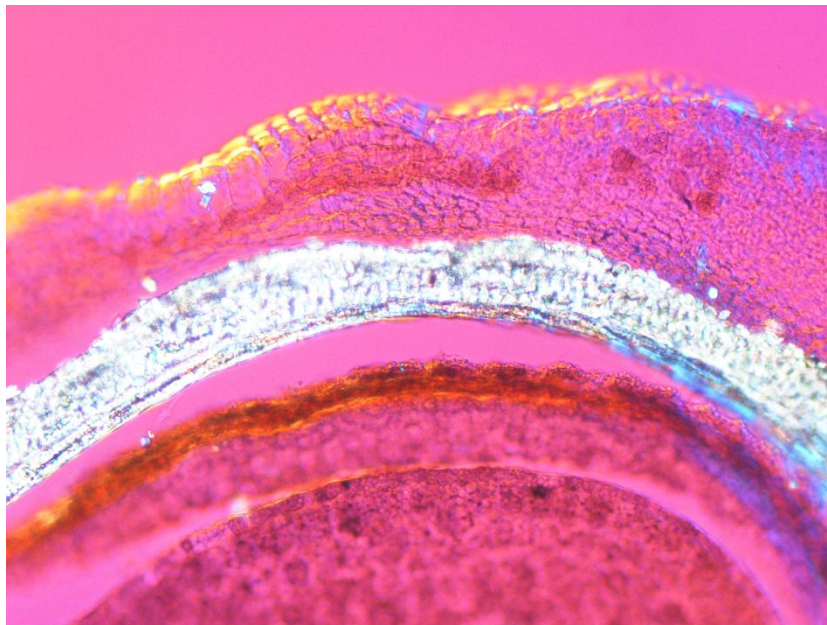


Abbildung 48 Schnitt eines Früchtchens, *Potentilla velutina* (100x vergrößert, polarisiert)

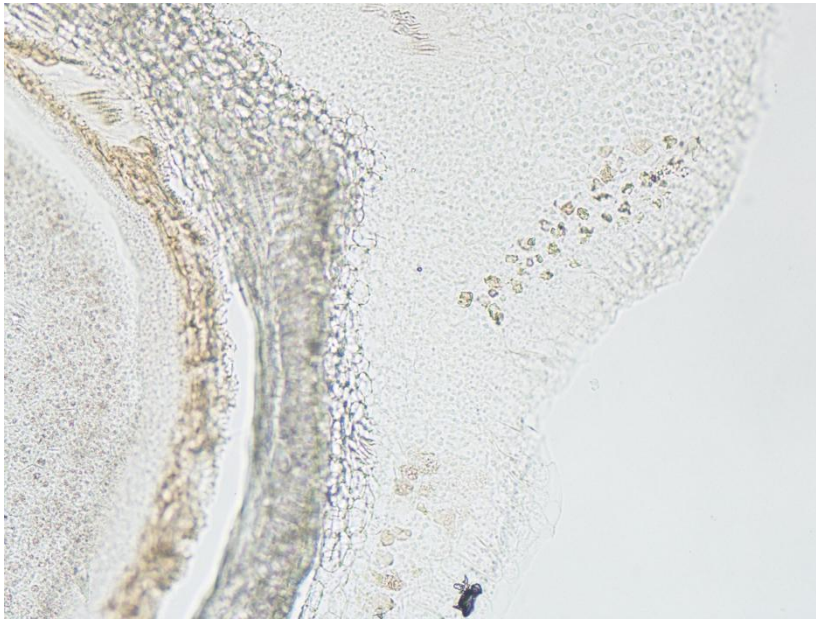


Abbildung 49 Schnitt eines Früchtchens, *Potentilla velutina* (100x vergrößert)

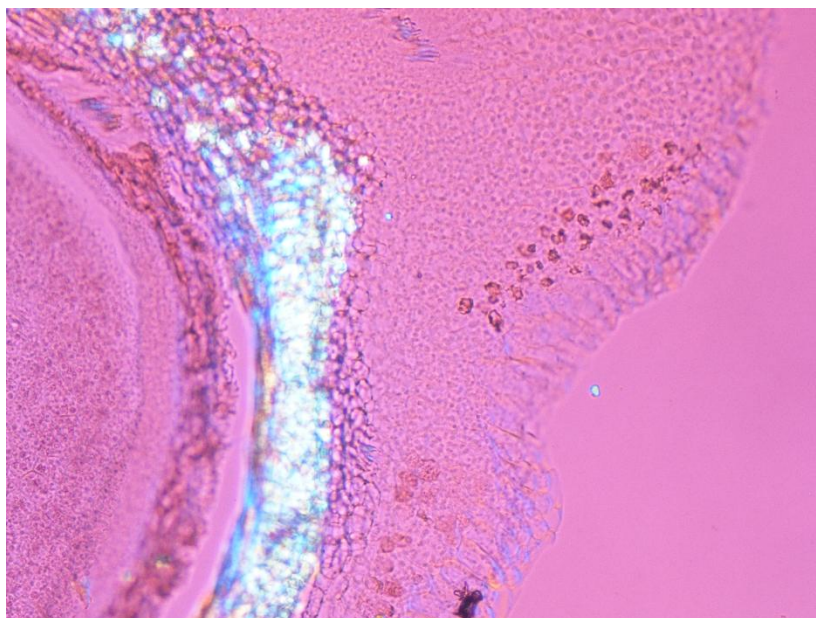


Abbildung 50 Schnitt eines Früchtchens, *Potentilla velutina* (100x vergrößert, polarisiert)

4.2.2 ANATOMIE

Die Betrachtung der Präparate bei stärkeren Vergrößerungen gibt Aufschluss über die Beschaffenheit der Zellen der einzelnen Schichten.

Aus der optischen Interpretation ergibt sich im Zusammenhang mit dem morphologischen Modell folgende mögliche Zuordnung:

Die dreischichtige Fruchtwand ist von einer Cuticula umgeben. Nach innen schließt sich das aus einer bis zwei Zellschichten bestehende Exokarp mit großlumigen Zellen an. Das Mesokarp besteht aus mittelgroßen bis kleinen parenchymatischen, unverdickten Zellen und verläuft wellenförmig unterhalb des Exokarps. Die innerste Schicht der Fruchtwand lässt sich wiederum in drei Schichten unterteilen. Von außen nach innen sind das: eine Reihe Einzelkristalle beinhaltender Zellen, sowie zwei jeweils bis zu dreireihige Schichten Fasern, die quer zueinander verlaufen. Die Testa besteht aus einer ein bis zwei Zellen starken Schicht länglich-ovaler bis rechteckiger Zellen. Die Zellen des Endosperms sind annähernd rechteckig und in klaren Reihen angeordnet. Das an sich dichte Gewebe enthält zahlreiche Interzellularen. Dagegen sind die Zellen des Embryos einander ohne Zwischenräume anliegend und weisen zweidimensional im Schnitt betrachtet viereckige bis sechseckige Formen auf.

Durch Astrablau wurden vor allem Cuticula und Exokarp der Fruchtwand gefärbt. Safranin färbte die gesamte Fruchtwand. Durch Phloroglucin trat lediglich bei den beiden Faserschichten eine Rotfärbung auf.

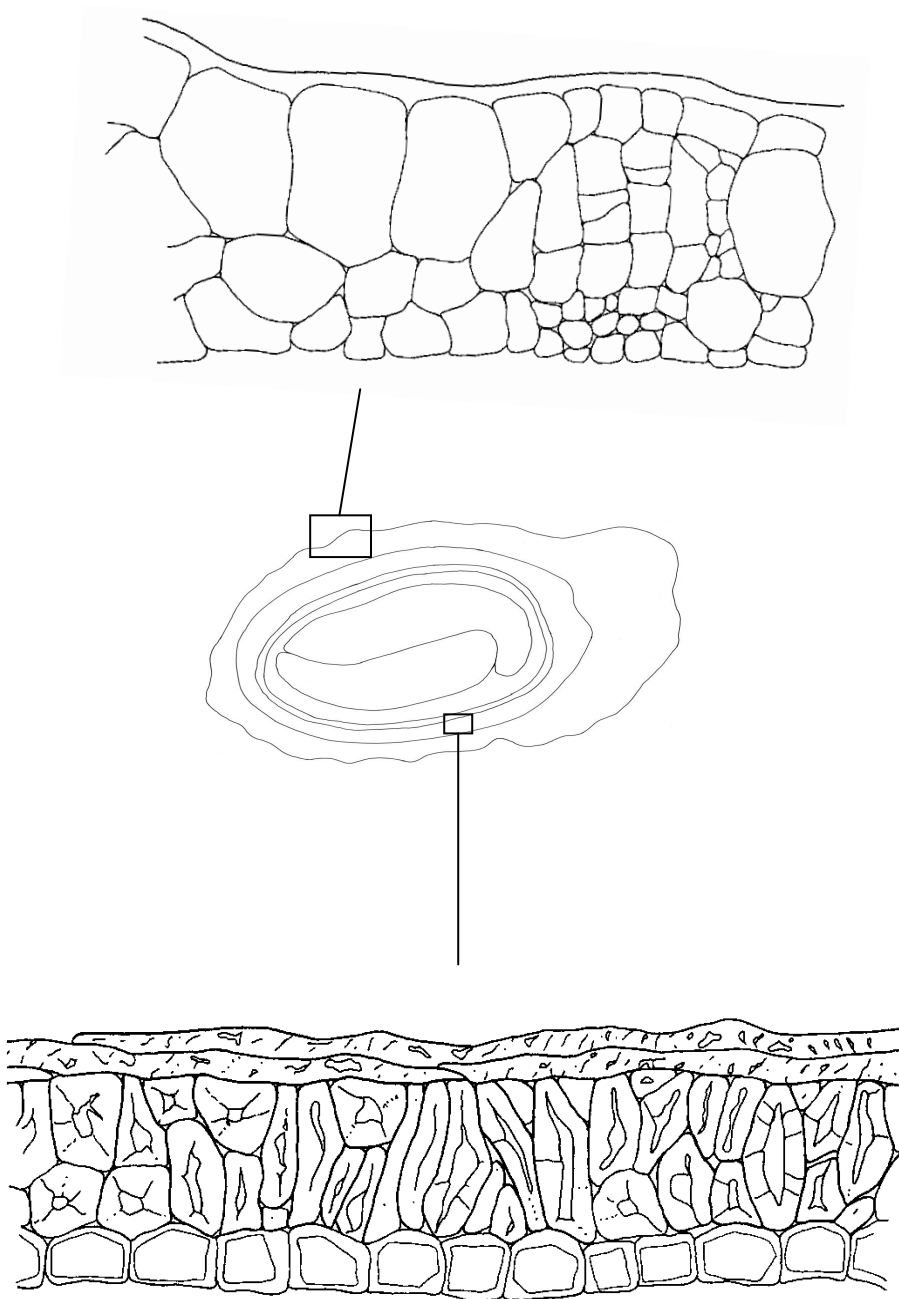


Abbildung 51 Zeichnung: Fruchtwand einer *Potentilla velutina* (400x vergrößert)

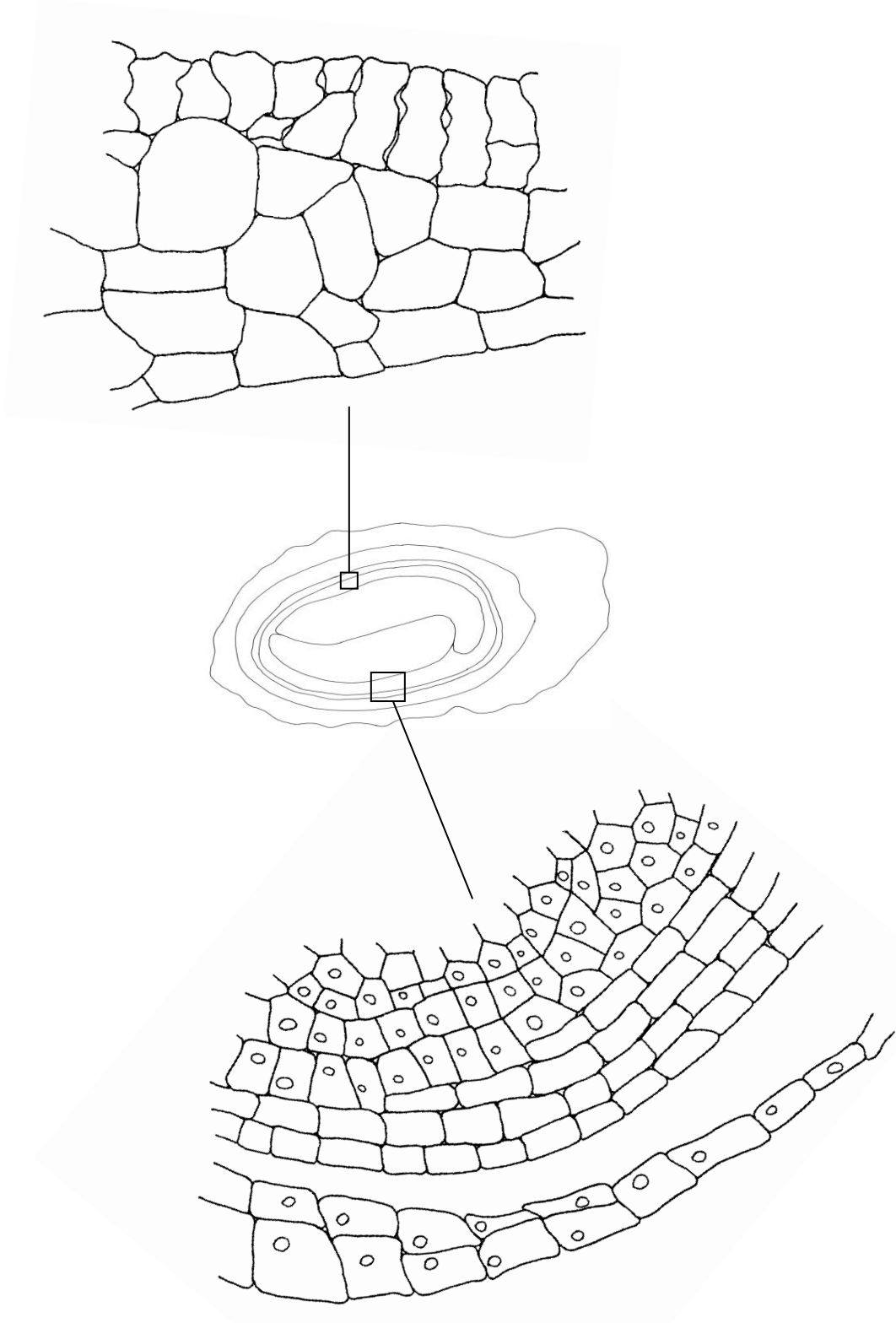


Abbildung 52 Zeichnung: Testa, Endosperm und Embryo einer *Potentilla velutina* (400x vergrößert)

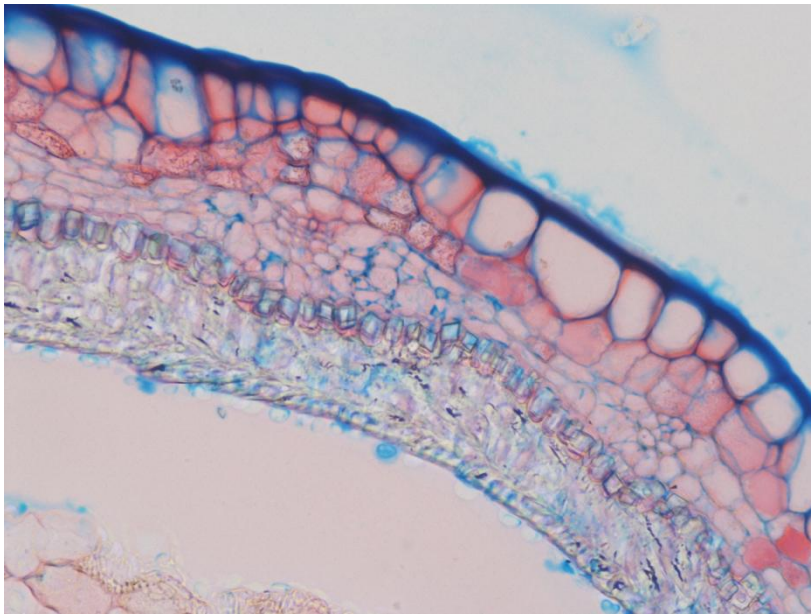


Abbildung 53 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (gefärbt mit Safranin & Astrablau, 200x vergrößert)

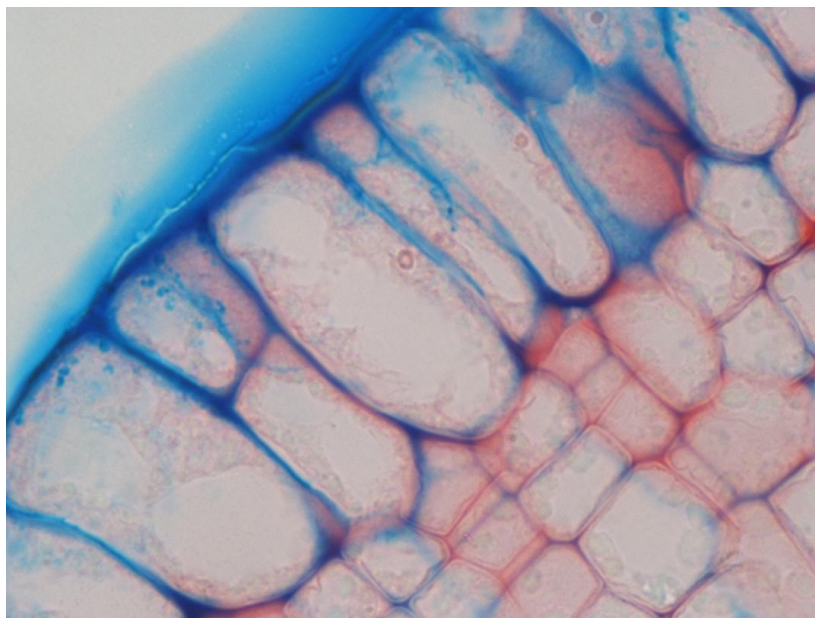


Abbildung 54 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (gefärbt mit Safranin & Astrablau, 400x vergrößert)

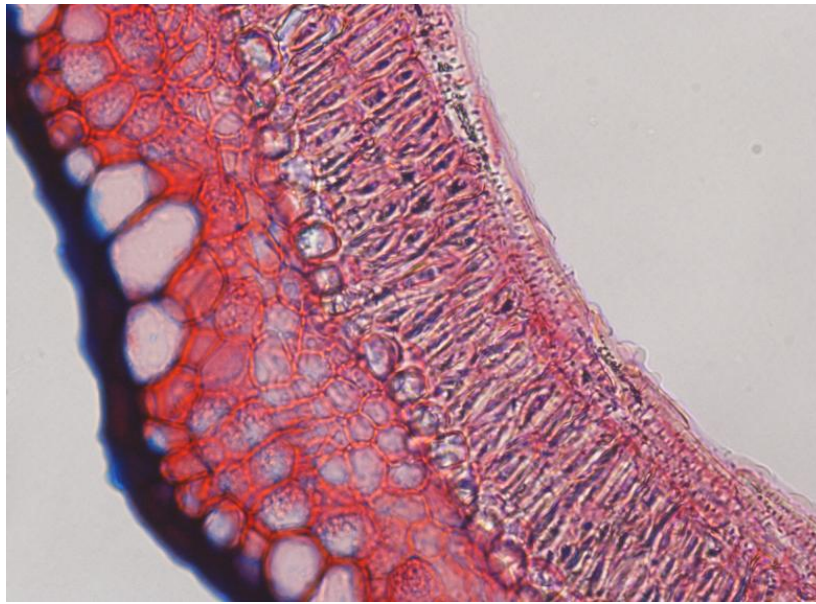


Abbildung 55 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (gefärbt mit Safranin & Astrablau, 200x vergrößert)

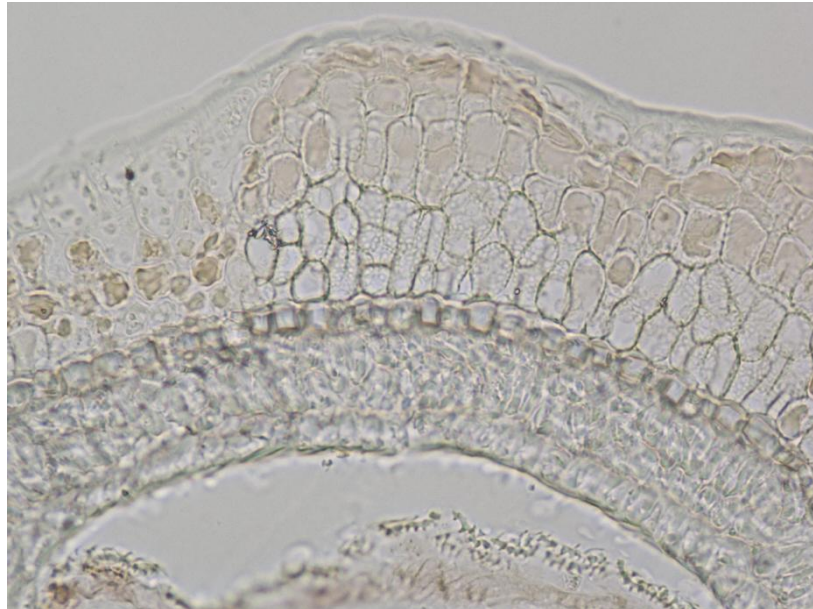


Abbildung 56 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (200x vergrößert)

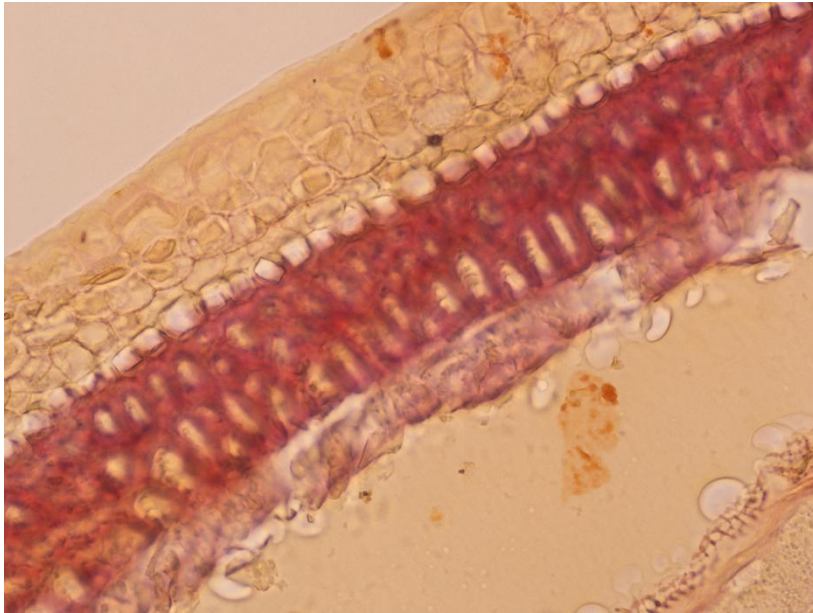


Abbildung 57 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (gefärbt mit Phloroglucin, 200x vergrößert)

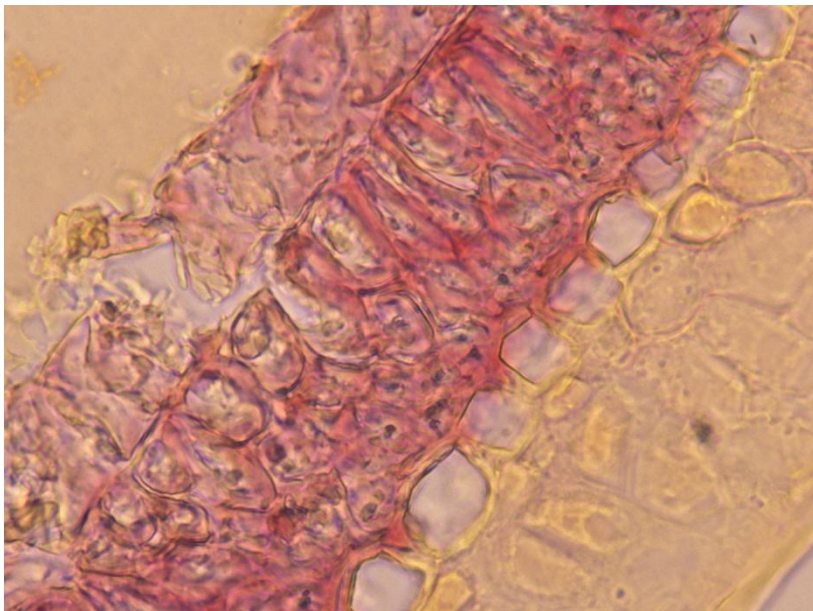


Abbildung 58 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (gefärbt mit Phlorogluchin, 400x vergrößert)

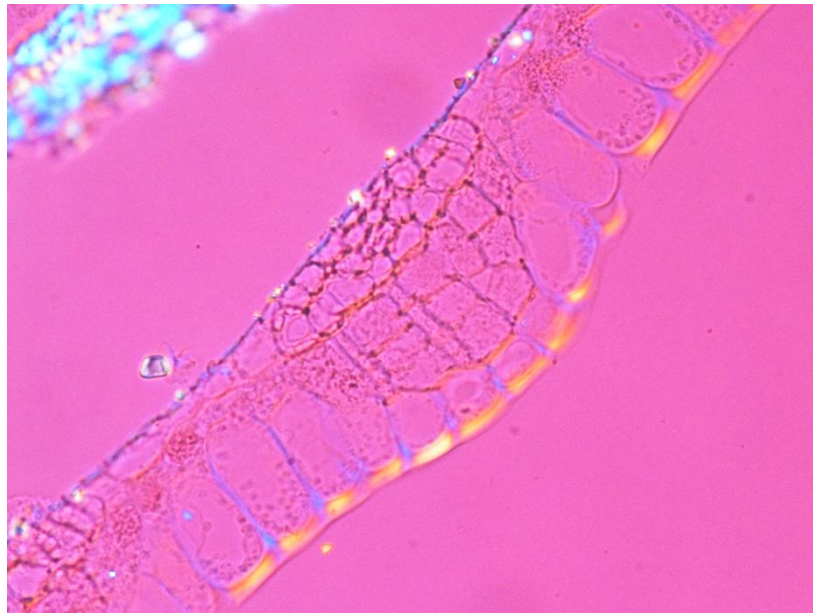


Abbildung 59 Fruchtwand, *Potentilla velutina* (polarisiert, 200x vergrößert)

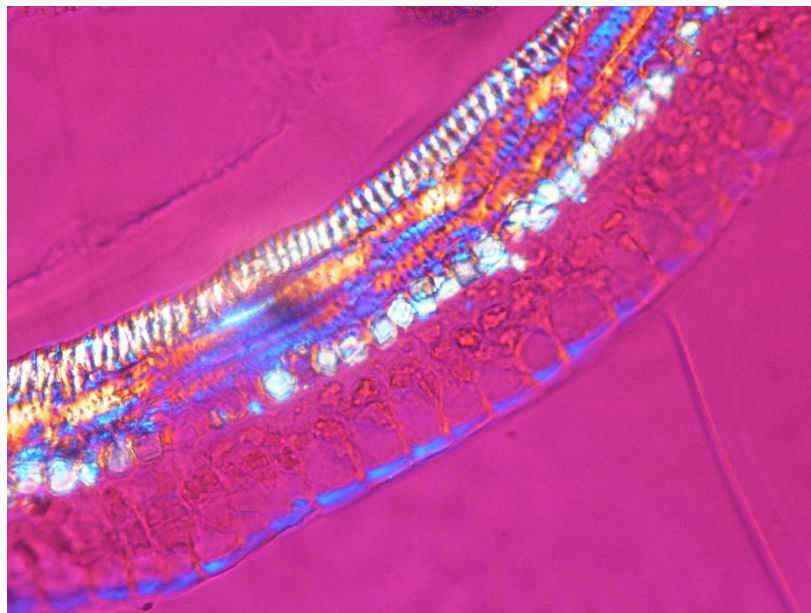


Abbildung 60 Fruchtwand, *Potentilla pusilla* (polarisiert, Dunkelfeld, 200x vergrößert)

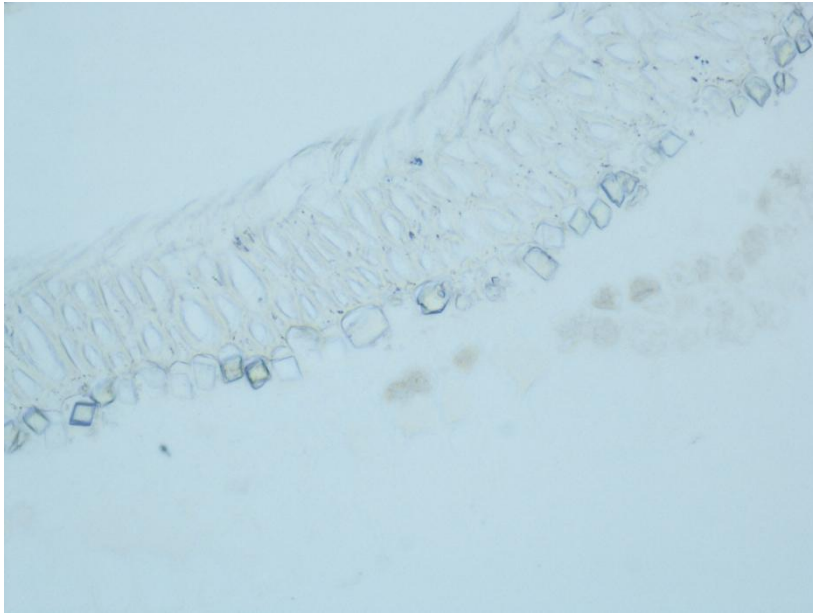


Abbildung 61 Fruchtwand, *Potentilla velutina* (200x vergrößert)

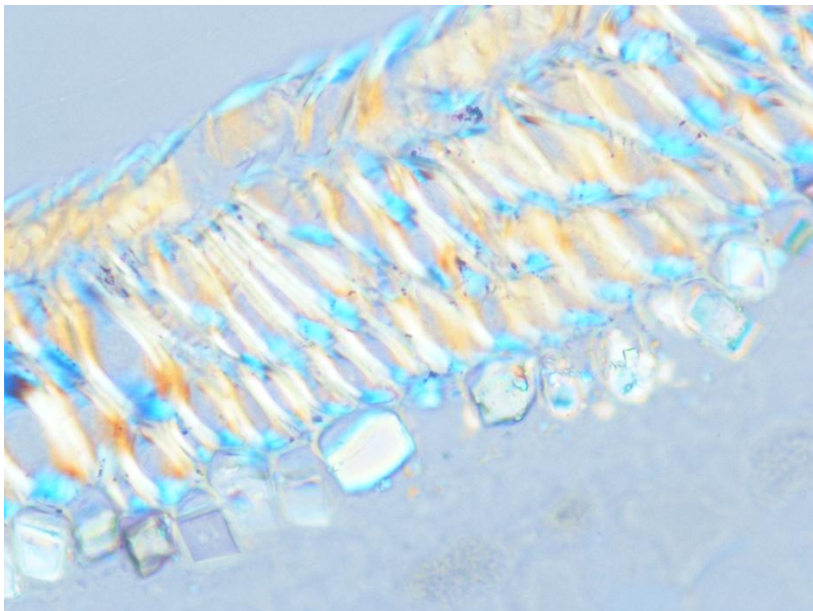


Abbildung 62 Fruchtwand, *Potentilla velutina* (Dunkelfeld, 600x vergrößert)

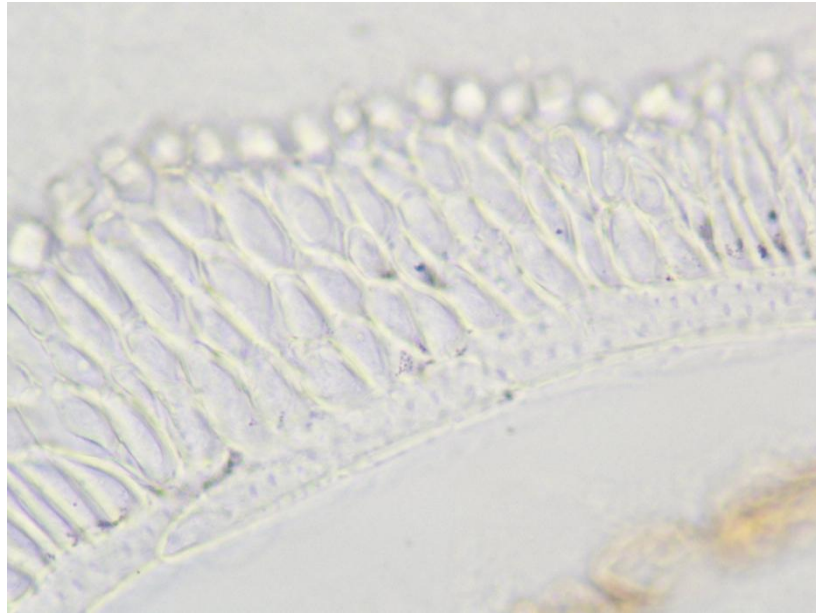


Abbildung 63 Fruchtwand, *Potentilla velutina* (200x vergrößert)

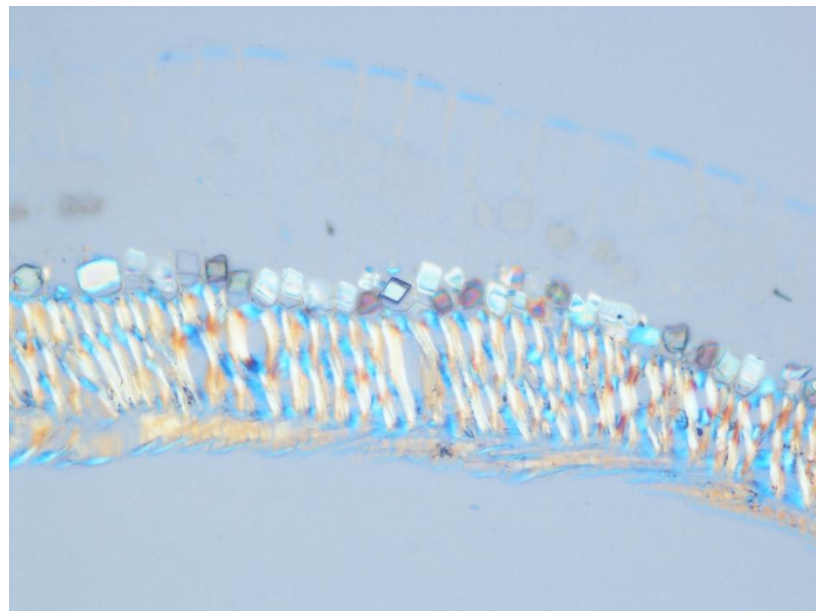


Abbildung 64 Fruchtwand, *Potentilla velutina* (Dunkelfeld, 200x vergrößert)

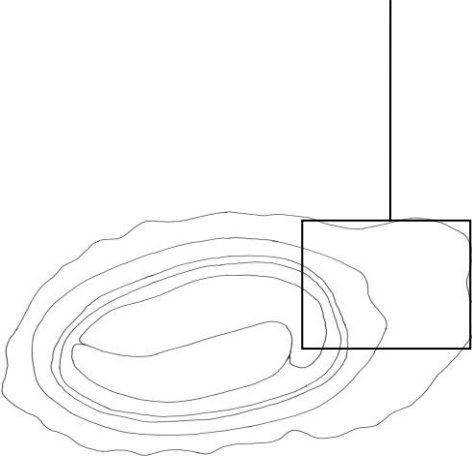
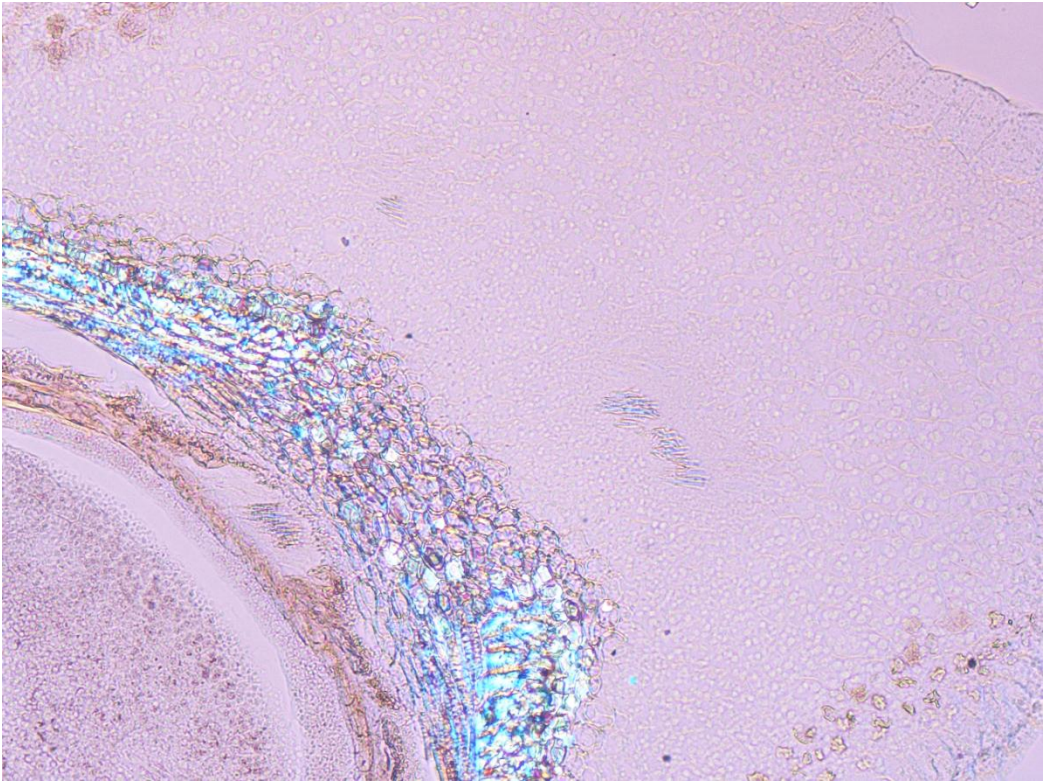


Abbildung 65 *Potentilla velutina* (Dunkelfeld, 100x)

5 DISKUSSION

Nachdem durch die Mikroskopie das Vorhandensein eines Endosperms nachgewiesen werden konnte und für beide Geräte ein passendes Puffersystem zur Extraktion der Zellkerne und durchflusszytometrischen Vermessung der DNA gefunden werden konnte, kann die Durchflusszytometrie als geeignete Methode zur Untersuchung des Fortpflanzungsmechanismus von *Potentilla sensu lato* bezeichnet werden. Die Ergebnisse des breiten, aber oberflächlichen Screenings weisen auf Zuverlässigkeit der Methode hin. Zur Erstellung mikroskopischer Präparate der Früchtchen war die aufwändigere Methode von Mikrotomschnitten zielführend. Die entstandenen Schnitte ermöglichen sowohl morphologische als auch anatomische Auswertung.

5.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Einen zeitaufwändigen Arbeitsschritt stellt das Aufschneiden und Betrachten durch das Binokular jedes einzelnen Früchtchens dar, um die Eignung als Probe festzustellen. Für dieses konnte in dieser Arbeit kein Ersatz gefunden werden. Vor allem bei Screenings größeren Umfangs könnte Poolen mehrerer Früchtchen zu einer Probe Abhilfe schaffen. Die Qualität meiner Proben, die im Rahmen des Saataustauschs vor allem aus den Beständen unterschiedlicher Botanischer Gärten stammen, war bei den meisten Populationen mit zwei geeigneten Früchtchen von zwei bis drei aufgeschnittenen sehr gut. Verglichen mit der anfänglichen Arbeit mit ganzen Rasierklingen hat das Vierteilen der Klingen deutliche Vorteile. Das Zerkleinern der Früchtchen in der kleinen Petrischale wird dadurch erleichtert und die Früchtchen sind besser im Auge zu behalten. Auch wird der Arbeitsschritt dadurch beschleunigt und der Materialaufwand vermindert. Erleichterung bei der Zerkleinerung der Früchtchen schafft des Weiteren ein vorheriges Benetzen der Proben mit Isolationspuffer und Zerhacken in der leicht schräg gehaltenen Petrischale. Bereits genügend kleines Material kann nach unten gespült und schwerer zu zerkleinernde Stücke durch den Puffer im unteren Rand der Schale nochmals benetzt werden.

Für beide Geräte hat sich dasselbe Puffersystem zur Isolierung der Zellkerne als einzig geeignet herausgestellt. Allerdings ist es zur Markierung der DNA mit DAPI erforderlich dieses bereits vor der Zerkleinerung und Isolation der Zellkerne dem Puffer zuzufügen. Die Färbung der Proben mit Propidiumiodid, das jeder Probe einzeln einige Minuten vor der Messung zugefügt wird, ist dahingehend aufwändiger, dass ein Zwischenschritt zum Abbau von RNA durch RNase nötig ist. In der Probe vorhandene RNA würde die Messung stören, da diese durch Propidiumiodid in gleicher Weise markiert wird wie DNA. Zu Überlegen wäre die Möglichkeit einer Messung derselben Proben an beiden Geräten und Markierung durch beide Farbstoffe, deren einer interkaliert während der andere spezifische Bindungen eingeht. Auch die der Isolierung

nachgehende Markierung durch Propidiumiodid, sowie die Haltbarkeit dieser Färbung über eine Nacht sprächen dafür.

Während der Ploidy Analyser speziell zur Arbeit mit pflanzlichem Material und hier wiederum fluoreszenzmarkierter pflanzlicher DNA entwickelt wurde, handelt es sich bei dem Gerät FACSCalibur um ein Durchflusszytometer das zum breiten Einsatz in der biomedizinischen Forschung und Diagnostik gedacht ist. Neben dem größeren Färbeaufwand durch Propidiumiodid macht es die längere Dauer der Inbetriebnahme des FACSCalibur nötig alle Proben eines Arbeitstages parallel vorzubereiten, während sich Proben zur Messung durch den Ploidy Analyser in etwa Fünfergruppen neben laufenden Messungen herstellen lassen. Zur Messung durch den Ploidy Analyser muss unter Umständen die Verstärkung des Signals der Genomgröße der Probe angepasst werden. Da für dieses Experiment lediglich das Verhältnis der beiden Fluoreszenzhäufungen zueinander von Bedeutung ist, sollte das Verstellen des gains keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Zu beachten wäre vielmehr, dass die *peaks* nach Möglichkeit im Linearitätsbereich des Geräts liegen. Außerdem ist bei längerer Einschaltdauer der Halogenlampe älterer Bauart des partec-Geräts ein Nachstellen der Signalverstärkung nötig. Auch die vergleichsweise rasche Ermüdung der Quecksilberdampfampe ist zu berücksichtigen. Bei der Aufzeichnung der Daten durch den Ploidy Analyser empfiehlt sich ein Abwarten eines Vorlaufs, der bei laufender Messung gelöscht wird.

Die Übertragung der Daten vom Gerät über Diskette auf den Computer und die nachträgliche Bearbeitung über das für Windows geeignete Programm FloMax Software© erleichtert die Auswertung durch den Ploidy Analyser erhobener Daten. Dagegen geschieht die Aufzeichnung der Daten des FACSCalibur unmittelbar durch einen angeschlossenen PC. Beobachtung der Messung und Bearbeitung der Daten erfolgen über das Macintosh-Programm CellQuest™ Pro. Die Auswertung durch dieses Programm ist um einiges langwieriger als die der durch den Ploidy Analyser gewonnenen Daten mittels FloMax. Allerdings bringt die Messung des SideScatters durch das FACSCalibur erhebliche Erleichterung bei der Eingrenzung der *peaks*, vor allem wenn die Messung artspezifisch starke Hintergrundfluoreszenz enthält.

Die Ergebnisse der beiden Geräte bezüglich Apomixis und Sexualität der einzelnen Populationen stimmen weitgehend überein. Auch die Häufigkeit der Messung lediglich eines embryonalen Zellkerns zuordenbaren *peaks* durch das eine Gerät, während durch das andere zumindest eine auswertbare Messung der betreffenden Population erhalten wurde, ist für beide Geräte annähernd gleich. Möglicherweise ist dies vor allem abhängig vom Reifegrad des zur Messung gebrachten Früchtchens. Eine statistische Auswertung der Daten wäre erst bei einer höheren Probenzahl von vier Messungen pro Population und Gerät möglich.

Ein Vergleich der Daten meiner Arbeit mit der phylogenetischen Einteilung durch Christoph Dobeš und Juraj Paule (Dobeš & Paule 2010) zeigt folgende Tendenzen: Alle gemessenen Populationen der Gattung *Sibbaldia*, das sind zwei Populationen *Sibbaldia cuneata*, eine Population *Sibbaldia cuneifolia*, sowie zwei Populationen *Sibbaldia tridantata*, waren sexuell. Von den sechs gemessenen Populationen der Gattung *Drymocallis* (je zwei Populationen der Arten *Drymocallis geoides*, *Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa* und *Drymocallis rupestris*) wurden fünf als sexuell und eine der beiden Populationen *Drymocallis geoides* (Ptl2895) durch beide Geräte als apomiktisch bestimmt. Erwartet wurde für den gesamten Stamm A, dem die Gattungen *Sibbaldia* und *Drymocallis* angehören, Sexualität. Der Verhältniswert von 6,12 bei einem Individuum der Art *Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa* wäre durch weitere Messungen der Population Ptl2756 noch näher zu betrachten. Für beide Populationen *Potentilla aurea* hat die Messung durch das FACSCalibur je ein sexuelles und ein apomiktisches Individuum ergeben, während durch den Ploidy Analyser lediglich auf Sexualität geschlossen werden kann. *Potentilla aurea* ist dem Kernstamm C zugeordnet. Für *Potentilla argentea* (Ptl2712), ebenfalls dem Stamm C angehörend, haben die Messungen Apomixis ergeben. Als gesichert apomiktisch kann *Potentilla ornithopoda* betrachtet werden. Für die innerhalb des Stammes C nahe verwandten Arten *Potentilla pulcherrima* und *Potentilla nuttallii* wurde beide Apomixis gefunden. Die beiden ebenfalls näher verwandten Arten *Potentilla umbrosa* und *Potentilla supina* sind den Messungen dieser Arbeit zufolge sexuell. Die Messungen der den Stämmen F und G zugeordneten Arten *Potentilla erecta* und *Potentilla nitida* haben ebenfalls Sexualität ergeben.

Die Interpretation der Ergebnisse in Hinblick auf die Phylogenie ist als Zwischenergebnis zu betrachten, da bei Fertigstellung der Arbeit die Revision des Herbarmaterials bezüglich der Taxonomie noch nicht abgeschlossen war. Für eine statistisch gesicherte Aussage wären größere Messreihen mit einer größeren Anzahl an gemessenen Individuen pro Population erforderlich.

5.2 MIKROSKOPIE

Als Methode zur Herstellung von Schnitten der Früchtchen hat sich nur das Mikrotom als geeignet erwiesen. Versuche Schnitte unter Beobachtung durch das Binokular anzufertigen scheiterten vor allem aufgrund der die Früchtchen umgebenden Wachsschicht. Die bei dieser Methode noch am besten geeignete Fixierung der Früchtchen ist das Festhalten mit einer Pinzette. Erweichen in Wasser brachte keine Abhilfe. Von der Möglichkeit des Einlegens in Salzsäure wurde abgesehen, da die Fruchtwand erhalten bleiben sollte.

Mit Hilfe des Mikrotoms können mit etwas Übung sehr schöne Schnitte erhalten werden. Es sollte allerdings eine größere Zahl an Früchtchen in Harz gegossen werden,

da deren Qualität von außen nicht beurteilbar ist und nicht alle Früchtchen in einer günstigen Lage im Harz eingeschlossen sind. Auch können bedingt durch die äußere Wachsschicht vereinzelt Früchtchen beim Schneiden aus dem Kunstharz ausbrechen. Pro Harzblock können drei bis vier Früchtchen eingegossen werden.

Den Schnitten anhaftendes Kunstharz kann nach dem Überführen auf einen Objektträger mit einer feinen Pinzette oder Insektennadeln entfernt werden, solange das Objekt feucht ist. Bei der Färbung und insbesondere beim Auswaschen der überschüssigen Farbe sollte darauf geachtet werden, dass sich die Präparate nicht vom Objektträger lösen, zumal sich dabei häufig die einzelnen Schichten der Früchtchen voneinander lösen.

Der Schichtbau lässt sich besonders gut in einer Kombination von Färbung und Dunkelfeld erkennen. Zur anatomischen Charakterisierung der Gewebe waren sowohl gefärbte als auch ungefärbte Präparate hilfreich. Sowohl photographische als auch zeichnerische Dokumentation war anhand der angefertigten Präparate gut durchführbar.

Bei der in Kapitel 4 Ergebnisse zu findenden Zuordnung der einzelnen Schichten, Zelltypen und Strukturbeschreibung handelt es sich um eine versuchte Erstinterpretation unter Zuhilfenahme des Früchtchenbaus von *Rosa canina* (*Rosaceae*) nach Hohmann et al. 2001 S.482.

Eindeutig festgestellt werden konnte das Vorhandensein eines Endosperms bei *Potentilla velutina*.

LITERATURVERZEICHNIS

Airy Shaw, H. K. 1973. *J. C. Willis's dictionary of the flowering plants and ferns.* 8. ed., 940 pp. Cambridge University Press, Cambridge 1973.

Asker, S. 1970. *Apomictic biotypes in Potentilla intermedia and P. norvegica.* Hereditas 66: 101-108 (1970).

Asker, S. E. & Jerling, L. 1992. *Apomixis in Plants.* CRC Press, Boca Raton, Florida 1992.

Bate-Smith, E. C. 1958. *Chromatography and taxonomy in the Rosaceae, with special reference to Potentilla and Prunus.* Presented at the Linnean Society Symposium on 'Chromatography and Taxonomy' London, 20 November 1958. in: Journal of the Linnean Society of London, Botany, **58**, 370, p.39-54.

Becton, Dickinson and Company 2009. *BD FACSCalibur. The flow cytometer for your routine cell analysis needs.*

Braune, W., Leman, A., Taubert, H. 1994. *Pflanzenanatomisches Praktikum I. Zur Einführung in die Anatomie der Vegetationsorgane der Samenpflanzen.* Gustav Fischer Verlag Jena, Jena 1994 (7. Aufl.).

Dobeš, Ch. & Paule, J.. 2010. *A comprehensive chloroplast DNA based phylogeny of the genus Potentilla (Rosaceae): implications for its geographic origin, phylogeography and generic circumscription* Molecular Phylogenetics and Evolution.

Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. 2007. *Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry.* Nature Protocols, Vol.2 No.9, 2007, Nature Publishing Group.

-- **2007.** *Flow Cytometry with Plants: an Overview.* in: Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. [Hrsg.]. Flow Cytometry with Plants. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2007, S.41-65.

Eriksson, T., Donoghue, M. J., & Hibbs, M. S. 1998. *Phylogenetic analysis of Potentilla using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS), and implications for the classification of Rosoideae (Rosaceae).* Pl.Syst.Evol. 211, 155-179.

Europäisches Arzneibuch. 6. Ausgabe. Grundwerk 2008. Amtliche österreichische Ausgabe. Verlag Österreich GmbH.

Fischer, M. A., Adler, W., Oswald, K. 2005. *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol.* Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz 2005 (2. Aufl.).

Graf, Dr., J. *Tafelwerk zur Pflanzensystematik. Einführung in das natürliche System der Blütenpflanzen.* J.F.Lehmanns Verlag München.

Greilhuber, J., Tensch, E. M., Loureiro, J. C. M. 2007. *Nuclear DNA Content Measurement.* in: Doležal, J., Greilhuber, J., Suda, J. [Hrsg.]. *Flow Cytometry with Plants.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2007, S.67-101.

Hertwig, H. 1938. *Gesund durch Heilpflanzen. Altes und neues Wissen vom Kampfe der Pflanze gegen die Krankheit und von ihrer Kraft, menschliches Schicksal zu gestalten.* Verlag für Kulturpolitik, Berlin 1938.

Hohmann, B., Reher, G., Stahl-Biskup, E. 2001. *Mikroskopische Drogenmonographien der deutschsprachigen Arzneibücher. Pharmazeutische Biologie, Band 3.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.

Holm, S. & Ghatnekar, L. 1996. *Sexuality and no apomixis found in crossing experiments with diploid *Potentilla argentea*.* *Hereditas* 125, 77-82.

-- **1996.** *Apomixis and sexuality in hexaploid *Potentilla argentea*.* *Hereditas* 125, 53-60.

Holm, S., Ghatnekar, L., Bengtsson, B. O. 1997. *Selfing and outcrossing but no apomixis in two natural populations of diploid *Potentilla argentea*.* *J.Evol.Biol.* 10, 343-352.

Huber, R., Ditfurth, A. V., Amann, F., Guthlin, C., Rostock, M., Trittler, R., Kummerer, K., Merfort, I. 2007. *Tormentil for active ulcerative colitis: an open-label dose-escalating study.* *Journal of Clinical Gastroenterology* 41, 834-838.

Ikeda, H. & Ohba, H. 1999. *A systematic revision of *Potentilla* L. section *Leptostylae* (Rosaceae) in the Himalaya and adjacent regions.* in: Ohba, H. *The Himalayan plants.* Volume 3. 31-117. Tokyo, University of Tokyo Press

Kalkman, C. *Rosaceae.* in: Kubitzki, K. *The Families and Genera of Vascular Plants. IV Flowering Plants. Dicotyledons. Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales.* Springer Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg 2004, S.343-386.

Karszen, C. M. 1995. *Hormonal Regulation of Seed Development, Dormancy, and Germination Studied by Genetic Control.* in: Kigel, J., Galili, G. [Hrsg.]. *Seed Development and Germination.* Marcel Dekker, Inc., New York 1995, S.333ff.

Martin, A.C. 1946. *The Comparative Internal Morphology of Seeds.* in: *The American Midland Naturalist*, Vol. 36, No. 3, (Nov., 1946), pp. 513-660, The University of Notre Dame.

- Matzk, F., Meister, A., Schubert, I. 2000.** *An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots.* The Plant Journal (2000) **21**(1), 97-108.
- Matzk, F., Meister, A., Brutovská, R., Schubert, I. 2001.** *Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis.* The Plant Journal **26** (3): 275-282.
- Morgan, D. R., Soltis, D. E., Robertson, K. R. 1994.** *Systematic and evolutionary implications of *rbcL* sequence variation in Rosaceae.* American Journal of Botany **81**(7): 890-903. 1994.
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., Heller, H. C. 2002.** *Life. The Science of Biology.* Sinauer Associates, Inc., Massachusetts 2002 (6. Aufl., 3. Druck).
- Rutishauser, A. 1969.** *Embryologie und Fortpflanzungsbiologie der Angiospermen. Eine Einführung.* Springer-Verlag, Wien 1969.
- Schönfelder, P. & I. 2002.** *Heilpflanzen.* Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart 2002 (2. Aufl.).
- Soják, J. 2005.** *Potentilla L. s.l. (Rosaceae) in Flora Europae Orientalis (Notes on Potentilla XVIII).* Candollea **60**, S.59–78.
- **2008.** *Notes on Potentilla XXI. A new division of the tribe Potentilleae (Rosaceae) and notes on generic delimitations.* Bot. Jahrb. Syst. **127**, S.349–358.
- Subottina, M. D., Timchenko, V. N., Vorobyov, M. M., Konuovna, Y. S., Aleksandrovih, Y. S., Shushunov, S. 2003.** *Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled study.* Pediatric Infectious Disease Journal **22**, 706-711.
- Suda, J., Krahulková, A., Trávní ek, P., Krahulek, F. 2006.** *Ploidy level versus DNA poidy level: an appeal for consistent terminology.* TAXON **55** (2) May 2006: 447-450.
- Talent, N. & Dickinson, T. A. 2007.** *Endosperm formation in aposporous Crataegus (Rosaceae, Spiroideae, tribe Pyreae): parallels to Ranunculaceae and Poaceae.* New Phytologist (2007) **173**. 231-249.
- **2007.** *The potential for ploidy level increases and decreases in Crataegus (Rosaceae, Sporoideae, tribe Pyreae).* Canadian Journal of Botany **85** no6 570-84 Je 2007.
- Teuscher, E., Melzig, M. F., Lindequist, U. 2004.** *Biogene Arzneimittel. Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2004 (6. Aufl.)

- Tomczyk, M. 2006.** *Secondary metabolites from Potentilla argentea.* Biochemical Systematics and Ecology 34 (2006) 770-773.
- Tomczyk, M., Drozdowska, D., Bielawska, A., Bielawski, K., Gudej, J. 2007.** *Human DNA topoisomerase inhibitors from Potentilla argentea and their cytotoxic effect against MCF-7.* Pharmazie 63: 389-393 (2008).
- Tomczyk, M., Leszczyńska, K., Jakoniuk, P. 2008.** *Antimicrobial activity of Potentilla species.* Fitoterapia 79 (2008) 592-594.
- Tomczyk, M. & Latté, K. P. 2009.** *Potentilla –A review of its phytochemical and pharmacological profile.* Journal of Ethnopharmacology 122 (2009) 184-204.
- Tomczyk, M., Bazyłko, A., Staszewska, A. 2009.** *Determination of Polyphenolics in Extracts of Potentilla Species by High-performance Thin-layer Chromatography Photodensitometry Method.* Phytochemical Analysis 2010, **21**, 174-179.
- Wendelberger, Dr., E. 2008.** *Heilpflanzen. Erkennen, sammeln, anwenden.* BLV Buchverlag GmbH & Co. KG, München 2008 (12. Aufl.).
- WHO Regional Office for the Western Pacific 1998.** *Medicinal Plants in the Republic of Korea: Information on 150 Commonly Used Medicinal Plants.* Western Pacific Series No.21, erarbeitet durch: Natural Products Research Institute, Seoul National University.
- Wichtl, M. (Hrsg.) 2002.** *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2002 (4.Aufl.).
- Wikström, N., Savolainen, V., Chase, M. W. 2000.** *Evolution of the angiosperms. Calibrating the family tree.* Proc. R. Soc. Lond. B 2001 **268**, 2211-2220.
- Wolf, Th. 1908.** *Monographie der Gattung Potentilla.* Bibliotheca Botanica Heft 71. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung (E. Nägele), Stuttgart 1908.

HERKUNFTSNACHWEIS DER FRÜCHTCHEN

Taxon - Materialnummer: Land, Provinz, Fundortbeschreibung, Seehöhe von (m s.m.) - bis (m s.m.), Längengrad – Breitengrad; Sammeldatum, Sammler, Sammelnummer, Botanischer Garten; Herbarium Herbarnummer

POPULATIONEN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Drymocallis geoides M.Bieb. - Ptl2755: Gartenherkunft, Botanischer Garten München; HEID 806448, 806449

Drymocallis geoides M.Bieb. - Ptl2895: Griechenland, Serpentin, 1450m, Hagemann et al., 1100 Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806614, 806615

Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa (Lindl.) Rydb. - Ptl2710: USA, Sierra Nevada, High Sierra Trail, 1521m, West 119,86°/Nord 39,63°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806375, 806376, 806377, 806378, 806379

Drymocallis glandulosa subsp. glandulosa (Lindl.) Rydb. - Ptl2756: Gartenherkunft; Botanischer Garten München; HEID 806450

Drymocallis rupestris (L.) Soják - Ptl2905: Spanien, Cañón de Añisclo, 1900m, Ost 0,05°/ Nord 42,57°; Ern, 4123 Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806623, 806624, 806625

Drymocallis rupestris (L.) Soják - Ptl2920: Spanien, Sallent de Galleja, Valle de Aguas Limpias, 1800m, Ost 0,31°/Nord 42,79°; Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806644, 806645, 806646, 806647, 806648

Farinopsis salesoviana (Steph.) Chrtek & Soják (= Potentilla salesoviana Steph.) - Ptl2830: Pakistan, Hunza, N Batura-gletscher, 3000m, Ost 74,65°/Nord 36,37°; Hortus Botanicus Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin

Potentilla (Argentina) leuconota D. Don. - Ptl2706: China, Hong Shan, 4000m, Ost 98,73°/ Nord 28,66°; Göteborgs Botaniska Trädgård; HEID 806374

Potentilla adscharica Sommier & Levier ex R.Keller - Ptl2868: Gartenherkunft; Botanical Garden of Hungarian Academy of Sciences, Vácrátót; HEID 806560, 806561, 806562, 806563, 806564, 806565

Potentilla alchemilloides Lapeyr. - Ptl2703: Gartenherkunft; Conservatoire et Jardin Botaniques Genève; HEID 806370, 806371

Potentilla argentea L. - Ptl2712: Gartenherkunft 2222 Botanischer Garten Göttingen

Potentilla argentea var. calabra (Ten.) Fiori & Paol. - Ptl2801: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Universität Erlangen-Nürnberg; HEID 806496, 806497

Potentilla atosanguinea Lodd. ex D.Don. - Ptl2810: Gartenherkunft; National Botanic Garden of Belgium, Meise; HEID 806512

Potentilla aurea L. - Ptl2935: Österreich, Zirbitzkogel, E-Hänge des Geierkogels und des Zirbitzkogels; von Maria in der Zirbe, 1850 – 2350m, Ost 14,59°/ Nord 47,05°; Botanischer Garten der Universität Graz; HEID 806660

Potentilla aurea L. - Ptl2941: Österreich, Schneeberg, 2076m, Ost 15,80°/ Nord 47,76°; Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy

Potentilla calabra Ten. - Ptl2708: Gartenherkunft 2212 Botanischer Garten Göttingen

Potentilla carniolica Kern. - Ptl2858: Gartenherkunft; Gardina Botanica Jibou, Salaj; HEID 806548

Potentilla caulescens L. - Ptl2785: Österreich, Faistenau W, Strubklamm, 680m, Ost 13,22°/ Nord 47,77°; Gruber J.P., HBU Universität Salzburg

Potentilla caulescens L. - Ptl2880: Italien, Monte Grappa, Crespano del Grappa, 1300m, Ost 11,83° /Nord 45,83°; Orto Botanico dell'Università di Padova/Hortus Botanicus Patavinus

Potentilla chinensis Ser. - Ptl2723: Gartenherkunft, Botanischer Garten Halle (Saale); HEID 806405, 806406, 806407, 806408, 806409

Potentilla clusiana Jacq. - Ptl2786: Österreich, Gosaukamm, Großer Donnerkogel, 2000m, Ost 13,46°/ Nord 47,51°; Leopoldinger W, HBU Universität Salzburg; HEID 806483, 807822

Potentilla crantzii (Crantz) Beck – Frankreich, Laudaret, 2400m; Botanischer Garten Grenoble 838

Potentilla crantzii (Crantz) Beck ex Fritsch - Ptl2709: Österreich, 1950m, Ost 13,30°/ Nord 46,57°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen

Potentilla crantzii (Crantz) Beck ex Fritsch - Ptl2820: Norwegen, Oppdal, Kongsvoll, 1139m, Ost 9,61°/ Nord 62,30°; 31.8.2005, Guldahl A.S., Ringve Botanical Gardens, Trodheim; HEID 806517, 806518, 807825

Potentilla delphinensis Gren. & Godr. - Ptl2851: Gartenherkunft; Botanischer Garten Bern/Hortus Botanicus Bernensis; HEID 806544, 806545, 806546

Potentilla erecta (L.) Räuschel - Ptl2889: Deutschland, Bayern, Kreis Ansbach, Höfen; 354 m, Ost 10,651°/Nord 49,384°, Weber 13, Botanischer Garten Berlin-Dahlem; DE-0-B-1790905

Potentilla erecta (L.) Rauschel - Ptl2894: Dänemark, Hammel, Pot Molle, 70 – 90m, Ost 9,90°/ Nord 56,27°; Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806612, 806613

Potentilla fissa Nutt. - Ptl2726: Gartenherkunft, Botanischer Garten Halle (Saale); HEID 806413

Potentilla gracilis Dougl. ex Hook - Ptl2944: Kanada, 668m, West 113,51°/ Nord 53,56°; Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy

Potentilla gracilis var. fastigiata (Nutt.) S.Wats. - Ptl2711: USA, 100m, West 119,29°/ Nord 36,33°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806380, 806381, 806382, 806383

Potentilla gracilis var. glabrata (Lehm.) Hitchc. - Ptl2888: Kanada, 793m, West 122,13°/ Nord 52,10°; Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806605, 806606, 806607

Potentilla grandiflora L. - Ptl2892: Frankreich, S La Grave, Massif des Ecrins, La Meije, 2400m, Ost 6,30°/ Nord 45,01°; Dürbye et al., 1918 Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806608, 806609

Potentilla grandiflora L. - Ptl2897: Italien, Sella, Campolongo-Pass, 1875m, Ost 11,87°/ Nord 47,01°; Vogt et al., 16014 Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806618, 806619

Potentilla hippiana Lehm. - Ptl2758: Gartenherkunft; Botanischer Garten München

Potentilla hippiana Lehm. - Ptl2930: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Universität Graz

Potentilla hyparctica Malte - Ptl2842: Gartenherkunft; Jardin Botanique Alpin du Lautaret, Grenoble

Potentilla incana Gaertn. Mey. & Scherb. - Ptl2659: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Stadt Linz

Potentilla longifolia Willd. ex Schlecht. - Ptl2862: Gartenherkunft; Botanical Garden of Hungarian Academy of Sciences, Vácrátót

Potentilla megalantha Takeda - Ptl2660: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Stadt Linz; HEID 806328, 806329, 806330

Potentilla megalantha Takeda - Ptl2843: Gartenherkunft; Jardin Botanique Alpin du Lautaret, Grenoble; HEID 806536

Potentilla multifida L. - Ptl2729: Gartenherkunft, Botanischer Garten Halle (Saale); HEID 806419

Potentilla multifida L. - Ptl2741: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Universität Karlsruhe (TH); HEID 806433, 806434,806435

Potentilla nitida L. - Ptl2969: Gartenherkunft; Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy

Potentilla norvegica L. - Ptl2714: Deutschland, Bremen, Hafengebiet, 5m, Ost 8,77°/ Nord 53,09°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806384, 806385, 806386, 806387, 806388, 806389, 806390

Potentilla norvegica L. - Ptl2948: Finland, Pitäjänmäki, Malminkartano, 20m, Ost 24,85°/ Nord 60,24°; Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy

Potentilla nuttallii Lehm. - Ptl2655: Gartenherkunft, Ökologisch-Botanischer Garten Bayreuth; HEID 806325

Potentilla ornithopoda Tausch - Ptl2715: China, SW Urumqui, 866m, Ost 87,58°/ Nord 43,80°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806391, 806392

Potentilla ornithopoda Tausch - Ptl2716: China, SW Urumqui, 866m, Ost 87,58°/ Nord 43,80°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806393,806394

Potentilla pensylvanica L. - Ptl2656: Gartenherkunft, Ökologisch-Botanischer Garten Bayreuth; HEID 806326

Potentilla pensylvanica Welsh. & Johnston - Ptl2765: [Canada] Alberta, West 113,51°/ Nord 53,56°; Jardin Botanique Nantes Mairie; HEID 806466, 807819

Potentilla pulcherrima Lehm. - Ptl2718: Gartenherkunft, Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806396, 806397

Potentilla pusilla Host - Ptl7143: Italien, Südtirol, Vinschgau, am Kalvarienberg von Schluderns, 1000 - 1020m, Ost 10,58°/ Nord 46,66°; 1.6.2009, Juraj Paule; s.n.

Potentilla pusilla Host - Ptl7144: Italien, Südtirol, Vinschgau, am Kalvarienberg von Schluderns, 1000 – 1020m, Ost 10,58°/ Nord 46,66°; 1.6.2009, Juraj Paule; s.n.

Potentilla pusilla Host - Ptl7145: Italien, Südtirol, Vinschgau, am Kalvarienberg von Schluderns, 1000 – 1020m, Ost 10,58°/ Nord 46,66°; 1.6.2009, Juraj Paule; s.n.

Potentilla pusilla Host - Ptl7146: Italien, Südtirol, Vinschgau, am Kalvarienberg von Schluderns, 1000 - 1020m, Ost 10,58°/ Nord 46,66°; 1.6.2009, Juraj Paule; s.n.

Potentilla pyrenaica Ram. ex DC. - Ptl2919: Frankreich, Col de Pailhères, 2000m; Ost 1,95°/ Nord 42,73°; Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806643

Potentilla pyrenaica Ram. ex DC. - Ptl2950: Frankreich, Col Llosa, Ost 2,60°/ Nord 42,62°; Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy

Potentilla recta L. - Ptl2719: Deutschland, Bovenden b. Göttingen, 247m, Ost 9,92°/ Nord 51,58°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806398

Potentilla recta L. - Ptl2771: Deutschland, Osnabrück, Dodesheide, 110m, Ost 8,08°/ Nord 52,31°; von Höveling B., Botanischer Garten der Universität Osnabrück; HEID 806470, 806471

Potentilla recta L. - Ptl2772: Deutschland, Bramsche, Achmer, nahe Truppenübungsplatz, 54m, Ost 7,93°/ Nord 52,38°; von Höveling B., Botanischer Garten der Universität Osnabrück; HEID 806472, 806473

Potentilla recta L. - Ptl2811: Frankreich, Mallefougasse, 657m, Ost 5,90°/ Nord 44,06°; National Botanic Garden of Belgium, Meise

Potentilla recta L. - Ptl2879: Italien, Calaone, Baone, 202m, Ost 11,67°/ Nord 45,24°; Orto Botanico dell'Università di Padova/Hortus Botanicus Patavinus; HEID 806590, 806591, 806592

Potentilla recta L. - Ptl2912: Griechenland, Kalivia/Eptalofos, 1400m, Ost 22,54°/ Nord 38,51°; Raus & Rol, 5267 Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806636, 806637, 806638

Potentilla recta L. - Ptl2929: Frankreich, Arthaz-Pont-Notre-Damen, 400m, Ost 6,26°/ Nord 46,15°; Botanischer Garten der Universität Graz; HEID 806655, 806656

Potentilla speciosa Willd. - Ptl2661: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Stadt Linz; HEID 806331, 806332

Potentilla speciosa Willd. - Ptl2670: Gartenherkunft; Botanischer Garten der TU Braunschweig; HEID 806348

Potentilla sterilis (L.) Garcke - Ptl2788: Österreich, Hallwang NW, Ischlerbahn-Trasse; 460m, Ost 13,06°/ Nord 47,85°; Gruber J.P., HBU Universität Salzburg

Potentilla supina L. ssp. supina - Ptl2787: Österreich, Hallein S, Gamp, 440m, Ost 13,10°/ Nord 47,66°; Mayr A., HBU Universität Salzburg; HEID 806484, 806485, 806486, 806487, 806488

Potentilla supina L. ssp. supina - Ptl2887: Deutschland, Wustermark, 33m, Ost 12,95°/ Nord 52,55°; Roysl, 6956 Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806601, 806602, 806603, 806604

Potentilla thurberi A.Gray ex Lehm. - Ptl2699: Gartenherkunft; Botanischer Garten der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; HEID 806363, 806364

Potentilla thuringiaca Bernh. - Ptl2720: Deutschland, Bad Königshofen im Grabfeld, 287m, Ost 10,41°/ Nord 50,30°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806399, 806400

Potentilla thuringiaca Bernh. - Ptl2917: Deutschland, Bad Königshofen, 277m, Ost 10,48°/ Nord 50,30°; Botanischer Garten Berlin-Dahlem

Potentilla umbrosa Stev. - Ptl2721: Ukraine, 243m, Ost 34,10°/ Nord 44,95°; Botanischer Garten der Georg-August-Universität, Göttingen; HEID 806401, 806402, 806403, 806404

Potentilla valderia L. - Ptl2846: Gartenherkunft; Jardin Botanique Alpin du Lautaret, Grenoble

Potentilla villosa Pall. ex Pursh - Ptl2807: Gartenherkunft; UBC Botanical Garden, Vancouver; HEID 806509

Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla arguta Pursh) - Ptl2650: Gartenherkunft; Ökologisch-Botanischer Garten Bayreuth

Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla arguta Pursh) - Ptl2844: Gartenherkunft; Jardin Botanique Alpin du Lautaret, Grenoble; HEID 806537

Sibbaldia cuneata Edgew. (= Potentilla cuneata Wall. & Lehm.) - Ptl2665: Gartenherkunft; Botanische Gärten der Universität Bonn; HEID 806336

Sibbaldia cuneifolia (Bertol.) Paule & Soják - Ptl2906: Nepal, Annapurna, Base Camp, 3500m, Ost 83,95°/ Nord 28,58°; Botanischer Garten Berlin-Dahlem; HEID 806626

Sibbaldia tridentata (Aiton) Paule & Sojak - Ptl2679: Dänemark, Narsaq Point, 227m, Ost 46,05°/ Nord 60,91°; Botanischer Garten Chemnitz/Hortus Botanicus Chemnitiensis; HEID 806352

Sibbaldia tridentata (Aiton) Paule & Sojak (=Potentilla tridentata Sol.) - Ptl2761: Gartenherkunft; Botanischer Garten München; HEID 806453, 806454

POPULATIONEN DER MIKROSKOPIE

Potentilla pusilla Host - Ptl4137: Italien, Südtirol, Völs am Schlern, ca. 0.5 km N der Ortschaft, 'am Steig (Wanderweg) A', 800m, Ost 11,49°/ Nord 46,52°; 17.7.2006, Christoph Dobeš; s.n.

Potentilla velutina Lehm. - Ptl3285: Frankreich, Hautes-Alpes, Èourres, oberhalb des Ortes, 1200 – 1270m, Ost 5,69°/ Nord 44,21°; 18.6.2006, Franz Dunkel; s.n.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Durchflusszytometrie fluoreszenzmarkierter DNA aus Samen isolierter Zellkerne wurde von Matzk et al als Methode zur Untersuchung des Reproduktionsmodus von Pflanzen etabliert (Matzk et al. 2000). Hierbei wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten embryonaler und endospermaler Zellkern-DNA bestimmt. Die Intensität der Fluoreszenz entspricht der jeweiligen Genomgröße. Anhand des errechneten Verhältniswerts kann auf das Vorliegen von Sexualität oder Apomixis als Reproduktionsmechanismus geschlossen werden. Für *Potentilla* konnten bisher keine auswertbaren Messungen erzielt werden. Auch galt das Vorhandensein eines Endosperms als fraglich.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer für *Potentilla sensu lato* geeigneten Methode zur durchflusszytometrischen Reproduktionsforschung. Angestrebt wurde auch ein Vergleich der beiden zur Verfügung stehenden Geräte Ploidy Analyser (partec) und FACSCalibur (BD). Mikroskopische Untersuchungen sollten die Durchflusszytometrie unterstützen und ersten Überblick über den anatomischen Bau der Nüsschen geben.

Das Probenmaterial umfasste 80 Populationen 47 verschiedener Arten. Pro Gerät wurden Zellkernextrakte zweier einzelner Individuen zur Messung gebracht. Für den Ploidy Analyser wurde DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), für das FACSCalibur Propidiumiodid als Fluorochrom verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Programme FloMax Software© beziehungsweise CellQuest™ Pro. Ermittelt wurden jeweils arithmetisches Mittel und Variationskoeffizient von Fluoreszenzhäufungen. Diese scheinen als *peaks* im Histogramm auf und können dem Embryo sowie dem Endosperm zugeordnet werden. Ein Verhältnis von etwa 1,5 der beiden Fluoreszenzintensitäten zueinander bedeutet Sexualität entsprechend einem Genomverhältnis von 2n:3n. Bei Apomikten liegen die Verhältnisse häufig bei 2,5 und 3.

Zur Mikroskopie wurden Früchtchen der Arten *Potentilla velutina* und *Potentilla pusilla* verwendet. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms gefertigt und teilweise mittels Phloroglucin oder Safranin und Astrablau gefärbt. Die Dokumentation erfolgte durch Photographie der in Euparal® gegossenen Präparate in verschiedenen Vergrößerungen. Anhand der Fotos wurde ein morphologisches Modell des Schichtbaus der Früchtchen erstellt. Des Weiteren wurden bei 400facher Vergrößerung Zeichnungen der anatomischen Struktur der einzelnen Schichten angefertigt.

Die Durchflusszytometrie ergab Durchführbarkeit der Methode für beide Geräte. Für beide Geräte stellte sich Seed-Buffer als geeignetes Extraktions- und Messmedium heraus. DAPI muss bereits zur Extraktion dem Puffer zugegeben sein, während Propidiumiodid erst nach Zusatz von RNase den einzelnen Proben zugefügt wird. Die

Auswertung der durch das FACSCalibur gewonnenen Daten wird durch den zusätzlichen Parameter des SideScatters erheblich erleichtert. Dagegen weist die FloFax Software die Vorteile auf für Windows geeignet zu sein, sowie Mittelwerte und Variationskoeffizienten der eingegrenzten Regionen automatisch als Zeile unter dem Histogramm anzuzeigen. Die Ergebnisse der beiden Geräte stimmten weitgehend überein. Bei der Mehrzahl der Proben konnte Sexualität bestimmt werden. Für einzelne Arten wurde Apomixis gefunden beziehungsweise bestätigt. Diese scheint sich auf Stamm C der *Potentillinae* nach Dobeš & Paule 2010 zu konzentrieren. Für eine statistische Aussage wäre ein größerer Probenumfang pro Population und Gerät nötig.

Die Mikroskopie hat ein eindeutiges Vorhandensein eines Endosperms bei *Potentilla velutina* ergeben. Die von den einzelnen Schichten angefertigten anatomischen Zeichnungen geben einen ersten Überblick über den inneren Aufbau der Nüsschen. Die Interpretation der mikroskopischen Ergebnisse ist orientiert am Bau der Früchtchen von *Rosa canina*.

ABSTRACT

Flow cytometry of fluorescently labeled DNA from isolated sperm nuclei was established by Matzk et al. to study the reproduction mode of plants (Matzk et al. 2000). In this method the ratio of fluorescence of nuclear DNA of embryonic and endospermal cells is determined. The intensity of fluorescence corresponds to the genome size of the respective cell types. On basis of the calculated ratio either sexuality or apomixis can be found out to be mode of reproduction. There have not been obtained any evaluable measurements for *Potentilla sp.*. The presence of an endosperm was regarded as questionable.

It was the intent of this diploma thesis to develop a method of flow cytometry reproduction research appropriate to *Potentilla sensu lato*. A further aim was to obtain a comparison of the two standing flow cytometers Ploidy Analyser (partec) and FACSCalibur (BD). Microscopic examinations should support the flow cytometry and provide an overview over the structure of the little nut.

The sample material consisted of 80 populations of 47 different species. For each gear nuclear extracts of two single individuals were taken for measurement. The fluorochrome used in the measures taken by the Ploidy Analyser was DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole), for the FACSCalibur propidium iodide was used as fluorescent. The data were evaluated using the programs FloMax software© and CellQuest™ Pro. Determined for each accumulation of fluorescence - assigned to either embryo or endosperm - arithmetic mean and coefficient of variation was determined. These accumulations appear as peaks in the histogram. A ratio of the two fluorescence intensities of about 1.5 means sexuality, according to ratio of genome size of $2n: 3n$. In apomictic individuals ratios usually range about 2.5 and 3

For microcopy fruits of *Potentilla pusilla* and *Potentilla velutina* were used. The cuts were made using a microtome and partly dyed with phloroglucinol or safranin and Astrablau. Documentary was made by the photograph of preparations cast in Euparal®. Using the photograph material a morphological model of the fruits was created. Furthermore, at a magnification of 400x drawings of the anatomical structures of the single layers were produced.

Flow cytometry showed to be suitable for the study of the reproduction mode of *Potentilla sensu lato*. Seed-buffer is a fluid appropriate for sample preparation for both instruments, Ploidy Analyser as well as FACSCalibur. DAPI has to be added to the buffer before extraction, while propidium-iodide is to be added to each sample after treatment with RNase. The analysis of the data obtained by the FACSCalibur is greatly facilitated by the Side Scatter as additional parameter. In contrast FloMax has the advantage of being suitable for Windows. The later software automatically displays mean values and coefficients of variation of the defined regions as a line below the

histogram. The results obtained by the two instruments conform largely. For the majority of populations sexuality could be determined. For some species apomixes was found. Apomixis seems to concentrate on grex C of *Potentillinae* after Dobeš & Paule 2010. For statistical analysis a greater number of samples per population as well as per instrument would be required.

Microscopy has revealed the presence of an endosperm in the seed of *Potentilla velutina*. The various layers depicted in the anatomical drawings give a first overview over the inner structure of the little fruits. The interpretation is leaning against the structure of the fruits of *Rosa canina*.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Diplomarbeitsprofessor ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel bedanken für die Möglichkeit eine individuelle Diplomarbeit zu verfassen. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Christoph Dobeš. Ihm danke ich für die engagierte Begleitung während der gesamten Zeit der Entstehung dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen sowie der Anfertigung der anatomischen Zeichnungen. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das gute und persönliche Arbeitsklima.

Allen voran danke ich meinen Eltern für die Unterstützung, die mein Studium ermöglicht hat.

LEBENS LAUF

LEA ELISABETH KAUSCHE

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 16.05.1986

Geburtsort: Linz

AUSBILDUNG

Volksschule

September 1992 — Juli 1996

VS 36, Flötzerweg 63, 4030 Linz

Realgymnasium

September 1996 — 14. Juni 2004

BRG Linz, Hamerlingstraße 18, 4020 Linz

Matura mit ausgezeichnetem Erfolg bestanden

Pharmaziestudium

Oktober 2004 — September 2010

Universität Wien

Mitbelegung an der Medizinischen Universität Wien

Medizinstudium

seit April 2009

Universität Erlangen-Nürnberg

WEITERBILDUNG UND PRAKTIKA

Cambridge First Certificate (05. August 2003; Note: A)

Forschungspraktika am Institut für Immunologie der Medizinischen Universität Wien
(Juli 2006 und Juli 2007)

Pflegepraktikum im Diakonissen-Krankenhaus Linz (August 2008)

AUSZEICHNUNGEN

Ehrenpreis für die Fachbereichsarbeit in Chemie ausgestellt von der Gesellschaft
Österreichischer Chemiker Arbeitsgruppe Chemieausbildung (26.05.2004)