



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Etablierung der AFLP-Methode für
das *Valeriana officinalis* Aggregat“

Verfasserin

Mag. art. Alice Fischer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 438

Studienrichtung lt. Studienblatt: Botanik

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel

Vorwort

Ich möchte mich bei allen, die mich bei der Erstellung meiner Diplomarbeit unterstützt haben, bedanken. Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel danke ich herzlich für die Betreuung der Diplomarbeit, die positive Kommunikation und die Diskussion integrativer Methoden der Statistik. Ebenso herzlich danke ich Herrn Dr. Christoph Dobeš für den Entwurf des Projektes, die Bereitstellung des Themas der Diplomarbeit und die Einladung mich an den Sammelexkursionen zu beteiligen.

Besonders danke ich Frau Dipl. Biol. Valerie Klatte-Asselmeyer für die Erstellung der umfassenden, interdisziplinären Studie zu *Valeriana officinalis* agg., auf deren Grundlagen die Erstellung meiner Diplomarbeit ermöglicht wurde. Ihre Anregungen und Gedanken zu diesem Projekt waren äußerst hilfreich für mich.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen Mitarbeitern folgender Arbeitsgruppen und Departments der Universität Wien:

Pharmakobotanik am Department für Pharmakognosie

Pflanzensystematik am Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung

Molekulares Labor am Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung

Department für Mikrobielle Ökologie

Weiters bedanke ich mich sehr bei Dipl. Biologin Rebecca Seidenberger vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft, bei ao. Univ.-Prof. Dr. Peter Schönswetter und bei Dott. Fabrizio Grassi für die übermittelten Informationen zu AFLP-Primerkombinationen.

Meinem Partner Peter A. Egger, meiner Familie und meinen engen Freunden möchte ich ganz besonders für ihr Vertrauen und für ihre Motivation während der gesamten Phase meines Studiums danken.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abbildungsverzeichnis | 3 |
| Tabellenverzeichnis | 5 |
| Abkürzungen und Bezeichnungen | 6 |
| | |
| I EINLEITUNG | 1 |
| I.1 Allgemeine Merkmale - <i>Valeriana officinalis</i> agg..... | 1 |
| I.2 Systematik - <i>Valeriana officinalis</i> agg..... | 3 |
| I.3 Phytochemie und pharmazeutische Bedeutung..... | 9 |
| I.4 Polyploidie und Artabgrenzung | 12 |
| I.5 Genetische Marker in der Pflanzensystematik | 17 |
| I.5.1 Sequenzierung..... | 20 |
| I.5.2 Methoden der genetischen fingerprint-Analyse..... | 23 |
| I.6 Zielsetzung der Diplomarbeit..... | 28 |
| | |
| II MATERIAL UND METHODEN | 30 |
| II.1 Pflanzenmaterial..... | 30 |
| II.1.1 Homogenisierung des Pflanzenmaterials..... | 32 |
| II.2 DNA-Extraktion | 33 |
| II.2.1 Methoden der DNA-Extraktion | 33 |
| II.2.2 Konzentration und Reinheit der DNA | 36 |
| II.3 AFLP (Amplified Length Polymorphism) Grundlagen | 38 |
| II.3.1 Erzeugung der Template-DNA durch Restriktionsenzyme | 39 |
| II.3.1.1 Restriktion/Ligation | 39 |
| II.3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese..... | 40 |
| II.3.2 DNA-Amplifikation mit PCR | 41 |
| II.3.2.1 Präamplifikation..... | 45 |
| II.3.2.2 Selektive Amplifikation | 46 |
| II.3.3 Kapillarelektrophorese | 46 |
| II.4 AFLP (Amplified Length Polymorphism) Durchführung | 47 |
| II.4.1 Erzeugung der Template-DNA durch Restriktion/Ligation..... | 47 |
| II.4.2 Agarose-Gelelektrophorese 1..... | 49 |
| II.4.3 Auswahl der AFLP-Primer | 50 |
| II.4.4 Präamplifikation..... | 51 |
| II.4.5 Agarose-Gelelektrophorese 2..... | 53 |
| II.4.6 Selektive Amplifikation | 54 |
| II.4.7 Kapillarelektrophorese | 55 |
| II.4.8 Wiederholbarkeit..... | 57 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| II.5 | Datenanalyse | 58 |
| II.5.1 | DNA-Extraktion | 58 |
| II.5.2 | AFLP-Analyse | 58 |
| III | ERGEBNISSE | 60 |
| III.1 | Ergebnisse von 4 DNA-Extraktionsmethoden | 60 |
| III.1.1 | DNA-Extraktion: Konzentration | 61 |
| III.1.2 | DNA-Extraktion: Reinheit | 62 |
| III.2 | Ergebnisse der AFLP-Analyse | 63 |
| III.2.1 | Screening von 12 AFLP-Primerkombinationen | 63 |
| III.2.2 | Ergebnisse der AFLP Analyse von 89 Individuen aus 18 Populationen | 64 |
| III.2.3 | Allele-Sharing | 65 |
| III.2.3.1 | Analyse der Replikate | 65 |
| III.2.3.2 | Häufigkeitsverteilung von 9 Allelklassen, 312 Loci über 89 Individuen von <i>Valeriana officinalis</i> agg. | 67 |
| III.2.3.3 | Häufigkeitsverteilung der Genotypenklassen nach paarweisen Distanzen Distanzindex: <i>infinite allele model-</i> IAM | 68 |
| III.2.3.4 | AFLP-2D_EUCLID Algorithmus: Datenanalyse und Scatterplot | 69 |
| III.2.4 | Wiederholbarkeit der AFLP-Methode | 75 |
| IV | DISKUSSION | 78 |
| V | ZUSAMMENFASSUNG | 82 |
| VI | SUMMARY | 84 |
| | Literaturverzeichnis | 86 |
| | Anhang | 96 |
| | Lebenslauf | 118 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | Herbarbelege Naturhistorisches Museum Wien, <i>Valeriana officinalis</i> agg.: <i>subsp. officinalis</i> Beleg Nr. 4625, <i>subsp. tenuifolia</i> Beleg Nr. 4829 | 4 |
| Abbildung 2: | Herbarbelege Naturhistorisches Museum Wien, <i>Valeriana officinalis</i> agg.: <i>subsp. excelsa</i> Beleg Nr.3354, <i>subsp. sambucifolia</i> Beleg Nr. 17871..... | 5 |
| Abbildung 3: | Drei Grundtypen und zwei Übergangstypen von <i>Valeriana officinalis</i> agg. Quelle: Titz, W. & Titz. E. 1982 | 6 |
| Abbildung 4: | Grundtypen, Zytotypen und Taxonomie von <i>Valeriana officinalis</i> agg. abgeändert nach Titz/Fischer..... | 6 |
| Abbildung 5: | Autopolyploidie, möglicher Zyklus verändert nach Parisod, Ch. et al. 2009 | 14 |
| Abbildung 6: | Prinzip der AFLP-Methode..... | 27 |
| Abbildung 7: | Kultivierte Versuchspflanzen mit Bewässerungssystem <i>Valeriana officinalis</i> agg., Wien-Augarten 2010 | 31 |
| Abbildung 8: | Geographische Position und durchflusszytometrisch (nach Klatter-Asselmeyer, V. & Bressler, S. 2009) bestimmte Ploidieniveaus von 18 mit der AFLP-Methode untersuchten Populationen des <i>Valeriana officinalis</i> Aggregats. | 32 |
| Abbildung 9: | Proben des mit Silikagel getrockneten Pflanzenmaterials, homogenisiert in 2 ml Reaktionsgefäßen | 33 |
| Abbildung 10: | Spectrophotometer NanoDrop-ND 1000,Thermo Scientific, US. | 37 |
| Abbildung 11: | Schema der Agarose-Gelelektrophorese: kurze Fragmente erreichen die positive Elektrode zuerst. | 41 |
| Abbildung 12: | Schema der PCR-Methode | 42 |
| Abbildung 13: | Agarose-Gelelektrophorese Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10..... | 50 |
| Abbildung 14: | Agarose-Gelelektrophorese: Präamplifikation Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10..... | 53 |
| Abbildung 15: | 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US)..... | 57 |
| Abbildung 16: | DNA – Konzentration: Vergleich 4 DNA-Extraktionsmethoden anhand der Mittelwerte in ng/µl..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 17: DNA – Reinheit: Vergleich von 4 DNA-Extraktionsmethoden anhand der Mittelwerte der Ratio 260/280 nm | 62 |
| Abbildung 18: 312 AFLP Loci über 89 Individuen von <i>Valeriana officinalis</i> agg. in neun Klassen. 1:100-150 bp, 2:150-200 bp, 3:200-250 bp, 4:250-300 bp, 5:300-350 bp, 6:350-400 bp, 7:400-450 bp, 8:450- 500 bp, 9:500-550 bp | 67 |
| Abbildung 19: GenoType Histogramm der paarweisen Distanzen aller Genotypen..... | 68 |
| Abbildung 20: Korrelation der Unähnlichkeitswerte der Distanzmatrix | 70 |
| Abbildung 21: AFLP: 2D_EUCLID Scatterplot 4 Gruppen..... | 71 |
| Abbildung 22: AFLP: 2D_EUCLID Scatterplot 3 Gruppen selektiv | 73 |
| Abbildung 23: AFLP: 2D_EUCLID Scatterplot 3 Gruppen 3 Ploidieniveaus | 74 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabelle 1: | CTAB-Methode: Reagenzien und deren Funktion..... | 34 |
| Tabelle 2: | Formel der DNA-Konzentrationsberechnung nach Thermo Scientific, US 2008 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer | 38 |
| Tabelle 3: | Berechnung des T_m | 43 |
| Tabelle 4: | Adaptersequenzen | 47 |
| Tabelle 5: | Reaktionsmix Restriktion/Ligation | 48 |
| Tabelle 6: | Verwendete Oligonukleotide..... | 51 |
| Tabelle 7: | Reaktionsmix Präamplifikation..... | 52 |
| Tabelle 8: | PCR-Protokoll Präamplifikation | 53 |
| Tabelle 9: | Selektive Amplifikation | 54 |
| Tabelle 10: | TD-PCR Protokoll..... | 55 |
| Tabelle 11: | Ergebnisse der DNA-Extraktionsmethoden | 63 |
| Tabelle 12: | Ergebnisse der Testreihe, die mit 12 AFLP-Primerkombinationen durchgeführt wurde | 64 |
| Tabelle 13: | Allelesharing | 65 |
| Tabelle 14: | Replikate Probe 1_10 | 66 |
| Tabelle 15: | 2D_EUCLID Scatterplot Individuen 3 Gruppen und Ploidieniveaus | 75 |
| Tabelle 16: | AFLP unabhängige Wiederholungen | 76 |

Abkürzungen und Bezeichnungen

| | |
|---------|---|
| ADF | <i>forward adapter</i> |
| ADR | <i>reverse adapter</i> |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Borat | Salz der Borsäure |
| CCD | <i>charged coupled device</i> |
| cm | Zentimeter |
| CTAB | Hexacetyltrimethylammoniumbromid |
| ddNTPs | Didesoxy-Nukleosidtriphosphate |
| DNA | <i>desoxyribonucleinacid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxy-Nukleosidtriphosphate |
| e.g. | <i>exempli grata</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| et al. | <i>et alii</i> |
| EtOH | Ethanol |
| F1 | Filialgeneration 1, erste Hybridgeneration |
| g | Gramm |
| Hz | Hertz |
| i.e. | <i>idem est</i> |
| l | Liter |
| M | Molar |
| min. | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion |
| pmol | pikomol |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| POP/IND | Population/Individuum |
| RAPD | Random Amplified Polymorphic DNA |
| ref | <i>relative centrifugal force</i> |
| rDNA | ribosomale DNA |

| | |
|----------------|---|
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| sec. | Sekunden |
| s.l. | sensu lato |
| s.str. | sensu stricto |
| SSR | Simple Sequence Repeat |
| T _a | <i>annealing temperature</i> |
| TBE- Puffer | TRIS-Borat-EDTA-Puffer |
| TD | <i>touch down</i> |
| TE Puffer | TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Puffer |
| T _m | <i>melting temperature</i> |
| TRIS | (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan) |
| Tris-HCl | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid |
| μl | Mikroliter |
| μM | mikromolar |

I Einleitung

I.1 Allgemeine Merkmale - *Valeriana officinalis* agg.

Genus *Valeriana* L. ist Teil der zur Pflanzenfamilie Valerianaceae (400 Arten) zählenden Tribus Valerianae. Mit Ausnahme von Australien und den pazifischen Inseln (Hidalgo, O. et al. 2003) ist die Familie der Valerianaceae kosmopolitisch verbreitet. Das von der Gattung *Valeriana* L. besiedelte Areal erstreckt sich über das submeridionale bis boreale Eurasien und über gemäßigte Zonen Nord- und Südamerikas. Der Artkomplex *Valeriana officinalis* agg. ist in den gemäßigten bis arktischen Gebieten Europas, Zentralasiens und des östlichen Nordamerika vertreten.

Der Habitus von *Valeriana officinalis* agg. ist der einer krautigen 30 cm bis 150 cm hohen Staude. Der Stängel ist behaart oder unbehaart, die Laubblätter sind gegenständig, fiederschnittig oder unpaarig gefiedert. Stipeln sind nicht vorhanden. Die rosa bis weissen, zygomorphen Zwitterblüten sind in endständigen Thyrsen mit zymösen Teilblütenständen angeordnet. Unterhalb der Hauptinfloreszenz entwickeln sich häufig Bereicherungsinfloreszenzen aus den Blattachseln. Die Gesamtheit der Blütenstände nimmt zum Zeitpunkt der Anthese im Umriss die Form einer Pyramide an. Diese Form bleibt im Wesentlichen bis zur Fruchtreife erhalten (Weberling, F. 1961). Der Durchmesser der leicht asymmetrischen Einzelblüten beträgt etwa fünf Millimeter. Die verwachsenblättrige Corolla ist vorwiegend fünfzählig. Der Kelch wächst postanthetisch zu einem hygroskopischen Pappus, dessen Strahlenkranz sich bei Feuchtigkeit einrollt, aus. Drei markante Antheren überragen die Kronblätter. Das auf drei verwachsene Karpelle reduzierte Gynözeum bildet den unterständigen Fruchtknoten. Dieser verfügt nur über ein fertiles Fruchtblatt, aus dem sich die einsamige Nuss entwickelt. Die Früchte breiten sich als Schirmchenflieger aus. Die vegetative Vermehrung der Pflanzen erfolgt durch Rhizome und Ausläufer (Frohne, D. & Jensen, Uwe 1998, Fischer, M. A. et al. 2008). Aus den unterirdischen Teilen (Wurzel und Rhizom) wird die offizinelle Droge *Valerianae radix* (Europäisches Arzneibuch, Ph. Eur. 7.0, 2011) gewonnen.

Die Artengruppe verfügt über eine weitreichende ökologische Plastizität. Ihr Lebensraum umfasst nährstoffreiche Standorte wie Ufergebüsche, feuchte Wiesen und

Überschwemmungsgebiete, aber auch sonnige Berghänge, Halbtrockenrasen und Waldlichtungen. Sie besiedelt vorwiegend gestörte Standorte colliner bis subalpiner Höhenstufen. In Zentraleuropa blühen die verschiedenen Unterarten von *Valeriana officinalis* agg. zwischen Mai und August.

Das *Valeriana officinalis* Aggregat besteht aus einem uneinheitlichen, polyploiden Sippenkomplex. Aktuell wird die Gruppe anhand von vier morphologischen Grundtypen und drei unterschiedlichen Ploidieniveaus charakterisiert (Titz, E. & Titz, W. 1981, Titz, W. 1984, Titz, W. & Titz E. 1980, 1982, Fischer, M. A. et al. 2008). Übergänge zwischen diesen eigentlich abstrahierten Grundtypen sind in der Natur die Regel. Nicht alle natürlichen Populationen weisen die gesamte Bandbreite an Charakteristika und Merkmalen, um sie den Einzeltypen zuordnen zu können, auf. Daher bieten die Grundtypen keine taxonomisch eindeutig verwertbare Qualität. Sie sind nicht mit real voneinander abgegrenzten Sippen gleichzusetzen (Titz, E. & Titz, W. 1981).

Die Grundzahl des haploiden Chromosomensatzes bei *Valeriana officinalis* agg. ist $x=7$. Im Zellkern einer diploiden somatischen Zelle liegen daher ($2n=2x=14$) homologe Chromosomen vor. Die *Valeriana officinalis* agg. Gruppe weist die somatischen Ploidiestufen diploid ($2n=2x=14$), tetraploid ($2n=2x=28$) und oktoploid ($2n=2x=56$) auf. (Titz, W. 1969, Dobeš, Ch. & Vitek, E. 2000). Bei pflanzlichen Organismen erfolgt die Speziation häufig durch Polyploidisierung. Der Grad der Abgrenzung zwischen einzelnen Gruppen von *Valeriana officinalis* agg. ist an der Differenzierung in Ploidieniveaus allein jedoch nicht erkennbar. Die gegenwärtige Systematik gilt als unvollständig, da weder das 'Typenkonzept' nach Titz noch die unterschiedlichen Zytotypen eine genaue taxonomische Zuordnung der heterogenen Gruppen ermöglichen.

I.2 Systematik - *Valeriana officinalis* agg.

Das *Valeriana officinalis* agg. nimmt innerhalb der Angiospermatophyta die folgende systematische Position ein.

Unterabteilung: Angiospermophyta (Angiospermae, Bedecktsamer)

Klasse: Rosopsida (Tricolpate-Dicotyledoneae)

Unterklasse: Asteridae (Korbblütler)

Überordnung: Dipsacanae (Dipsacales s. l.; Kardenblütige)

Ordnung: Dipsacales s. str. (Kardenartige s. str.)

Familie: Valerianaceae (Baldriangewächse)

Art: *Valeriana officinalis* agg. (Arznei-Baldrian)

Der systematische Botaniker Prof. Walter Titz (1941-1983) strebte eine detaillierte Phylogenie von *Valeriana officinalis* agg., die vor allem auf einer Diskriminanzanalyse unter Verwendung multivariater Daten basieren sollte, an. Diese Daten wurden durch die quantitative Erfassung bestimmter morphologischer Charaktermerkmale sowie durch morphometrische Studien ermittelt. Darüber hinaus wurden phytochemische und karyosystematische Untersuchungsverfahren eingesetzt (Titz, W. & Titz, E. 1982, Titz, W. 1984, Titz, W. et al. 1983). Da sowohl die biogeographische Verbreitung als auch die Anzahl der untersuchten Individuen für eine vollkommene Klassifikation aller möglichen Spezies bzw. Subspezies nicht ausreichten und Walter Titz seine Untersuchungen nicht vollenden konnte, stellt die Aktualisierung der Systematik von *Valeriana officinalis* agg. eine interessante Herausforderung dar.

In der Exkursionsflora von Österreich, Liechtenstein und Südtirol (Fischer, M. A. et al. 2008) wird die Aufteilung in sechs Unterarten dem Titz'schen Ansatz entsprechend festgelegt. (Abb. 4). Im Text kommt in der Folge für *Valeriana officinalis* s. l. die Taxonomie nach Fischer et al. 2008 zur Anwendung.

Danach wird die Spezies *Valeriana officinalis* s. l., Arznei-Baldrian, Echter Baldrian, in sechs Subspezies unterteilt.

1. *Valeriana officinalis* subsp. *officinalis*, Breitblatt-Arznei-Baldrian, diploid
Synonyme: *Valeriana exaltata*, *Valeriana officinalis* s. str.

2. *Valeriana officinalis* subsp. *tenuifolia*, Schmalblatt-Arznei-Baldrian, tetraploid
Synonyme: *Valeriana wallrothii*, *Valeriana collina*, *Valeriana angustifolia*,
Valeriana officinalis subsp. *collina*
3. *Valeriana officinalis* subsp. *excelsa*, Kriech-Arznei-Baldrian, oktoploid
Synonym: *Valeriana procurrens*
4. *Valeriana officinalis* subsp. *sambucifolia*, Holunderblatt-Arznei-Baldrian,
oktoploid
5. *Valeriana officinalis* subsp. *vorarlbergensis*, Wiesen-Arznei-Baldrian,
tetraploid, Synonym: *Valeriana pratensis*
6. *Valeriana officinalis* subsp. *versifolia*, Verschiedenblatt-Arznei-Baldrian,
oktoploid



Abbildung 1: Herbarbelege Naturhistorisches Museum Wien, *Valeriana officinalis* agg.:
subsp. officinalis Beleg Nr. 4625, *subsp. tenuifolia* Beleg Nr. 4829



Abbildung 2: Herbarbelege Naturhistorisches Museum Wien, *Valeriana officinalis* agg.:
subsp. excelsa Beleg Nr.3354, *subsp. sambucifolia* Beleg Nr. 17871

Die Ausgangsbasis für diese Klassifikation bilden vier morphologische Grundtypen (Titz, W. & Titz, E. 1980, 1982, Titz, W. 1984), (Abb. 3):

- A. Typ exaltata: *Valeriana officinalis subsp. officinalis*, Breitblatt-Arznei-Baldrian
- B. Typ collina: *Valeriana officinalis subsp. tenuifolia*, Schmalblatt-Arznei-Baldrian
- C. Typ procurrens: *Valeriana officinalis subsp. excelsa*, Kriech-Arznei-Baldrian



Abbildung 3: Drei Grundtypen und zwei Übergangstypen von *Valeriana officinalis* agg.
Quelle: Titz, W. & Titz, E. 1982, Ber. Deutsche Bot. Ges. 95:S. 155-164

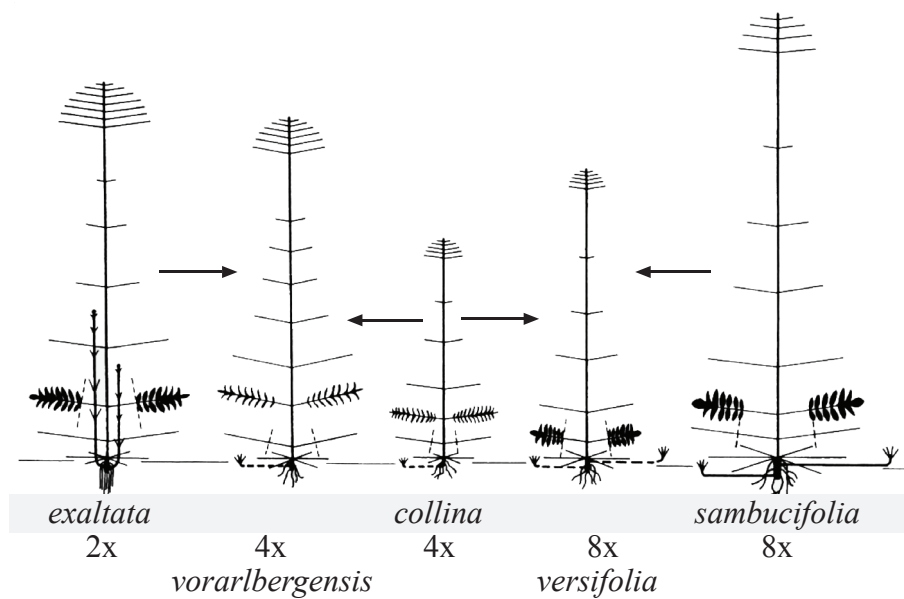


Abbildung 4: Grundtypen, Zytotypen und Taxonomie von *Valeriana officinalis* agg.
abgeändert nach Titz/Fischer

D. Typ sambucifolia: *Valeriana officinalis* subsp. *sambucifolia*, Holunderblatt-Arznei-Baldrian

Markante morphologische Übergangstypen sind (Titz, W. & Titz, E. 1982)

- E. der Typ vorarlbergensis: *Valeriana officinalis subsp. vorarlbergensis*, Wiesen-Arznei-Baldrian; dieser Typ steht zwischen *Valeriana officinalis subsp. officinalis* und *Valeriana officinalis subsp. tenuifolia*, und
- F. der Typ versifolia: *Valeriana officinalis subsp. versifolia*, Verschiedenblatt-Arznei-Baldrian, der eine zwischen *Valeriana officinalis subsp. tenuifolia* und *Valeriana officinalis subsp. excelsa* stehende Form darstellt.

Die folgende Beschreibung der Grund- und Übergangstypen (A bis F) basiert auf den Erkenntnissen von Walter Titz (Titz, W. & Titz, E. 1980, 1982, Titz, W. 1984), die die Grundlage der gegenwärtigen Gliederung des *Valeriana officinalis* Aggregats in der Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol von Fischer M. et al. 2008 darstellen.

Ad A. Grundtyp exaltata:

Die einzige diploide Tieflands- und Talform Zentraleuropas ist hochwüchsig und hygrophil. Die Blatffiedern sind breit, vielzählig und zugespitzt. Die Blattunterseiten sind vorwiegend behaart, der Stängel hingegen bleibt meist kahl oder ist nur spärlich behaart. Die Anzahl der Knoten sowohl des Stängels als auch der Infloreszenzen ist hoch. Die bedeutenden Blütenstände bestehen aus zahlreichen kleinen Einzelblüten. Die Früchte sind klein, dabei unbehaart, seltener auch behaart. Ausläufer fehlen meist und Stockbildung tritt auf. Das Hauptverbreitungsareal des Typs ist Mittel- und Osteuropa, seine Westgrenze liegt zwischen dem Rhein und dem Genfer See.

Ad B. Grundtyp collina:

Diese tetraploide Form ist kleinwüchsig und zeigt xerophile Tendenzen. Ihr Stängel ist kahl oder behaart. Es liegen wenige Infloreszenz- oder Vegetativknoten vor. Die Laubblätter sind schmalfiederig, wobei die zahlreichen Fiedern ganzrandig oder nur schwach gezähnt sind. Blatt- und Blütenstiele sind kurz, die Blütenstände eher klein. Unterirdische Ausläufer sind verbreitet. Das Areal von *Valeriana officinalis subsp. collina* umfasst mittlere bis subalpine Lagen in Mitteleuropa und dem submediterranen Bereich Südeuropas.

Ad C. Grundtyp *procurrens*:

Der oktoploide Typ ist feuchtigkeitsliebend. Sein Verbreitungsgebiet reicht von Westeuropa bis zum westlichen Skandinavien. Der Habitus ist mäßig- bis hochwüchsig. Die vegetativen Knoten sind zahlreich, die der Infloreszenz in der Anzahl geringer. Die Blattfiedern sind ebenfalls weniger zahlreich, dabei jedoch breit und kräftig gezähnt. Die Blüten sind, ebenso wie die kahlen Früchte, relativ groß. Die Pflanze bildet sowohl ober- als auch unterirdische Ausläufer.

Ad D. Grundtyp *sambucifolia*:

Diese Form ist ebenfalls oktaploid. Ihr Verbreitungsgebiet reicht, von Mitteleuropa ausgehend, über montane bis subalpine Hochstaudenfluren der Karpaten bis nach Skandinavien. Der Habitus des klein- bis mäßigwüchsigen Typs verfügt in Infloreszenz und Spross über eine geringe Anzahl an Knoten. Eine Behaarung an Stängeln und Früchten fehlt. Die Blattstiele sind kurz, die Zahl der breiten Blattfiedern ist reduziert. Die Fiedern sind kräftig gezähnt und die Blüten und Früchte voluminös. Ausläufer sind ober- und unterirdisch vorhanden.

Zwischen den Grundtypen *excelsa* und *sambucifolia* bilden sich regional verbreitet Übergangsformen aus.

Ad E. Übergangstyp *vorarlbergensis*:

Dieser tetraploide Typ steht zwischen *Valeriana officinalis subsp. officinalis* und *Valeriana officinalis subsp. tenuifolia*. Morphologisch sehr ähnlich ersetzt er den Grundtyp *tenuifolia* an feuchteren Standorten des westlichen Zentraleuropas. Kennzeichen der Form sind nicht behaarte Blattunterseiten und die im Vergleich zum *tenuifolia*-Typ großen Infloreszenzen.

Ad F. Übergangstyp *versifolia*:

Diese oktoploide Form steht morphologisch zwischen *Valeriana officinalis subsp. tenuifolia* und *Valeriana officinalis subsp. excelsa*. Sie ist vor allem in montanen bis subalpinen Lagen der Westalpen bis zum westlichen Ostalpenrand vertreten. Der Gesamthabitus ähnelt dem *tenuifolia*-Typ, während die Ausformung der Fiederblätter

dem excelsa-Typ entspricht. Es gibt graduelle Zwischenstufen, die a priori weder den Grundtypen noch dem Übergangstyp verlässlich zugeordnet werden können.

I.3 Phytochemie und pharmazeutische Bedeutung

Unter der großen Anzahl an sekundären Inhaltsstoffen der Baldrianwurzel sind vor allem nicht-glykosidische Iridoide, ätherisches Öl mit bis zu 150 Komponenten, Sesquiterpen-Carbonsäuren, Flavonoide und Lignane charakteristisch. Diese Stoffgruppen beinhalten die Ausgangsstrukturen der bioaktiven Wirkstoffe. Darüber hinaus liegen Phenol-Carbonsäuren, Aminosäuren, monoterpenische Alkaloide, freie Fettsäuren und Kohlenhydrate vor. Die letztgenannten Verbindungen werden aufgrund ihres breiten Vorkommens unter den Spermatophyta in der Folge jedoch nicht näher erörtert. Zu den nicht-glykosidischen Iridoiden zählen die bekannten Valepotriate. Bei den Valepotriaten sind die OH-Gruppe der Halbacetale und zwei weitere Hydroxylgruppen der Iridoidstruktur mit Isolvaleriansäure und anderen Säureresten verestert. Diese Triesterstruktur ist mit einem Epoxidring verknüpft und bildet die Basis für die Gruppenbezeichnung (Valeriana-Epoxy-Triester) 'Valepotriate'. Hauptsächlich liegen die Verbindungen Valtrat und Isovaltrat vor. Gegenwärtig sind zwanzig Valepotriate bekannt. Diese Stoffgruppen sind instabil und thermolabil. In alkoholischer, saurer oder alkalischer Lösung werden sie schnell zu Valerian- und Isovaleriansäure, in geringerer Menge zu Baldrinalen bzw. Homobaldrinalen abgebaut. Der charakteristische, durchdringende und mit der Beinote Campher versehene Geruch, der an sich geruchlosen Baldrianwurzel, entsteht durch enzymatisch gesteuerte Umlagerungsaktionen, an denen Valepotriate sowie der im ätherischen Öl vorkommende Bornylisovaleriansäureester beteiligt sind. (Hänsel, R. & Sticher, O. 2007, Bos, R. et al. 2002).

Die flüchtigen ätherischen Öle enthalten in Abhängigkeit von der Herkunft des Pflanzenmaterials (Genotyp, Substratbeschaffenheit und Klima) bis zu 150 Mono- und Sesquiterpene. Diese Kohlenwasserstoffe sind azyklisch, monozyklisch oder bicyklisch. Die organischen Verbindungen weisen unterschiedlichste funktionelle Gruppen wie Aldehyde, Ester, Alkohole, Ketone, Phenole oder Oxide auf. Durch die Methode ihrer Gewinnung bestimmt (Frisch- oder Trockenmaterial, Destillation, Isolierung), werden

vier Chemotypen unterschieden: Valerianon, Valerianol, Cryptofauronol und Valerenal (Bos, R. et al. 1997). Hauptkomponenten des ätherischen Öls sind Valerianol und Bornylacetat.

Unter den schwer flüchtigen Cyclopentan-Sesquiterpen-Carbonsäuren sind vor allem Valeren- und Acetoxyvalerensäure für *Valeriana officinalis* s. l. und wenige andere europäische *Valeriana*-Arten spezifisch. Sie dienen bei der Qualitätskontrolle von Baldrianpräparaten als Leitsubstanzen (Hänsel, R. & Sticher, O. 2007). Weitere Inhaltsstoffe, denen eine pharmazeutische Wirkung zugeordnet wird, sind eine Fraktion von Lignanen, vor allem das Derivat Olivil, sowie die hydrophilen Flavonoide 6-Methylapigenin und Hesperidin.

Die Droge *Valerianae radix* (Baldrianwurzel) wird aus den getrockneten, unterirdischen Teilen Wurzelstock, Wurzeln und Ausläufern der Sammelart *Valeriana officinalis* hergestellt. Die Differenzierung in Kleinarten zeigt bis dato keine pharmazeutische Relevanz, da noch keine eindeutigen Korrelationen zwischen der Wirkstoffkonzentration und den einzelnen Subspezies verlässlich nachgewiesen wurden. In der Pflanzenzucht wurden Sorten entwickelt, die den Anforderungen der Pharmazie entsprechende Konzentrationen an den charakteristischen Sekundärmetaboliten - wie ätherischem Öl, Valerensäuren und Valepotriaten - enthalten. Die Konzentration dieser Inhaltsstoffe kann durch in vitro Methoden erhöht werden (Tousi, S. E. et al. 2010, Nell, M. et al. 2010). Der Gehalt an ätherischem Öl und dessen antimikrobielle Aktivität variieren in Abhängigkeit von dem Erntezeitpunkt (Letchamo, W. et al. 2004, Bos, R. et al. 1998).

Das Drogenanbaugebiet reicht in Europa von Belgien ausgehend über Deutschland, Polen, Ungarn bis nach Rumänien und Bulgarien. Darüber hinaus wird Baldrian in Russland, Japan und den USA kultiviert (Hänsel, R. & Sticher, O. 2007).

Die vielseitige pharmazeutische Anwendung von *Valerianae radix* als Gesamtextrakt ist seit der Antike bekannt. In der Gegenwart wurden zentral dämpfende, antikonvulsive, spasmolytische, muskelrelaxierende u. a. Wirkungen bestimmter Einzelsubstanzen wie Valepotriate, Valeranon und Valerensäure bestätigt (Morazzoni, P. & Bombardelli, E. 1995). Die Interaktion chemischer Verbindungen und Wirkstoffgruppen, auf der die sedierende Wirkung der Droge beruht, konnte bis dato nicht eindeutig definiert werden.

Man postuliert die Synergie mehrerer Stoffgruppen (Valpiani, C. 1995), i.e. Sesquiterpensäuren des Typs Valerensäure mit Flavonoiden, Lignanen und lipophilen Komponenten des ätherischen Öls als Ansatz für eine Theorie zur Wirkstofffunktion. Studien über sedierende Inhaltsstoffe geben unterschiedliche Neurotransmittersysteme und deren Rezeptoren als Target für die Wirkstoffe an. Dazu zählen der GABA-Rezeptorkomplex des Zentralnervensystems als Angriffspunkt für Flavonoide und Valerensäuren (Houghton, P. J. 1999), der Serotonin-Rezeptor-Subtyp 5-HT_{1A} und der Adenosin-Rezeptor ARA1, letztere als Ziel der Baldrianlignane. Der Serotonin-Rezeptor 5-HT_{1A} ist Angriffspunkt von Psychopharmaka, während der Adenosin-Rezeptor ARA1 antagonistische Aktivitäten, die zu einer Hemmung des wachheitserzeugenden Systems führen und somit Schlaf induzieren, aufweist. Der GABA_A-Rezeptor wirkt im Thalamus an der Einleitung und Aufrechterhaltung des Schlafes; er ist Angriffspunkt für Benzodiazepine und Barbiturate. Für die Valerensäure und deren Amidderivate wurden eine konzentrationsabhängige, den GABA_A-Rezeptor modulierende anxiolytische Aktivität nachgewiesen (Trauner, G. et al. 2007, Khom, S. et al. 2010, Hering, S. et al. 2007).

Eine Kernfrage aktueller Studien gilt dem Mechanismus der Überwindung der Blut-Hirn-Barriere durch die Valerensäure. Dieser Schritt bildet die Voraussetzung für die sedative Wirkung der mit dem GABA_A-Rezeptor interagierenden Wirkstoffe. Der Transport von Valerensäure und Valerensäurederivaten durch passive Diffusion, wie er bei den Benzodiazepinen unabhängig von der Dichte der Zellschichten stattfindet, konnte aufgrund geringster Permeabilitätsraten nicht nachgewiesen werden. Aus dieser Erkenntnis resultiert die Annahme, dass ein noch zu bestimmendes Transportsystem diese Aufgabe übernimmt (Neuhaus, W. et al. 2008). Bis zur Aufklärung dieser offenen Fragen kommt der Extrakt, der mit hoher Wahrscheinlichkeit über parallele Wirkstoffinteraktionen unterschiedlicher Polarität wirksam ist, in der Phytopharmazie zum Einsatz. Für die bestimmten Abbauprodukte der Valepotriate, i.e. Baldrinal und Homobaldrinal wurden *in vitro* zytotoxische und mutagene Eigenschaften nachgewiesen. Die Konzentration dieser Stoffe ist in der offiziellen Baldrianwurzel jedoch relativ gering und in handelsüblichen Präparaten aufgrund ihrer Instabilität nicht mehr vorhanden (Hänsel, R. & Sticher, O. 2007).

Der Nachweis für eine sedierende Wirksamkeit der in der Droge *Valerianae radix* enthaltenen Sekundärmetaboliten steht bis zum Erhalt neuer Resultate aus in vitro/in vivo Studien gegenwärtig zur Diskussion.

I.4 Polyploidie und Artabgrenzung

Im *Valeriana officinalis* Aggregat liegen drei unterschiedliche Zytotypen, deren Entstehung erforscht werden soll, vor (Titz, W. 1969, Dobeš, Ch. & Vitek, E. 2000). Diese Zytotypen sind das Ergebnis genomischer Duplikation, die auf verschiedene Weise, wie im Folgenden beschrieben erfolgen kann.

Die evolutive Entwicklung von Genomen hat über die sexuelle Reproduktion hinausgehend vor allem im Pflanzenreich eine Erweiterung durch häufig auftretende Polyploidisierung erfahren. Gegenwärtige Studien zeigen auf, dass polyploide Organismen dynamische Reaktionen zeigen, sowie rasche oder langsame strukturelle und funktionelle Anpassungen aufweisen können (e.g. multiple Polyploidisierung, Re-Diploidisierung). Daraus resultiert der aktuelle Forschungsansatz, die Multiplikation von Genomen als evolutionären Prozess aufzufassen. Schätzungen gehen davon aus, dass etwa zwischen 30% bis 70% aller Spezies der Angiospermen polyploide Genome aufweisen (Stebbins, G.L. 1971, Grant, V. 1981, Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998).

Bei den Pteridophyta ist Polyploidie die Norm, die Annahmen reichen bis zu 95% (Leitch, I. J. & Bennet, M. D. 1997), während sie bei Gymnospermen selten vorkommt (e.g. *Sequoia sempervirens*, tetraploid, Taxodiaceae). Im Tierreich tritt Polyploidie gelegentlich etwa unter Mollusken, Fischen und Amphibien auf. Unter den Mammalia ist die Duplikation des Gesamtgenoms äußerst selten; e.g. ist die in Argentinien endemische Monospezies *Tympanoctomys barrerae*, ein Nagetier, als tetraploid bekannt (Gallardo, M. H. et al. 2006). Die der Polyploidisierung zugrunde liegenden Voraussetzungen und die Auslöser für ihr häufiges Auftreten sind nicht vollständig erforscht. Faktoren wie Mehrjährigkeit, die Fähigkeit zu vegetativer Reproduktion, eine Tendenz zur Hybridisierung aller taxonomischen Ränge von der Spezies abwärts, geänderte Umweltbedingungen sowie die Verfügbarkeit ökologischer Nischen scheinen eine Rolle zu spielen (Stebbins, G. L. 1971). Die Genome polyploider Individuen verfügen über größere Plastizität als jene der diploiden Parentalgeneration. Sie zeigen

gesteigerte adaptive Fähigkeiten und besitzen oft eine höhere Heterozygotitätsrate, die vor allem bei der Allopolyploidie unmittelbar zu gesteigerter Vitalität (*hybrid vigor*) der Samen beiträgt (Mitton, J. & Grant, M. C. 1984). Bei der Polyploidisierung können Vergrößerungen der Zelle, des Zellkerns, der Stomata, der Blüten und Früchte sowie ein Anstieg der Photosyntheseleistung beobachtet werden.

Bei Polyploiden bietet die multiple Präsenz des Chromosomensatzes ein breites Spektrum an risikofreieren (e.g. bei *loss-of-function*) und variablen (e.g. *gain-of-function*, *gene-retention*, *gene-silencing* und Diploidisierung), evolutiven Entwicklungsmöglichkeiten für den Genotyp. Duplizierte Genome zeigen eine höhere Toleranz gegenüber Faktoren wie wechselnder Chromosomenzahl, Genomgröße, Mutationen (Indels), Translokation (Transposons) sowie genomischer Restrukturierung. Mit dieser Restrukturierung gehen Veränderungen der Genexpression, der Proteinsynthese und des Stoffwechsels, die zu neuen Öko- und Phänotypen führen können, einher (Wendel, J. F. 2000). Bei polyploiden Genomen, deren DNA Sequenzen keine Veränderung aufweisen, führen epigenetische Faktoren zu funktionellen Unterschieden in der Genexpression. Unmittelbare strukturelle Änderungen und funktionelle Reaktionen auf eine Genomduplikation wurden in erster Linie bei der Allopolyploidie (Hybridisierung) (Liu, B. & Wendel, J. F. 2003, Levy, A. A. & Feldman, M. 2004) beobachtet.

Bei Autopolyploidie hingegen sind die Umstrukturierung des Genoms und Änderungen in der Genexpression in den ersten Generationen geringfügiger (Hegarty et al., 2006, Stupar, R. M. et al. 2007, Albertin, W. et al. 2007). Der unmittelbare Vorteil einer Genommultiplikation ist somit bei der Autopolyploidie nicht klar erkennbar. Die vorhandene Genredundanz kann jedoch die adaptive Divergenz von duplizierten Genen begünstigen und somit die Flexibilität und Beständigkeit der Autopolyploiden erhöhen.

Die Genome zahlreicher, heute diploider Organismen, waren im Laufe ihrer evolutiven Entwicklung polyploid. Sie unterlagen Duplikation und Reduktion. Diese Genotypen werden als palaeo-polyploid (*ancient polyploid*) bezeichnet (Tate, J. A. et al. 2005).

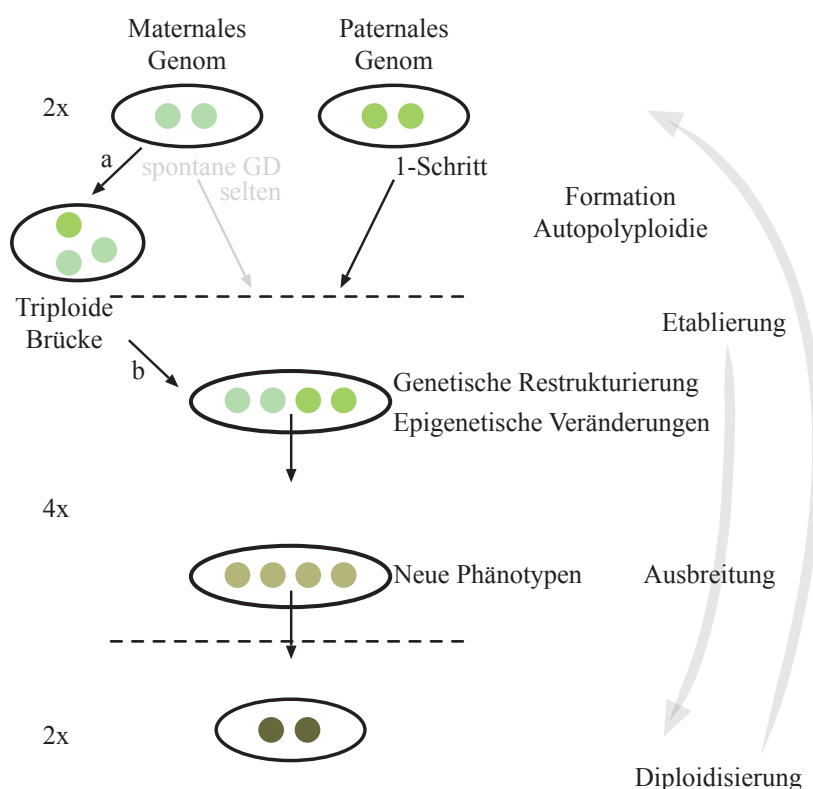


Abbildung 5: Autopolyploidie, möglicher Zyklus verändert nach Parisod, Ch. et al. 2009

Polyploidie kann den Gesamtorganismus betreffen oder auch nur auf Zellen einer bestimmten Geweberegion beschränkt bleiben. Im letzten Fall spricht man von Endopolyploidie die durch Endoreduplikation (Replikation des Zellkerns ohne Zytokinese) einer somatischen Zelle entsteht. Sie tritt bei Pflanzen unter anderem in Gattungen der Brassicaceae, bei den Brennhaaren von *Urtica dioica* (Urticaceae), im Tierreich bei den Speicheldrüsenzellen von *Drosophila* oder in menschlichen Leber- oder Muskelzellen auf.

Polyploidie kann auch chemisch induziert werden, e.g. durch Zellgifte wie Colchicin oder Oryzalin, die eine Aufteilung der Chromatiden während der Zytokinese verhindern, indem sie die Mikrotubuli der Mitosespindel angreifen. Diese Methode wird in der Nutzpflanzenzucht häufig eingesetzt, um durch Polyploidisierung eine Steigerung der Heterosis zu erlangen.

Das polyploide Genom entsteht entweder durch die somatische Duplikation des diploiden Chromosomensatzes einer Zelle, mit gleichzeitiger Nicht-Segregation der Mitoseprodukte zu den Polen oder durch die Nichtreduktion während der Meiose, wobei die Zellwandformation ausbleibt. Das Ergebnis kann tetraploides Gewebe, oder wie im Fall einer duplizierten Zygote ein tetraploides Individuum sein. Bei einem Meiosefehler entstehen diploide Gameten. Fusionieren diese, formiert sich der tetraploide Organismus der nächsten Generation in einem Schritt. Häufig bilden ein diploider und ein haploider Gamet vorerst ein triploides Individuum – eine 'triploide Brücke'. Falls nun die Generation F1 einen weiteren, unreduzierten (triploiden) Gamet bildet und dieser mit einem normalen, reduzierten haploiden Gameten fusioniert, kann in zwei Schritten gleichfalls ein tetraploider Organismus entstehen. Etwa 30% der Abkömmlinge von Triploiden sind tetraploid (Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998). Tetraploide F1-Individuen sind in der Reproduktion von der diploiden Eltern generation abgegrenzt.

Der Polyploidietyp wird, nach klassischer Auffassung, durch die Definition der Parentalchromosomen bestimmt (Grant, V. 1981, Clausen, J. et al. 1945, Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998). Intraorganismische oder intraspezifische Genomduplikation erzeugen Autopolyploidie (Organ, Gewebe, Individuum), während bei der Hybridisierung unterschiedlicher Spezies und der Verdoppelung nicht homologer Chromosomensätze ein Allopolyploidie entsteht.

Ursprünglich galt die Definition Autopolyploidie nur für die Verdoppelung und Vervielfachung des gleichen Chromosomensatzes. Heute wird sie auch für die Kreuzung und Polyploidisierung diploider Varianten einer Art verwendet. Die Neo-Autopolyploiden unterscheiden sich morphologisch, haben ein eigenes Verbreitungsgebiet und unterschiedliche ökologische Ansprüche. Eine Kreuzung der diploiden Eltern ergibt fertile diploide F1-Individuen, während bei der Allopolyploidie die Kreuzung der diploiden F1-Generation steril ist. Der eigentlich entscheidende Faktor für die Autopolyploidie ist nicht die Frage der taxonomischen Identität, sondern der Grad an Homologie, den die Chromosomen aufweisen. Sie können genetisch unterschiedlich sein; es müssen jedoch, e.g. bei Tetraploiden, alle vier Homologen zu vollkommener Paarung und Chiasmenbildung fähig sein (Müntzing, A. 1976). Autopolyploidie verläuft tendenziell über die Formierung der homologen

Chromosomen zu Multivalenten, was - häufiger als bei Diploiden - zur Bildung aneuploider Gameten und zu einer daraus resultierenden herabgesetzten Fertilität führen kann.

Bei der Allopolyploidie formieren sich vorwiegend meiotische Bivalente, da sich nur homologe Chromosomen paaren (Ramsey, J. & Schemske, D. W. 2002). Über diese,-genomische-, Allopolyploidie (AABB) hinaus treten die Formen segmentale Allopolyploidie (AsAsAtAt) und die Mischform Auto-Allopolyploidie (AAAABB) auf (Grant, V. 1981). Bei der segmentalen Allopolyploidie stimmen die Genome mehrheitlich noch überein. Eine Reihe von Segmenten ist jedoch bereits differenziert. Die Reproduktion der Ausgangsindividuen würde zu einem sterilen Abkömmling (2x) führen (Gottschalk, W. 1976). Bedingt durch den Grad an struktureller Divergenz, den die Chromosomen aufweisen (\leq Basis der Affinität zur Anlagerung), entstehen während der Meiose Multivalente und Bivalente. Die Auto-Allopolyploidie ist eine Mischform, bei der e.g. ein bereits allopolyploider Chromosomensatz dupliziert wird. Der Vollständigkeit halber soll auch auf die Möglichkeit einer Polyploidisierung durch Polyspermie (Fertilisation einer Eizelle mit zwei Spermakernen) hingewiesen werden, was im Text nicht näher erläutert wird.

Die Bildung polyploider Organismen ist nicht auf eine Duplikationsrunde begrenzt. Es können Reihen von Polyploidisierungsereignissen auftreten (4x, 8x, 12x), die aufgrund von 'Polyploidieausfällen' - wie e.g. durch Aneuploidie - arithmetisch, nicht immer linear, verlaufen müssen. Bei der Aneuploidie divergiert der Chromosomensatz meist um ein Chromosom (\pm) vom genauen Vielfachen der Chromosomengrundzahl. Sie kommt bei Polyploiden sehr häufig vor. Je höher die Chromosomenzahl vom ursprünglichen, haploiden Chromosomensatz x abweicht, umso seltener tritt diese Unregelmäßigkeit auf (Ramsey, J. et al. 2002). Polyploide Organismen zeigen im Gegensatz zu Diploiden erhöhte Toleranz gegenüber *polyploidy drops* (Darlington, C. D. 1963).

In der Natur können im Laufe vieler Generationen wiederholt Übergänge zwischen Autopolyploidie und Allopolyploidie stattfinden. Während die Artbildung durch Allopolyploidie in der Pflanzensystematik, nicht zuletzt aufgrund morphologischer Differenzierung, breite Akzeptanz findet, wird die Taxonomie autopolyploider

Pflanzengruppen, die morphologisch oft schwer zu unterscheiden sind, kontrovers diskutiert. Lange war man der Annahme, dass Allopolyploidisierung häufiger stattfinden würde und Autopolyploidie ein seltenes Ereignis mit inferiorer Fitness hinsichtlich genetischer Fitness wäre. Jüngere Studien widersprechen jedoch dieser Annahme (Ramsey, J. and Schemske, D. W. 1998, Soltis, D. E. et al. 2007).

In jedem Fall ist ein polyploider Organismus a priori nicht uneingeschränkt als der diploiden Parentalgeneration überlegen einzustufen. Er ist, wie alle Individuen sympatrischer Populationen, den Anforderungen der natürlichen Selektion unterworfen, muss im Habitat konkurrieren oder neue ökologische Nischen erobern.

Im Fall von *Valeriana officinalis* agg. sind Art und Anzahl der Polyploidisierungsschritte, die zur Entstehung der drei bekannten Zytotypen führten, unbekannt.

I.5 Genetische Marker in der Pflanzensystematik

Morphologische Marker

Evolution bedeutet die Veränderung von Allelfrequenzen innerhalb einer Population im Verlauf der Zeit. Diese Veränderungen entstehen durch Mutationen, Rekombination und Selektion. Diversifikation und Speziation sind die Folgen dieser Ereignisse. Bei der Beobachtung und Klassifikation genetischer Veränderungen wurden vor der Entwicklung molekularbiologischer Methoden vorwiegend morphologische Charaktermerkmale der Phänotypen analysiert. Seit dem Anfang des 20. Jahrhunderts und der Akzeptanz der Mendel'schen Vererbungstheorie dienen morphologische Merkmalsausprägungen und die Beobachtung ihrer Differenzierung verstärkt der phylogenetischen Bestimmung von Pflanzengruppen. Sie sind (\pm) offensichtlich und repräsentieren, sofern eine ausreichend große Anzahl an morphologischen Markern detektierbar ist, Informationen auf umfassender, genomischer Basis.

Von Nachteil ist jedoch, dass Merkmalsunterschiede auch durch nicht genetische Faktoren, wie e.g. Umweltbedingungen hervorgerufen werden und Pflanzenarten per se ein hohes Ausmaß an ökologischer und morphologischer Plastizität aufweisen. Die Richtungsbestimmung einer Merkmalsänderung gestaltet sich oft schwierig. Ursprüngliche oder abgeleitete Merkmale sind nicht eindeutig zu klassifizieren.

Konvergente Evolution von Merkmalen kann durch morphologische Beobachtung ebenfalls nur schwer erfasst werden.

Biochemische Marker

In den 1960er Jahren wurden morphologische Marker auf molekularer Ebene vorerst durch biochemische Marker, sogenannte Isozyme, ergänzt. Es handelt sich dabei um Enzyme, deren Polypeptidketten in der Abfolge der Aminosäuren differenziert sind, die aber die gleiche Reaktion auslösen. Die Unterschiede in der Abfolge der Aminosäuren sind durch Gel- oder Acrylamidelektrophorese nachzuweisen. Isozyme sind allelspezifisch; heterozygote Individuen können durch sie von homozygoten unterschieden werden. Sie sind daher als Marker co-dominant. In ihrer selektiven Effizienz sind sie als Sekundärprodukte den eigentlichen molekularen Markern, deren DNA-Basensequenzen direkt analysiert werden, unterlegen. Bei Translation der mRNA führt nicht jede Nukleotid-Substitution an der dritten Basenposition des Triplet-Codon zu einer unterschiedlichen Aminosäure. Daher wird eine reduzierte Anzahl an variablen Markern generiert, die nicht der Anzahl der tatsächlich im Genom vorliegenden Mutationen und den daraus zu exprimierenden, möglichen Aminosäuren entspricht.

Molekulare Marker Überblick

Ab Mitte des 20. Jahrhunderts wurde aufgrund der Verfügbarkeit neuer molekularbiologischer Methoden die systematisch-phylogenetische Forschung intensiviert. Richtungsweisende Schritte waren die Entdeckung bakterieller Restriktionsenzyme (Arber, W. & Linn, S. 1969, Danna, K. J. & Nathans, D. 1971) und thermostabiler Polymerasen sowie die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion PCR (Mullis, K. B. & Falloona, F. A. 1987), der enzymatischen DNA-Sequenzierung (Sanger, F. et al. 1977) und der genetischen *fingerprint*-Methode RFLP (Botstein, D. et al. 1980).

Diese Techniken sind die Grundlage aktueller, molekulargenetischer Markermethoden, die eine durch Mutationen und Rekombination entstandene Variabilität der DNA detektieren. Für die Aufklärung phylogenetischer Fragestellungen sind DNA-Analysen aller taxonomischen Ränge möglich. Sie umfassen inter- und intraspezifische

Fragestellungen sowie die Bestimmung von Genotypen. Die Anwendung genetischer Marker führte zu einer neuartigen und direkten Betrachtungsweise phylogenetischer Zusammenhänge. Ein Vorteil molekulargenetischer Methoden ist die hohe Anzahl an zu erzielenden Merkmalen, die normierte Merkmalsausprägungen (4 Nukleotide) aufweisen. Diese Merkmale liefern adäquate Datenmengen für fortschrittliche, biostatistische Auswertungsmethoden.

Hinzu kommt, dass molekulare Marker chemische Identität besitzen und aufgrund der normierten Merkmalsausprägungen als gleichwertig angesehen werden können. Die Merkmalerkennung ist objektiv; unabhängige DNA-Analysen kommen zu dem gleichen Ergebnis. Frühe Molekularsystematiker postulierten, dass molekulare Daten Änderungen auf Genomebene unmittelbar widerspiegeln und daher in einem größeren Ausmaß - und eindeutiger als morphologische und biochemische Daten - die eigentliche Phylogenie erkennbar machen würden. Diese Annahme ist größtenteils bestätigt, dennoch sind auch auf molekularen Markern basierende Daten Unklarheiten, wie e.g. Homoplasie, ausgesetzt (Judd, W. S. et al. 2008).

Als molekulare Marker kommen in der analytischen Pflanzensystematik das fragmentierte Gesamtgenom der Pflanzenzelle sowie bestimmte Sequenzen des Kerngenoms und der Organellengenome (Chloroplast und Mitochondrion) zur Anwendung. Die Auswahl des molekularen Markers ist für das Ergebnis der Analyse entscheidend und erfolgt bei Sequenzierungsmethoden u.a. anhand der Kriterien 'Variabilität' und 'Konservierung', die ein Genomtyp oder Sequenzen eines Genoms aufweisen. Der Selektion ausgesetzte Exons von Genen sind stärker konserviert als deren Introns oder intergenische Spacer-Regionen. Nicht kodierende DNA-Sequenzen weisen höhere Variabilitätsraten auf und werden vor allem für Untersuchungen niedriger taxonomischer Ränge eingesetzt. Kodierende Genabschnitte sind für Studien auf Klassen-, Ordnungs- und Familienniveau adäquat.

Entscheidend für die evolutionäre Dynamik ist die Art der Vererbung des DNA-Materials. Biparental vererbte DNA weist aufgrund von Rekombination und der damit verbundenen Neustrukturierung der Allele eine höhere Evolutionsrate als uniparental vererbte DNA auf. Bei der Anwendung genetischer *fingerprint*-Techniken erfolgt die Auswahl der Methode, in Abhängigkeit von der Fragestellung, durch die

Unterscheidung zwischen dominanten und co-dominanten Markern. Dominante Marker unterscheiden nicht zwischen der Ausprägung der homologen Allele, sie detektieren Präsenz/Absenz von Fragmenten an einem bestimmten Genlocus. Der Polymorphismus ist durch die Längenunterschiede der Fragmente, deren Sequenzen unbekannt bleiben, bestimmt. Co-dominante Molekularmarker unterscheiden homozygote und heterozygote Ausprägungen homologer Allele (i.e. AA, Aa).

I.5.1 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wird die Abfolge der Nukleotide (DNA, RNA) erkannt. Für Anwendungen in der Nutzpflanzenzucht wurden bereits einige Genome vollständig sequenziert (*Arabidopsis thaliana*-Arabidopsis Genome Initiative 2000, *Oryza sativa*-Goff S. A. et al. 2002, *Zea mays*-Schnable, P. S. et al. 2009). Da die Sequenzierung gesamter Genome jedoch sehr kostenintensiv ist, werden bei phylogenetischen Fragestellungen bekannte Gene oder intergenische DNA-Abschnitte für die Analyse herangezogen. Im ersten Schritt werden bei dieser Methode molekulare Marker mit bekannter Sequenz zuerst mittels PCR amplifiziert. Anschließend wird die 'Kettenabbruch-Methode' (Sanger, F. et al. 1977) durchgeführt. Dabei binden fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs), die neben den dNTPs und PCR-Reagenzien ebenfalls Bestandteil der Lösung sind, an die denaturierte DNA. Die lineare Amplifikation erfolgt mit nur einem Primer. Die ddNTPs bewirken aufgrund ihrer chemischen Struktur den Abbruch des DNA-Einzelstranges an dessen 3' Ende. Die dem Nukleotid fehlende Hydroxylgruppe verhindert die Anlagerung der Polymerase I. Daher weist jedes Abbruchfragment ein detektierbares Nukleotid am 3' Ende auf. Die PCR-Produkte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, durch Laseranregung der Farbe entsprechend ausgelesen und als Chromatogramm visualisiert.

Chloroplastengenom

Das seit 20 Jahren in der Pflanzensystematik häufig verwendete Chloroplastengenom bietet eine Reihe von kodierenden und nicht-kodierenden cpDNA-Sequenzen, die nach dem Grad ihrer Evolutionsraten für Analysen herangezogen werden. Allgemein gültig ist, dass die Evolution des einfachen, in Struktur und Funktion den Bakterien nahe

stehenden, stabilen Chloroplastengenoms aufgrund der vorwiegend uniparentalen (maternal, paternal) Vererbung langsamer verläuft als die des nuklearen Genoms. Es liegt in den Chloroplasten in zahlreichen Kopien vor. Daher ist es im Extrakt genomischer DNA in Multikopien vorhanden, wodurch die Anlagerung der Primer bei PCR-Amplifikation begünstigt wird (Small, R.L. et al. 2004). Die stärker konservierten Gensequenzen *rbcL*, *atpB*, *matK*, und *ndhF* werden vor allem für die Analyse höherer taxonomischer Ränge ab Familienniveau eingesetzt. Introns (*trnK*, *trnK*, *rpoC1*, *rpL16*) und Intergenic-Spacer (*trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*) dienen der phylogentischen Forschung auf Artniveau.

Nukleargenom

Das Kerngenom weist die höchste Evolutionsrate aller Genome einer Pflanzenzelle auf. Es beinhaltet 99% der zellulären DNA, deren Gene aus kodierenden (Exons) und nicht-kodierenden Abschnitten (Introns) bestehen. Einen hohen Anteil pflanzlicher Kern-DNA stellen die intergenischen repetitiven Elemente (*junk*-DNA) dar (Wolfe, K. H. et al. 1987).

Aus dem Kerngenom wird vor allem die *internal transcribed spacer* Region ribosomaler DNA (rDNA) genützt. Diese Region ist nicht-kodierender Teil einer in tausenden Ausgaben (*tandem repeats*) vorliegenden Genfamilie. Der rDNA-Abschnitt kodiert für das an der großen ribosomalen Untereinheit beteiligte Molekül 5S RNA. Die variablen ITS-Regionen ITS1 und ITS2 liegen zwischen den konservierten ribosomalen Genuntereinheiten 26S, 5,8S, 18S, die als Einheit transkribiert werden. Das gesamte Operon wird durch 2 Segmente, den *external transcribed spacer* (ETS) und den *intergenic spacer* (IGS), begrenzt. Der ETS wird ebenfalls als molekularer Marker verwendet. Das Zentrum der IGS Region ist höchst variabel; der gesamte IGS wird nicht transkribiert. Die *tandem repeats* der rDNA Abschnitte und damit auch die Regionen ITS1, ITS2 und ETS unterliegen insgesamt dem Vorgang konzertierter Evolution (*concerted evolution*) (Coen, E. 1988) (Hillis, D.M. and Davis, S.K. 1988). Grundsätzlich evolvieren Introns und Exons in Abhängigkeit von ihrer chemischen Struktur und letztere auch in Abhängigkeit von der späteren Funktion der Produkte in unterschiedlichen Mutationsraten. Bei *concerted evolution* erfolgt darüber hinausgehend, durch Vorgänge wie Rekombination, Genkonversion und Mutation

bedingt, die mehrheitlich rasche Homogenisierung der im Genom vorliegenden *tandem repeats*. Prehomogenisierte Stadien der ITS-Region sind intraspezifisch, intrapopulär und intraindividuell nachzuweisen (Heterozygotität). Interspezifisch sind frühe Polymorphismen nur dann zu erkennen, wenn die Speziation schneller als die Homogenisierung stattfindet, was e.g. bei explosiver Ausbreitung der Fall sein kann (Hillis, D.M. and Davis S.K. 1988). Auf spezifischer Ebene ist die Homogenisierung durch *concerted evolution* im Allgemeinen als abgeschlossen zu betrachten. Für die phylogenetische Analyse kann, je nach Art der eingesetzten Primer, entweder nur ein bestimmter Abschnitt oder die gesamte Region des rDNA Operons genützt werden. Die ITS-Region wird vorwiegend für die Rekonstruktion phylogenetischer Zusammenhänge auf Artniveau eingesetzt (Judd, W. S. et al. 2008).

Die Introns nuklearer Genfamilien (*lowcopy number genes*) werden, da sie in der Nukleotidabfolge ebenfalls eine hohe Variabilität aufweisen, für die phylogenetische Systematik genützt. Vorab muss sichergestellt werden, dass es sich um orthologe Gene und nicht um Duplicate (*paralogues*) handelt. Zu dieser Gruppe von Genen zählen e.g. die Gene des Phytochroms (A, B, C, E) und eine Reihe nuklearer Gene, die für unterschiedliche Enzyme kodieren. Sie werden für Studien nah verwandter Arten und für Untersuchungen auf Populationsebene verwendet (Olsen, K. M. and Schaal, B. A. 1999).

Mitochondriales Genom

Das mitochondriale Genom weist aufgrund uniparentaler Vererbung hoch konservierte Sequenzen auf. Ein großer Anteil des Genoms besteht aus instabiler junk-DNA. In der Pflanzensystematik wird auf dieses Organellengenom mehrheitlich verzichtet. Gene wie *atpI* und *atpA* (Davis, J. I. et al. 2004), (Soltis, D. E. et al. 2002), die für Untereinheiten der ATP-Synthase kodieren, oder das Gen der Cytochromoxidase (*coxI*) (Robba, L. et al. 2006), kommen bei der phylogenetischen Analyse ursprünglicher, großer Pflanzengruppen zur Anwendung.

Die genannten molekularen Marker stellen jedoch nur einen geringen DNA-Anteil in Bezug auf das Gesamtgenom dar. Daher werden, um objektive Ergebnisse zu erzielen, bei phylogenetischen Analysen, die direkte DNA-Sequenzen wiedergeben, meist

molekulare Marker unterschiedlicher genomischer Provenienz für dieselben Akzessionen eingesetzt.

I.5.2 Methoden der genetischen fingerprint-Analyse

Für intraspezifische Analysen von Artkomplexen sowie für populationsgenetische Fragestellungen ist die Methode der DNA-Sequenzierung kurzer Genomfragmente zumeist nicht ausreichend selektiv. Daher wurden Methoden, die einen genetischen Fingerabdruck des Gesamtgenoms darstellen und Polymorphismen von Sequenzen mit bekannter (locus-spezifisch) oder unbekannter Nukleotidabfolge (locus-unspezifisch) aufdecken, entwickelt. Zu diesen Methoden zählen RFLP (Botstein, D. et al. 1980), RAPD (Williams, J. G. et al. 1990), AFLP (Vos, P. et al. 1995) und SSR/Mikrosatelliten (Tantz 1984).

Locus-spezifische Marker

RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism

Die RFLP-Technik erstellt durch die Anwendung von Restriktionsenzymen DNA-Abschnitte. Diese Enzyme binden an spezifische Sequenzen, sogenannte Restriktionsschnittstellen (*restriction sites*) und trennen die DNA in doppelsträngige Fragmente. Mutationen (Indels, Transition, Transversion) an den Restriktionsschnittstellen der Akzessionen weisen Unterschiede in der Nukleotidabfolge auf und sind bei dieser Methode die den Polymorphismus determinierenden Faktoren. Die Anzahl der erzielten Marker-Fragmente pro Akzession kann, wie auch deren Nukleotidabfolge, divergent sein. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Banden wird zur Identifikation der Variabilität zwischen den Akzessionen ein Southern Blot, bei dem die Hybridisierung der einzelnen DNA-Fragmente mit markierten, spezifischen DNA-Sonden erfolgt, durchgeführt. Für die phylogenetische Pflanzensystematik wurde die RFLP-Methode nach Botstein et al. adaptiert (Helentjaris et al. 1986). Die RFLP-Methode bietet den Vorteil der Co-Dominanz und somit selektives, allelspezifisches Potential auf Niveau des Genotyps. Von Nachteil sind die große benötigte Menge an

hochwertiger DNA sowie die oft geringe Anzahl und mögliche Redundanz der Merkmale.

Mikrosatelliten-SSR

Für die DNA-*fingerprint*-Analyse einzelner Individuen und die Charakterisierung von Pflanzengruppen und Populationsstrukturen (Judd, W. S. et al. 2008) stehen hochrepetitive und instabile, 2 bp bis 6 bp lange SSR-Sequenzen (*short single repeats*), zur Verfügung. Sie werden als Mikrosatelliten (Litt, M. & Luty, J. A., 1989) bezeichnet und liegen per se hochvariabel, in großer Anzahl als nicht kodierende *tandem repeats* ubiquitär in den Genomen von Eukaryoten und Prokaryoten vor (Tautz, D. & Renz, M. 1984). In der phylogenetischen Pflanzensystematik kommen häufig die SSR-Sequenzen des Kerngenoms als molekulare Marker zur Anwendung. Die in den repetitiven SSR-Sequenzen auftretende Variabilität wird in erster Linie durch Nukleotidverschiebungen, i.e. Fehlpaarungen (*slippage, mismatch pairing*), die während der DNA-Replikation auftreten, ausgelöst. Reparaturmechanismen führen zu Deletion oder Insertion von Replikaten, deren Folge Polymorphismen an bestimmten Loci der Mikrosatelliten sind.

Mikrosatelliten liegen über das gesamte Genom verteilt vor und es ist daher möglich, eine große Anzahl an Polymorphismen zu generieren. Die Technik basiert auf der PCR-Amplifikation vorab identifizierter SSR-Sequenzen durch locus-spezifische Primer und wurde Anfang der 1990er Jahre erstmalig auf dem Gebiet der Pflanzenforschung eingesetzt (Akkaya, M. S. et al 1992). Die Primer Oligonukleotide müssen komplementär zu den die SSR-Sequenzen flankierenden Nukleotidabfolgen entwickelt werden. Die markierten (Fluoreszenz, Ethidium-Bromid, usw.) Amplikons werden auf Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert. Vorteile der Mikrosatelliten sind deren Locus-Spezifität und Co-Dominanz. Die Allele werden nach den Mendel'schen Richtlinien vererbt und weisen ein hohes Maß an Heterozygotität auf. (Weising, K. et al. 1998).

Locus-unspezifische Marker (dominant-rezessiv)

RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA

Die PCR-Methode RAPD amplifiziert unbekannte DNA-Abschnitte durch beliebige Primer, Oligonucleotide mit einer Länge von etwa 10 bp. Der GC Gehalt der Primersequenzen sollte 50% betragen. Die Bildung der Amplikons ist von der Funktionalität der Primerbindung an die DNA abhängig. Es müssen zwei identische Zielsequenzen vorhanden sein. Ist der Abschnitt zwischen den Primern zu lang (über 2 kbp) oder liegen die 3' Enden der Oligonucleotide nicht gegenüber, erfolgt keine Amplifikation. Die Polymorphismen der replizierten Sequenzen entstehen auch aufgrund von Mutationen, die an den Primer-Bindungsstellen vorliegen. Bei Veränderungen an den Primer-Bindungsstellen, die zu einer Nicht-Anlagerung der Primer führen, unterbleibt die Amplifikation. Die elektrophoretisch aufgetrennten Amplikons werden mit Ethidiumbromid gefärbt und nach Präsenz/Absenz detektiert. Bei der RAPD-Technik erfolgt die Segregation der Allele dominant. Die von Williams et al. (Williams, J. G. et al. 1990) entwickelte RAPD-Methode benötigt, da die Fragmente mit der PCR millionenfach amplifiziert werden, eine geringere Menge an Ausgangs-DNA. Von Nachteil sind jedoch die bei der PCR wahrscheinlich aufgrund der beliebigen Primer häufig auftretenden Artefakte und eine erhöhte Sensibilität hinsichtlich einer Variation der PCR-Parameter.

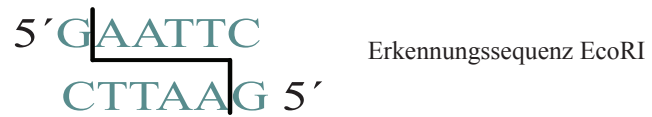
AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism

Die DNA Fingerprint-Methode AFLP wurde von Vos und Zabeau entwickelt (Vos, P. et al. 1995) und von dem Unternehmen Keygene 1993 (Zabeau, M. et al. 1993), (Vuylsteke, M. et al. 1999) patentiert. Bei der AFLP-Technik werden Präsenz oder Absenz an bestimmten Genloci als Polymorphismen detektiert. Die Methode besteht aus den drei Abschnitten:

1. Restriktion der DNA und Ligation der Adapter
2. Präamplifikation und selektive Amplifikation der Restriktionsfragmente
3. Elektrophoretische Auftrennung und Detektion der amplifizierten Fragmente

Die funktionelle Grundlage der Technik bilden zwei aufeinander folgende, unterschiedlich selektive PCR-Amplifikationen von Restriktionsfragmenten, die vorher durch den Verdau gesamtgenomischer DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen, meist MseI und EcoRI, erzeugt wurden. Produkte des Restriktionsvorganges sind mehrheitlich kurze Fragmente mit einer Länge von etwa 50 bp bis 500 bp. In geringerer Anzahl liegen Fragmente mit einer Länge zwischen 500 bp bis etwa 1700 bp vor. An die ungleichen Enden (*sticky ends*) der Restriktionsschnittstellen werden doppelsträngige Adapter, kurze Oligonukleotide mit einer Länge von 14 bp bis 20 bp, ligiert. Die Sequenzen der Adapter sind, bis auf den zu den Restriktionsstellen komplementären Teil eines Stranges, beliebig gestaltet. Die Vervielfältigung der Restriktionsfragmente erfolgt durch die PCR. Die Menge der Amplikons wird dabei durch Anzahl der selektiven Nukleotide, die die PCR-Primer beinhalten, gesteuert. Die für die Amplifikationen verwendeten Primersequenzen sind mit den bekannten Sequenzen der Adapter kompatibel und etwa 16 bp bis 22 bp lang. Darüber hinaus sind die Primer am 3' Ende mit einem selektiven Nukleotid für die Präamplifikation und mit drei selektiven Nukleotiden für die darauf folgende selektive Amplifikation ausgestattet. Durch die Bindung radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter, selektiver Primer werden die produzierten Amplikons detektierbar. Sie werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Bandenmuster identifiziert und durch ein Elektropherogramm visualisiert.

Die AFLP-Methode ermöglicht die gleichzeitige Amplifikation von multiplen Fragmenten genomischer DNA mit unbekannter Sequenz. Polymorphismen, die in unterschiedlichen Basenpaarlängen der Fragmente vorliegen, werden analysiert und in einer binären Matrix dargestellt. Die Auswertung erfolgt vor allem durch Distanzmethoden, die Ähnlichkeit bemessen. Aufgrund der großen Anzahl an möglichen Fragmenten gibt diese Methode einen umfassenden Überblick über die genetische Variation des gesamten Genoms. Es können jedoch homozygote von heterozygoten Allelen a priori nicht unterschieden werden. AFLPs sind dominante Marker, die - wie die RAPD-Methode - nur Unterschiede zwischen Präsenz/Absenz der Fragmente und nicht zwischen Ausprägungen der Allele aufzeigen.



Präselektiver Primer EcoRI 5'GACTGCGTACCAATTCN



Selektiver Primer EcoRI 5'GACTGCGTACCAATTCNNN



Präselektiver Primer MseI 5'GATGAGTCCTGAGTAAAN



Selektiver Primer MseI 5'GATGAGTCCTGAGTAAANNN



Abbildung 6: Prinzip der AFLP-Methode

I.6 Zielsetzung der Diplomarbeit

Die Zielsetzung dieser Diplomarbeit ist die Etablierung der molekulargenetischen *fingerprint*-Methode AFLP für das *Valeriana officinalis* Aggregat. Bei der Anwendung der AFLP-Methode für den zahlreiche Untergruppen umfassenden Artkomplex treten folgende Fragestellungen auf:

1. Welche DNA-Extraktionsmethode ist für diese Artengruppe am besten geeignet?
2. Erzeugen die entwickelten AFLP-Primerkombinationen eine genügende Anzahl an aussagekräftigen Markern?
3. Ist die an den Artkomplex adaptierte Methode reproduzierbar?
4. Können die zahlreichen Kleingruppen des Artkomplexes auf molekularer Ebene, über die bekannten Ploidieniveaus (2x, 4x, 8x) hinausgehend, voneinander abgegrenzt werden?
5. Ist die evolutionäre Entwicklung der Kleinarten nachvollziehbar?

Die gegenwärtige Unklarheit gegenüber jenen Gruppen beruht vor allem auf nicht molekularen, zytologischen und morphologischen Daten, die oft in Widerspruch zueinander stehen. In einer neuen, umfassenden am Department für Pharmakognosie der Universität Wien durchgeführten Studie werden 82 zentraleuropäisch verbreitete Populationen von *Valeriana officinalis* agg. mit unterschiedlichen Methoden der Pflanzensystematik, i.e. Morphometrie, Durchfluss-Zytometrie und Chromosomenzählung, untersucht. Die mit den genannten Methoden erstellten Daten bilden die Grundlage für eine multivariate biostatistische Analyse. Auf molekularbiologischer Ebene kann auf fortgeschrittener Projektstufe, die AFLP-Methode, deren selektives Potential bis auf Populationsniveau reicht, zur Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Kleingruppen von *Valeriana officinalis* agg. beitragen.

Die per se in den Bereichen Pflanzensystematik und Pflanzenzucht seit Ende der 1990er Jahre weit verbreitete AFLP-Technik muss für die phylogenetische Analyse jeder Artengruppe hinsichtlich des Modus der DNA-Extraktion sowie der Gestaltung von Adapter- und PCR-Primer-Kombinationen speziell etabliert werden. Bei der großen Anzahl an Versuchseinheiten ist es auch wichtig, Kosten- und Zeitfaktoren bei der

Auswahl adäquater Methoden, vor allem für den Schritt der DNA-Extraktion, einfließen zu lassen.

Für die DNA-Extraktion werden daher drei Schnell-Isolierungskits unterschiedlicher Hersteller und die labortechnisch aufwendigere CTAB-Methode getestet. Acht Akzessionen aus acht Populationen von *Valeriana officinalis* agg. werden für die Erstuntersuchungen herangezogen (Auflistung der Populationen Anhang S. 97). Die isolierte DNA wird auf Konzentration und Reinheit mit dem Spectrophotometer NanoDrop ND-1000, und daraus resultierend, auf ihre Gesamtmenge überprüft. Ein Vergleich der Resultate soll zur Auswahl einer den Ansprüchen des Gesamtprojektes entsprechenden DNA-Extraktionsmethode führen.

Zur Probe der Funktionalität der spezifisch entwickelten Adapter- und Primer-Kombinationen wird die AFLP-Methode mit isolierter DNA von sieben Individuen durchgeführt. Durch ein Primerscreening mit 12 AFLP-Primerkombinationen werden drei Primer ausgewählt. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu verdeutlichen, wird der Vorgang in unabhängigen Ansätzen 3x durchgeführt.

Die Effizienz der AFLP-Methode wird durch eine Partialanalyse erprobt. Dabei werden molekulare Daten von 89 Individuen unter Verwendung Primerkombinationen (je 4-5 Akzessionen aus 18 Populationen) generiert. Die Analyse der genetischen Diversität der Phänotypen durch auf Distanzmethoden basierende Darstellungen und die Berechnung gemeinsamer Allele (*allele-sharing*) der vorhandenen Ploidieniveaus diploid, tetraploid und oktoploid soll die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Kleingruppen und Individuen aufzeigen. Anhand der Ergebnisse kann die Selektivität der Methode bewertet und eine Entscheidung pro oder contra die AFLP-Methode und deren zukünftige, umfassende Verwendung bei der Aufklärung phylogenetischer Zusammenhänge von *Valeriana officinalis* agg. getroffen werden.

II Material und Methoden

II.1 Pflanzenmaterial

Das für die Etablierung der AFLP-Methode herangezogene Material stammte aus einer Pflanzensammlung der Artengruppe *Valeriana officinalis* agg. Die Feldarbeit wurde im Jahr 2009 von Dipl. Biol. Valerie-Klatte Asselmeyer, Dr. Christoph Dobeš, ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel, Mag. Sabine Bressler und der Autorin durchgeführt. Der geographische Sammlungsbereich umfasste Regionen in Bayern, Tirol, Vorarlberg, Steiermark und Niederösterreich. Als Auswahlkriterien für den Sammelmodus wurden die homogene Verteilung der Populationen im Sammelgebiet sowie eine deutliche interpopuläre Abgrenzung in Bezug auf die Höhenstufe und die Verteilung im Gesamtareal definiert.

Es wurde festgelegt, von jeder Population eine Anzahl von zwanzig Individuen zu sammeln, um in der späteren Phase des Projektes aus deren Analyse statistisch relevante Daten erhalten zu können. Der Abstand zwischen den Individuen wurde auf mindestens zwei Meter festgesetzt. Dadurch sollte die Mitnahme von Klonen ausgeschlossen werden. Mit dem Ziel, vollkommene Herbarbelege zu erstellen, wurden von jeder Population zehn generative Individuen im Zustand der Anthese gesammelt. Weitere zehn Individuen pro Population wurden im vegetativen, widerstandsfähigeren Zustand mit Grundblattrosette ausgegraben. Alle Pflanzen wurden mit der gesamten, erdigen Wurzel ausgegraben, der Wurzelstock feucht gehalten und von den Gärtnern des Departments für Pharmakognosie in Wien eingetopft. Von den generativen Individuen wurden die oberirdischen Teile abgeschnitten und am Standort der Population herbarisiert. Nach Möglichkeit wurden den Pflanzen junge Blätter für die DNA-Extraktion der AFLP-Analyse entnommen und in Silikagel bei Umgebungs- bzw. Raumtemperatur schonend getrocknet.

Da junges Pflanzengewebe mehr Zellen pro Gewicht enthält und weniger Polysaccharide, Phenole oder andere Sekundärmetaboliten aufweist, ist es besser für DNA-Analysen geeignet als das Blattmaterial reifer Pflanzen. Einige Populationen befanden sich zum Zeitpunkt der Feldarbeit jedoch schon in einem fortgeschrittenen Stadium. Von diesen wurde vorab kein Blattmaterial entnommen. Das fehlende

Material wurde zu einem späteren Zeitpunkt durch junge Blätter der am Department für Pharmakognosie kultivierten Pflanzen ergänzt. Weiters wurden im Freiland vom Standort jeder gesammelten Pflanze die Koordinaten mit einem GPS-Gerät (Garmin etrex, US) bestimmt. Von den Gärtnern des Departments wurden die Pflanzen einzeln in ein Substrat aus 50% Grunderde, 35% Rindenhumus und 15% Sand getopft und in der Klimakammer bei 20 °C, 80% Luftfeuchtigkeit und 12-stündiger Tageslichtbestrahlung untergebracht. Der Aufenthalt in der Klimakammer sollte das Anwachsen der Wurzeln unterstützen. Nachdem sich die Pflanzen erholt hatten, wurden die Töpfe in den Garten des Departments für Pharmakognosie transferiert.

Bis September 2009 wurden 50 Populationen und 88 Einzelpflanzen gesammelt. Die Pflanzen werden seit Mai 2010 im Versuchsgarten des Departments Molecular Systems Biology der Universität Wien -im Augarten- 1020 Wien kultiviert.



Abbildung 7: Kultivierte Versuchspflanzen mit Bewässerungssystem *Valeriana officinalis* agg., Wien-Augarten 2010

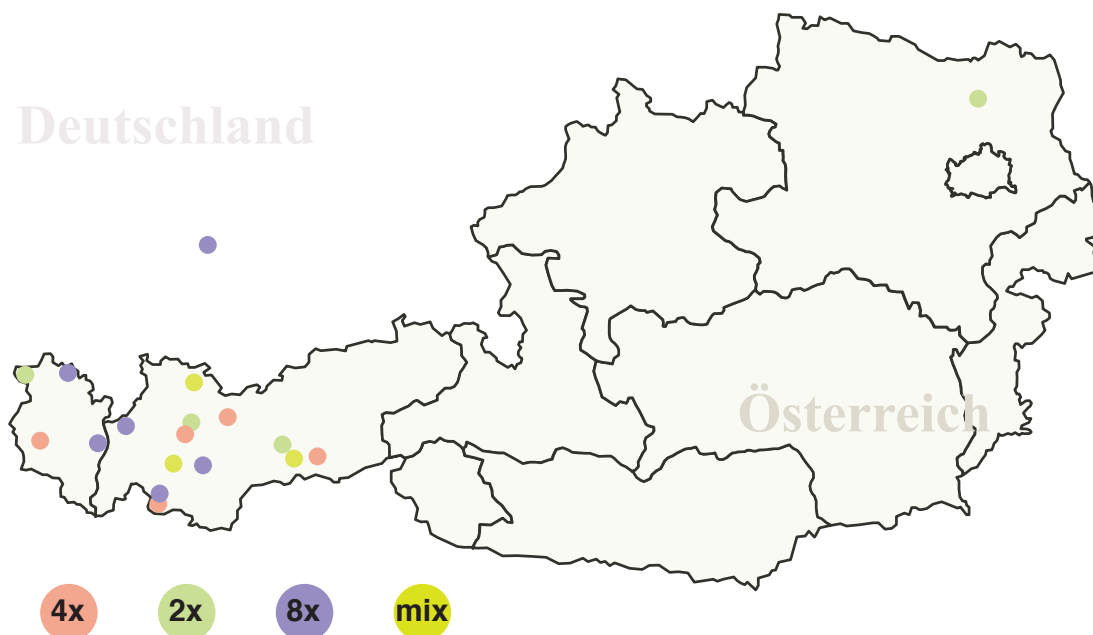


Abbildung 8: Geographische Position und durchflusszytometrisch (nach Klatter-Asselmeyer, V. & Bressler, S. 2009) bestimmte Ploidieniveaus von 18 mit der AFLP-Methode untersuchten Populationen des *Valeriana officinalis* Aggregats.

Für die Etablierung der AFLP-Analyse wurde Trockenmaterial von 90 Individuen aus 19 Populationen (Tab. Populationen und Individuen Anhang S. 99) verwendet. Die Auswahl der Populationen erstreckt sich über das zentraleuropäische Sammelareal und wurde anhand der Kriterien Ploidieniveau, Standort und geographische Abgrenzung getroffen.

II.1.1 Homogenisierung des Pflanzenmaterials

Für die DNA-Extraktion wurden pro Individuum 10 mg Trockenmaterial von *Valeriana officinalis* agg. verwendet. In 2 ml Reaktionsgefäßen (*safe-lock*, Eppendorf-DE) wurden je drei Glasperlen (N032.1, Roth, DE) mit 2,5 mm Durchmesser vorgelegt und das Blattmaterial mit einer Federpinzette hinzugefügt. Die Homogenisierung des Pflanzenmaterials wurde mit einer Schwingmühle für Trockenmahlgut (MM 200, Retsch, DE), die zum Aufschließen biologischer Zellen und zur DNA/RNA-Gewinnung geeignet war, durchgeführt. Bei einer Schwingfrequenz von 30 Hz (1800min^{-1}) dauerte

der Vorgang bis zum Erreichen der optimalen Pulverisierung 5 min. Das homogenisierte Material wurde umgehend weiterverarbeitet (Abb. 9).



Abbildung 9: Proben des mit Silikagel getrockneten Pflanzenmaterials, homogenisiert in 2 ml Reaktionsgefäßen

II.2 DNA-Extraktion

II.2.1 Methoden der DNA-Extraktion

Die zu wählende Isolierungsmethode ist von dem Probenausgangsmaterial und dem späteren Verwendungszweck der isolierten DNA abhängig. Für die PCR geeignete DNA muss vor allem einen hohen Reinheitsgrad aufweisen.

Für die Isolierung von genomischer Pflanzen-DNA stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Um die Lysis zu ermöglichen, müssen bei Pflanzenzellen - anders als bei tierischen Zellen - Mittellamelle und Zellwand enzymatisch (Manen, J. F. et al. 2005) verdaut oder mechanisch aufgebrochen werden. Frisches Pflanzenmaterial (100mg) wird mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser mit dem Stößel homogenisiert. Mit Silikagel getrocknetes Material wird in geringerer Menge (10 mg) mit einer Schwingmühle aufgeschlossen. Dabei wird das Blattmaterial in einem Reaktionsgefäß

durch Reibung und Aufprall mit Aufschlusskugeln pulverisiert. Geringe Mengen sind ausreichend, da die PCR Fragmente in exponentieller Anzahl amplifiziert. Vorhandene Hemmstoffe, wie z. B. Polysaccharide, Lipide, Polyphenole und Proteine, stören die Aufreinigung der DNA und beeinflussen die Sensitivität der PCR. Dies kann bis zur Inhibition enzymatischer Reaktionen führen. Verschiedene Pflanzenspezies zeigen aufgrund unterschiedlicher Sekundärstoffwechsel große Variationen hinsichtlich vorhandener Metaboliten. Schon in geringen Konzentrationen werden sie negativ wirksam. Darüber hinaus darf die DNA mechanisch nicht defragmentiert werden. Es ist sinnvoll, anfangs verschiedene Optionen für die Isolierung zu testen.

CTAB-Methode (Cetyltrimethylammoniumbromid-Methode)

Die CTAB-Methode (Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987) basiert auf der Lyse der Pflanzenzelle durch CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), einem kationischen Detergens, das in einer Tris-HCl (Tris-Hydrochlorid)-Pufferlösung vorliegt. Die weiteren Bestandteile des Isolierungspuffers und deren Funktion sind in der Tabelle ersichtlich (Tab. 1).

| 2x CTAB Puffer | Bezeichnung | Funktion |
|-------------------|--|--|
| Tris-HCl | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid | Puffer, Aufrechterhaltung des pH-Werts |
| NaCl | Natriumchlorid | Stabilisierung der DNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | Chelation divalenter Kationen, Inhibition von metallabhängigen Enzymen wie Nukleasen, DNasen |
| CTAB | Cetyltrimethylammonium-bromid | Komplexbildung mit DNA, Denaturierung von Proteinen, Solubilisierung von Zellmembranen |
| β-Mercaptoethanol | | Antioxidans, Schutz der DNA vor Peroxidasen, Polyphenoloxidasen |
| PVP 40% | Polyvinylpyrrolidon | Absorbtion von Polyphenolen, neutralisiert Quinone, Tannine |

Tabelle 1: CTAB-Methode: Reagenzien und deren Funktion

Bei dieser Methode der DNA-Extraktion durch CTAB-Puffer werden unlösliche Partikel durch Zentrifugation entfernt und lösliche Proteine und andere Zellbestandteile durch Mischung mit Chloroform-Isoamyl-Alkohol (24:1) getrennt. Die in der wässrigen Phase befindliche DNA wird mit Isopropanol gefällt und sorgfältig mit Ethanol, um kontaminierende Salze zu entfernen, gewaschen. Die aufgereinigte DNA liegt als weißes Pellet vor. Dieses wird getrocknet und in ddH₂O oder TE (Tris-EDTA)-Puffer resuspendiert.

DNA-Extraktions-Kits

Bei der DNA-Extraktion durch Aufreinigungs-Kits werden selektive Bindungseigenschaften von Silikagel-Membranen mit Zentrifugationssäulen-Methoden kombiniert. Speziell optimierte Puffersysteme dienen der Entfernung von Sekundärmetaboliten, Polysacchariden und Phenolen. Die vorab homogenisierten Pflanzenproben werden denaturiert und lysiert. Das Lysat wird gefiltert und die gefällte, vorgereinigte DNA auf eine Säule geladen. Die Säule enthält eine Silikagel-Membran, an die DNA-Moleküle binden. Zellulärer Debris, Proteine und Kontaminationen werden durch Waschen der Membran mit unterschiedlichen Puffern entfernt. Nach vollkommener Trocknung wird die gereinigte DNA abschließend mit TE Puffer oder ddH₂O eluiert.

Die im Eluat befindliche DNA ist in der Regel reiner - jedoch in der Menge geringer - als ein mit der CTAB-Methode aufgereinigtes Produkt. DNA-Extraktions-Kits sind in der Anwendung einfacher und schneller als die CTAB-Methode und beinhalten keine schädlichen Chemikalien.

Aufgereinigte DNA enthält auch RNA, die sich bei der Amplifikation durch die PCR störend auswirken kann. Sie wird bei allen genannten Methoden durch den Verdau mit RNase entfernt.

DNA-Extraktion Durchführung

Um die beste Methode für das Projekt hinsichtlich qualitativer, quantitativer und ökonomischer Effizienz auszuwählen, wurden die Technik CTAB (abgewandelt nach Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987) und drei Extraktionskits - peqGOLD Plant DNA Mini

Kit (peqlab, DE), DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, US), NucleoSpin® Plant II (MachereyNagel, DE) - verglichen. Der Versuchsablauf folgte bei der Anwendung der Kits weitgehend den Herstellerangaben. Die Protokolle zur Durchführung der CTAB-Methode und die Anleitung der DNA-Extraktions-Kits befinden sich im Anhang (S. 111-115).

Aufbewahrung der isolierten DNA

Die aufgereinigten DNA-Endprodukte aller Isolierungsmethoden wurden bei -20 °C aufbewahrt. Während der projektbezogenen Laborarbeiten wurden die Proben interimistisch bei 4 °C gelagert.

II.2.2 Konzentration und Reinheit der DNA

Konzentration und Reinheit können mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, 2008 US, Abb. 10) überprüft werden. Das Gerät misst flüssige Proben mit einem Volumen von 1 µl bis 2 µl genau und reproduzierbar. Das Spectrophotometer arbeitet mit Licht der Wellenlänge des UV/VIS Spektrum (220 nm-750 nm) und bedient sich einer patentierten Retentionstechnologie, die ausschließlich die Oberflächenspannung verwendet, um die Probe zu fixieren. Auf Küvetten wird somit verzichtet. Mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer können hochkonzentrierte DNA-Proben (bis zu 3700 ng/µl) ohne Verdünnung gemessen werden.

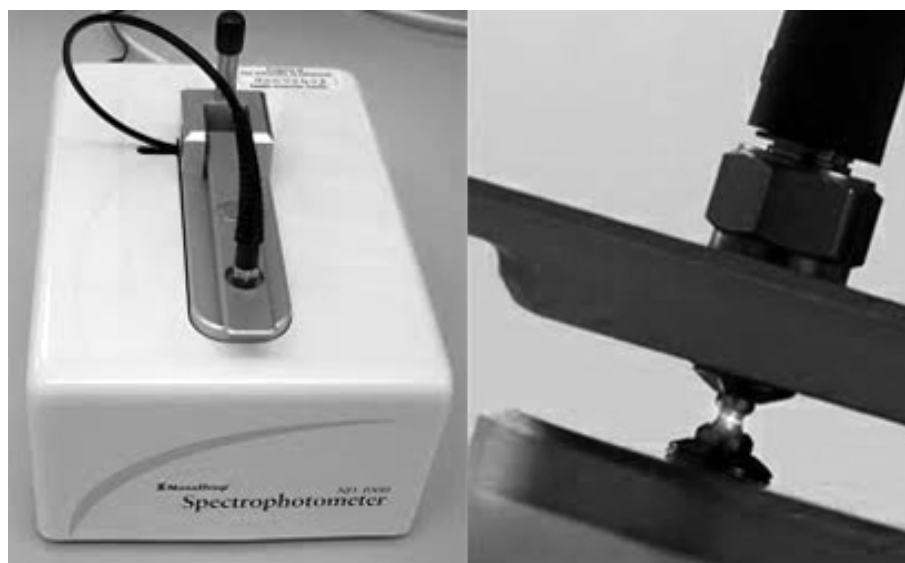


Abbildung 10: Spectrophotometer NanoDrop-ND 1000
Quelle: abgeändert Thermo Scientific, 2008 US. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer user manual v3-2.7. 3: S. 1.

Vor der ersten Probenmessung wird eine leere Messung (Funktion *blank*) durchgeführt, um die neutrale Ausgangsbasis zu erzeugen und diese in ein Verhältnis zu den folgenden Messungen zu setzen. Dazu werden anstatt der Probe 1 μl bis 2 μl des Elutions- bzw. Suspensionspuffers (TE Puffer) verwendet.

Für die eigentliche Messung wurden mit einer Präzisionspipette 1 μl bis 2 μl der DNA-Probe auf das Ende eines in einem Sockel eingebauten Glasfaserkabels pipettiert. Dann wurde der obere Messarm, in dem sich das zweite Glasfaserkabel befand, geschlossen. Die Probe stellt die Verbindung zwischen beiden Glasfasern her. Eine pulsierende Xenon-Blitz-Lampe dient als Lichtquelle. Ein Spectrometer, das eine geradlinige CCD-Reihe verwendet, wird für die Analyse des Lichtes nach erfolgter Messung verwendet. Zwischen den einzelnen Messungen wird die Optik beider Kontaktflächen des Spectrophotometers gereinigt. Die Auswertung erfolgt mit der NanoDrop ND-1000 Basis-Software auf dem angeschlossenen PC. Die Daten werden in einer Archiv-Datei gespeichert und dann in das im Format .txt exportiert. Für die Reinheit der DNA sind die Quotienten der gemessenen Licht-Absorption bei Wellenlängen von 260/280 nm und 260/230 nm ausschlaggebend. Sie stellen die Basis für die Berechnungen dar. Die Konzentrationsmessung in $\text{ng}/\mu\text{l}$ geht von der Absorption bei 260 nm aus. Für die

Berechnung dieses Wertes wird als Konstante der Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA von 50 ng-cm/ml herangezogen. Diese Konstante kombiniert (modifiziert nach Beers-Bouguer/Lambert) zwei mögliche Faktoren, die zu einer Schwächung der Strahlungsintensität von monochromatischem Licht führen. Diese Faktoren sind die Weglänge des Lichtstrahls beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz (Bouguer/Lambertsches Gesetz) und die Konzentration der absorbierenden Substanz, auf die der Lichtstrahl trifft (Thermo Scientific, 2008 US), (Tab. 2).

| $c = (A \cdot e)/b$ | |
|---------------------|--|
| c | = DNA-Konzentration in ng/μl |
| A | = Absorption in AU (Absorptions-Einheiten) |
| e* | = die von der Wellenlänge abhängige DNA-Extinktion in ng-cm/μl |
| b | = die Pfad-Länge in cm |
| *e: | Doppelstrang-DNA: 50 ng-cm/ul, Einzelstrang-DNA: 33 ng-cm/ul |

Tabelle 2: Formel der DNA-Konzentrationsberechnung nach Thermo Scientific, 2008 US NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer user manual v3-2.7. 19: S. 2

Die Weglänge des Lichtstrahls ist bei dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer mit 1 mm bis 2 mm sehr kurz. Dadurch wird der Ablenkungsfaktor (Pfad-Länge) b gering gewichtet und es können hohe DNA-Konzentrationen direkt gemessen werden.

Konzentration und Reinheit von je 1,5 μl der DNA-Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10 aus allen 4 genannten Extrakationsverfahren wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer des Departments für Mikrobielle Ökologie der Universität Wien gemessen (Abb. 10).

II.3 AFLP (Amplified Length Polymorphism) Grundlagen

Die AFLP-Methode nach Vos (Vos, P. et al. 1995) umfasst die Schritte

- Restriktion/Ligation
- Präamplifikation, Selektive Amplifikation
- Kapillar-Elektrophorese

II.3.1 Erzeugung der Template-DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs. In der prokaryotischen Zelle dienen sie der Abwehr von dem Bakterienstamm fremden Viren. Sie schneiden Doppelstrang-DNA an bestimmten, palindromischen Erkennungssequenzen in Fragmente mit geraden (*blunt end*) oder überhängenden Enden (*sticky end*). Die Länge der Erkennungssequenzen beträgt enzyspezifisch zwischen 2 bp bis 6 bp. Enzyme mit kurzen Palindromen schneiden öfter (*frequent cutter*), während Enzyme mit langen Erkennungssequenzen weniger Fragmente produzieren (*rare cutter*). EcoRI, MseI, HindIII sind für die molekulargenetische Analyse häufig verwendete Enzyme.

II.3.1.1 Restriktion/Ligation

Die DNA des gesamten Genoms wird mit zwei Restriktionsenzymen (EcoRI und MseI) verdaut. MseI (*frequent cutter*) schneidet häufig und generiert Fragmente einer Länge von etwa 100 bp bis 1700 bp, die auf einem Gel gut auftrennbar sind. (Morgan, R. 1988) Der *tetracutter* erkennt die 4 bp lange palindromische Sequenz 5' T/TAA 3' und schneidet zwischen den beiden Thyminbasen. Dabei entsteht am 5' Ende ein Überhang von zwei Basen. EcoRI hingegen ist ein *hexacutter* und verfügt über die Erkennungssequenz 5' G/AATTC 3'. Hier entsteht bei der Restriktion ein Überhang von vier Basen. Da EcoRI (*rare cutter*) seltener schneidet, limitiert es die Anzahl der zu amplifizierenden Fragmente. Es entstehen drei Arten von Fragmenten: Fragmente mit EcoRI/EcoRI-, Fragmente mit MseI/MseI- und die in den folgenden PCR-Schritten amplifizierten Fragmente mit MseI/EcoRI Schnittstellen (Vos, P. et al. 1995).

Bei der Ligation, die durch das Enzym T4 DNA-Ligase (aus Bacteriophage T4, produziert in *Escherichia coli*) katalysiert wird, hybridisieren doppelsträngige Adapter mit den ungleichen Enden der Restriktionsfragmente. Zwischen den Phosphatgruppen am 5' Ende und den Hydroxyl-Gruppen am 3' Ende entstehen kovalente Bindungen durch Phosphodiesterbindung.

Adapter sind kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 14 bp bis 18 bp. Sie verfügen über eine Kernsequenz und eine enzyspezifische Sequenz. Die enzyspezifische Sequenz der ligierten Adapter ist in der Abfolge der Basen komplementär zu den Restriktionsschnittstellen, enthält jedoch am 3' Ende ein

modifiziertes Nukleotid, sodass bei der Hybridisierung keine neuerliche Bildung der Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme erfolgt. Aufgrund dieser Modifikation können die Reaktionen Restriktion und Ligation in einer Lösung parallel stattfinden. (Abb. 6)

II.3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Durchführung der AFLP-Methode können die drei Schritte DNA-Extraktion, Restriktion/Ligation und die Präamplifikation durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Mit dieser Methode werden Moleküle (DNA, RNA, Proteine) durch ein elektrisches Feld im Inneren eines Agarosegels aufgetrennt (Abb. 11). Das Gel verfügt über netzartige Poren, durch die die Moleküle bei eingeschalteter Spannung mittels eines Ionen-Puffers wandern. DNA-Moleküle besitzen aufgrund des Phosphatrückens eine negative Oberflächenladung. Sie werden mit Ladepuffer vermischt, in die Taschen des Gels geladen und wandern in Richtung des positiven Pols. Entscheidend für die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle in dem Gel ist neben Form und Ladung vor allem deren Größe. Kleinere Moleküle gelangen schneller durch die Gelporen als große, kommen also im unteren Bereich der Gelkammer, nahe der Anode, schneller an. Die Konzentration der Agarose beeinflusst das Trennvermögen. Eine hohe Agarose-Konzentration trennt kurze Fragmente (100 bp bis 500 bp) besser auf, während bei geringer Agarose-Konzentration die Auftrennung langer Fragmente (≤ 1000 bp) bevorzugt verläuft.

Um die Molekülgrößen zu bestimmen, wird eine DNA-Leiter als Längenstandard in eine der Geltaschen zum Mitlaufen geladen. DNA-Leiter werden aus Plasmiden mit bekannter Molekülgröße hergestellt. Je nach Anwendung liegen die Fragmentlängen von DNA-Leitern zwischen 20 kb und 15 kb. Das Gel ist mit einem Laufpuffer bedeckt [i.e. 0,5x TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer bei nicht toxischen Farbstoffen, 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer bei Ethidiumbromid]. Der Puffer enthält die für die Stromleitung und die damit verbundene Wanderung der Moleküle verantwortlichen Ionen.

Die Vermischung der DNA-Proben mit einem farbigen Ladepuffer [i.e. Bromophenolblau (200 bp bis 400 bp), Xylencyanol (4 kb) oder Orange G (50 bp)]

dient der Beschwerung der Fragmente in den Taschen, der Kontrolle des Ladevorgangs und der Beobachtung des Gelverlaufes. Die Puffer wandern je nach chemischer Zusammensetzung parallel zu den DNA-Fragmenten, mit der entsprechenden Länge. Anhand der Laufrichtung des Puffers kann so das Migrationsverhalten der geladenen Fragmente verfolgt werden. Der Ladepuffer besteht aus dem Farbstoff und einer Substanz mit höherer spezifische Dichte (Glycerol, Sucrose), die das Absinken der DNA in die Taschen begünstigt. Dabei wird die Art des Farbstoffes vor allem bei geringer DNA-Konzentration so gewählt, dass sich dessen Laufverhalten nicht mit dem zu erwartenden Beobachtungsspektrum der Fragmentlängen überlagert.

AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

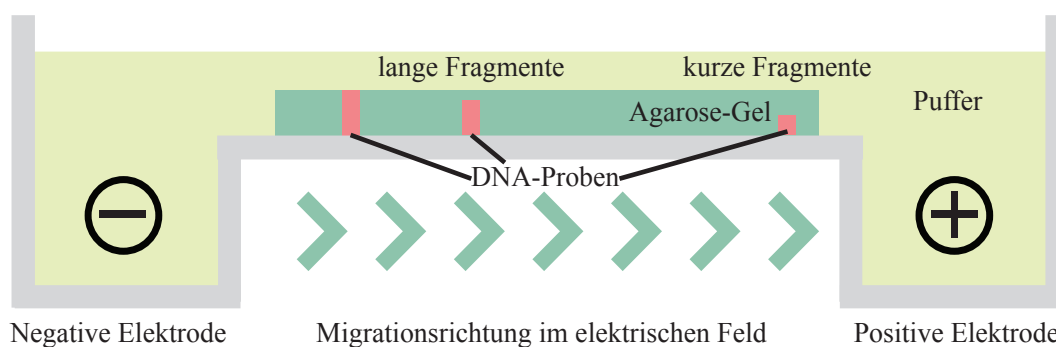


Abbildung 11: Schema der Agarose-Gelelektrophorese: kurze Fragmente erreichen die positive Elektrode zuerst.

II.3.2 DNA-Amplifikation mit PCR

Die PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde zwischen 1985 und 1990 Jahren im US-Unternehmen Cetus entwickelt (Kary Mullis 1986), (Mullis & Falloona 1987). Bei dieser Methode werden unter Verwendung thermostabiler Enzyme, i.e. der *Taq*-Polymerase, DNA-Abschnitte gezielt und automatisiert in exponentieller Anzahl amplifiziert (Abb. 12). Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge der erzeugten DNA-Abschnitte. Die Standard-PCR amplifiziert Fragmente einer Länge von bis zu 3

kbp. Es genügen bereits geringe Mengen an reiner DNA, um visualisierbare Produkte zu erhalten. Der zyklische Prozess gliedert sich im Wesentlichen in die drei Abschnitte Denaturierung, Primer-Hybridisierung=*annealing* und Elongation/Extension.

Das ursprüngliche, kommerziell ausgerichtete Forschungsziel, eine große Anzahl an Oligonukleotiden zu erzeugen, wurde in der Folge weit überschritten. Aufgrund ihrer sensitiven und spezifischen Fähigkeit der DNA-Vervielfältigung zählt die PCR heute zu den global angewandten, biotechnologischen Standardmethoden.

PCR - POLYMERASE CHAIN REACTION

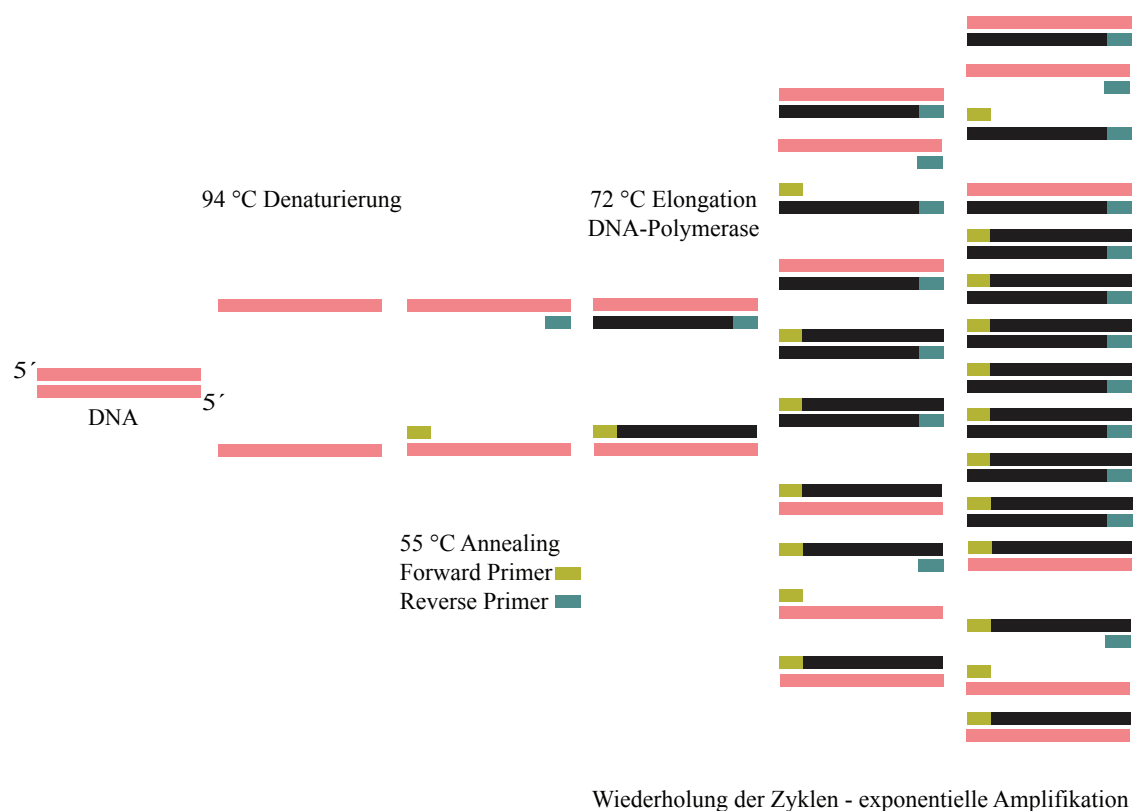


Abbildung 12: Schema der PCR-Methode

Bei der Denaturierung werden durch Inkubation bei 95 °C die Doppelstränge der DNA getrennt. Daraufhin lagern sich die zu den Zielsequenzen komplementären Primer an die DNA-Matrizen (*primer annealing*) an. Der Vorgang wird bei Temperaturen, die zwischen 55 °C bis 65 °C liegen, durchgeführt. Die für die Primer-Hybridisierung optimale Temperatur, T_a (*annealing temperature*) orientiert sich an dem tiefsten errechneten Schmelzpunkt (T_m) (Tab. 3) der verwendeten Primersequenzen sowie an

deren Konzentration. Am T_m ist eine Hälfte der DNA-Moleküle in einer Lösung einzelsträngig, während die zweite Hälfte der Fragmente noch in Doppelsträngen vorliegt.

| Basisformel zur Berechnung des Primerschmelzpunktes |
|---|
| $T_m = 4 \cdot (\text{Zahl der G} + \text{Zahl der C Nucleotide}) + 2 \cdot (\text{Zahl der A} + \text{Zahl der T Nucleotide})$ |

Tabelle 3: Berechnung des T_m

Die Temperatur für das *annealing* wird etwa 5 °C bis 10 °C unter dem niedrigsten errechneten Primerschmelzpunkt gewählt, kann aber auch empirisch durch Testen mit Gradienten-PCR bestimmt werden. Bei dieser Art der PCR wird in einem Durchgang eine Reihe verschiedener T_a 's, die sich um 0.5 °C bis 1 °C unterscheiden, ausprobiert. (Nolan, T. et al. 2009).

Nach der Primer-Hybridisierung erfolgt die Elongation, die Synthese der komplementären Polynukleotide. Die Taq-Polymerase katalysiert den Einbau der im Reaktionsmix im Überschuss vorhandenen dNTPs und komplettiert die von den Primern begonnenen DNA-Stränge. Die Temperatur für die Elongation beträgt 72 °C. Sie liegt nahe an den für die Maximalleistung der Taq-Polymerase bekannten 74 °C. Der gesamte Vorgang wiederholt sich in einer Art 'Kettenreaktion'. Bei der nächsten Denaturierung werden die Komplementärstränge wieder getrennt und bilden die Matrizen für den folgenden Zyklus. Die Fragmente werden nun exponentiell vervielfältigt. Eine Standard-PCR verläuft über 25 bis 35 Zyklen; die Anzahl der Zyklen kann unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Produktivität der PCR von Menge und Konzentration an dNTPs, $MgCl_2$, Primern sowie dem pH-Wert der Pufferlösung abhängig ist, jedem Versuch angepasst werden. Unbegrenzt aktiviert erreicht die PCR eine Plateauphase, in der die exponentielle Amplifikation abklingt (Morrison, C. & Gannon, F. 1994). Bei hoher Konzentration an Amplifikationsprodukten hybridisieren diese vermehrt miteinander - anstatt mit den Primern - und setzen der exponentiellen Vermehrung eine Grenze (Mühlhart, C. 2009).

Für die PCR werden folgende Komponenten benötigt:

| | |
|--|---|
| Original-DNA | Sie enthält den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA (<i>template</i>) |
| <i>forward primer</i> <i>reverse primer</i> | Sie sind speziell entwickelte, kurze Oligonukleotide mit einer Länge von ± 20 bp. Die Primer bestimmen den Startpunkt der DNA-Synthese und begrenzen den Bereich der Amplifikation. Bei der AFLP-Methode sind die PCR-Primer komplementär zu den an die Restriktionsschnittstellen ligierten Adaptersequenzen gestaltet. Dadurch ist es möglich, bestimmte Fragmente zu amplifizieren, obwohl deren genaue Sequenzen bis auf die Primerabschnitte unbekannt sind. |
| DNA-Polymerase | Die thermostabile Taq-Polymerase wird aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> gewonnen (Brock, T. D., Freeze, H. 1969). Die Temperatur der maximalen katalytischen Aktivität in einem Puffer mit pH-Wert 7 bis 8 beträgt etwa 75 °C bis 80 °C (Chien, A. et al. 1976). Für die Amplifikation von 1 kb DNA-Strang benötigt die Taq-Polymerase etwa 30 Sekunden. Sie besitzt also hinsichtlich der Amplifikationsgeschwindigkeit hohe Kapazität. Von Nachteil ist jedoch, dass sie über keine 3' bis 5' Exonuklease-Korrektur-Lesekapazität verfügt. Die geringste Irrtumsrate in einem Puffer mit pH-Wert 8,8 beträgt 8 Nukleotide von 10^{-6} Nukleotiden. Im Vergleich dazu erzielt die ebenfalls thermostabile, mit einer 3' bis 5' Exonuklease ausgestattete, Pfu-Polymerase (aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium <i>Pyrococcus furiosus</i>) in einem Puffer mit vergleichbarem pH-Wert eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 zu 10^{-6} Basenpaaren (Cline, J. 1996). Sie besitzt derzeit die geringste Fehlerrate der für die PCR verwendeten DNA-Polymerasen. Die Pfu-Polymerase benötigt jedoch für die Amplifikation von 1kb DNA-Strang 2 Minuten (Mühlhart, C. 2009). Die geeignete DNA-Polymerase wird demnach projektspezifisch ausgewählt. |
| Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs) | dNTPs sind die Bausteine für den zu synthetisierenden Komplementärstrang. Die Konzentration der dATPs, dTTPs, dGTPs und dCTPs ist equimolar zu wählen. Bei einem dNTP-mix ist darauf zu achten, dass die angegebene Konzentration durch vier zu teilen ist, um die Konzentration pro Nukleotid zu erhalten. |

| | |
|-------------------|--|
| MgCl ₂ | Dieses wasserlösliche Salz ist ein Co-Faktor für die Polymerase. Die Aktivität seiner Ionen im Reaktionsmix wird durch die Konzentration an dNTPs beeinflusst. Allgemein gilt, dass die Konzentration an MgCl ₂ die Konzentration der dNTP's weit überschreiten muss, um eine genügende Anzahl an freien Mg ²⁺ Ionen zu liefern (Nolan, T. et al. 2009). |
| BSA | Bovine Serum Albumin denaturiert degradierende Enzyme und absorbiert phenolische Komponenten. |

Die Polymerase-Kettenreaktion wird in einem Thermocycler durchgeführt. Der Thermocycler erlaubt präzise Temperatur- und Zeiteinstellungen für das sprunghafte Erhitzen und Abkühlen während des Reaktionsablaufs. Das Gerät verfügt über einen beheizbaren Deckel, wodurch die Bildung von Kondensat verhindert werden soll. Die Reaktion muss, um Verdunstung zu vermeiden, in dicht abgeschlossenen Behältnissen stattfinden. Die bei der selektiven Amplifikation bei der AFLP-Methode durchgeführte *touchdown* (TD)-PCR bietet eine einfache und schnelle Optimierungsmöglichkeit in Bezug auf Genauigkeit, Empfindlichkeit und Ertrag. Bei diesem PCR-Verfahren wird die Spezifität der Primerbindung durch schrittweise Annäherung der T_a an die berechnete T_m des Primers erhöht (Korbie, D. J. et al. 2008). Die Temperaturschritte betragen 0,5 °C bis 1 °C pro Zyklus oder pro zwei Zyklen. Liegt die T_a über der T_m der Primer, hybridisieren die Primer mit größerer Wahrscheinlichkeit mit der DNA. Primer-Dimere und Artefakte werden dadurch vermieden. Bei der TD-PCR liegt die Anlagerungstemperatur zu Beginn etwa 10 °C über dem für den Primer berechneten T_m. Im Verlauf der folgenden Zyklen erfolgt ein progressiver Übergang zu der eigentlichen, in quantitativer Hinsicht effizienteren T_a. Jeder Unterschied pro T_m zwischen einer richtigen und falschen Primer-Hybridisierung ergibt in der Berechnung bei 10 Zyklen, die mit einer Progression von 1 °C (65 °C bis 56 °C) durchgeführt werden, einen exponentiellen Vorteil von 2¹⁰ (Don, R. H. et al. 1991).

II.3.2.1 Präamplifikation

Bei der Präamplifikation wird nur ein Teil aus der Gesamtmenge aller vorhandenen Restriktionsfragmente durch die PCR vervielfältigt. Die 16 bp bis 22 bp langen Primersequenzen bestehen aus drei Segmenten. Am 5' Ende sind sie komplementär zu

den bekannten Adaptermolekülen gestaltet. Darauf folgt die spezifische Sequenz der Restriktionsschnittstelle in Richtung 3' Ende. Am 3' Ende wird ein selektives Nukleotid eingebaut (Tab. 6). Diese Base reduziert die Anzahl der Amplikons auf 1/16 der möglichen Fragmente, da die Primer nur mit Matrizen, die an dieser Position über das zu der selektiven Base komplementäre Nukleotid verfügen, hybridisieren.

II.3.2.2 Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation erfolgt ebenfalls mit Primern deren Sequenzen zu den Adaptoren und den Restriktionsschnittstellen komplementär sind. Am 3' Ende beider Primerstränge werden drei selektive Nukleotide eingebaut. Ihre Funktion ist es, die Anzahl an Polymorphismen einzuengen. Für die Detektion während der anschließenden Elektrophorese sind die EcoRI-Primer am 5' Ende fluoreszenzmarkiert (Abb. 6).

II.3.3 Kapillarelektrophorese

Diese Methode automatisierter, elektrophoretischer Separation wird mit in einem Sequenziergerät (3130xl, Applied Biosystems, US) durchgeführt.

Das aufgereinigte PCR Produkt wird denaturiert, in feine Kapillaren injiziert und in einem Acrylamidgel oder einem Polymer (i.e. Performance Optimized Polymer POP), das sich den Kapillaren befindet, aufgetrennt. Die Kapillaren werden nach der Injektion der Probenlösung an beiden Enden in zwei Puffergefäße (positiver Inlet- und negativer Outletpuffer) getaucht. Die negativ geladenen DNA-Fragmente sammeln sich am Inlet an einer Platinkathode und wandern bei angelegter Spannung im elektroosmotischen Feld durch die Kapillaren in Richtung Outlet (Schmitz, O. J. 2011).

Die Migrationsgeschwindigkeit ist, wie bei der Agarose-Gelelektrophorese, von der Länge der Fragmente abhängig. Die Fluorophore werden während der Wanderung an einer bestimmten Stelle vor dem Outlet durch einen Laserstrahl angeregt und das Emissionslicht wird detektiert. Die Fluoreszenzemissionen werden im Computer durch ein Elektropherogramm visualisiert. Jeder sichtbare Peak entspricht einer Bande, seine Position gibt die genaue Länge an Basenpaaren an. Die Höhe des Peaks stellt die Intensität der Fluoreszenzemission dar. Mit der Kapillarelektrophorese ist eine genaue

quantitative und qualitative Auswertung möglich, da Unterschiede von einer einzigen Base detektiert werden.

II.4 AFLP (Amplified Length Polymorphism) Durchführung

Die AFLP-Methode wurde dem Protokoll von Vos (Vos, P. et al. 1995) folgend modifiziert und wie im Folgetext beschrieben durchgeführt.

II.4.1 Erzeugung der Template-DNA durch Restriktion/Ligation

Vor der eigentlichen Restriktion/Ligation wurden die einzelsträngigen Adapter (Tab. 4) zum Doppelstrang verbunden (*annealing*).

| Adaptersequenzen | |
|------------------|-------------------------|
| EcoRI ADF | 5'CTCGTAGACTGCGTACC 3' |
| EcoRI ADR | 5'AATTGGTACGCAGTCTAC 3' |
| MseI ADF | 5'GACGATGAGTCCTGAG 3' |
| MseI ADR | 5'TACTCAGGACTCAT 3' |

Tabelle 4: Adaptersequenzen

Beide Adapter wurden dazu mit TE Puffer auf 100 mikromolare Konzentration gebracht. Für die Hybridisierung wurden equimolare Mengen der Adapterstränge, um keine Einzelstrangreste zu erhalten, verwendet. Der Reaktionsmix bestand aus 10 Teilen ADF+10 Teilen ADR+180 Teilen ddH₂O. Das Produkt wurde 10 sec. bei 7000 rcf/RT in der Tischzentrifuge (Sorvall Heraeus Biofuge fresco, Heraeus Sepatech, DE) geschleudert.

Adapter Hybridisierung

- + 20 µl ADF
- + 20 µl ADR
- + 360 µl ddH₂O

Alle Reagenzien wurden auf Eis vorbereitet. Die Adapterpaare wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei 95 °C für 5 min. auf dem Thermoblock (Grant Forest Products, US) inkubiert. In Stufen von 37 °C und 20 °C wurde das Produkt langsam herabgekühlt, um die Bildung von Haarnadelstrukturen zu vermeiden. Anschließend

wurden von jeder Probe etwa 300 ng isolierte DNA in einem Reaktionsgefäß mit den Restriktionsendonukleasen MseI (aus *Mikrococcus ssp.*, New England Biolabs, US) und EcoRI (aus *Escherichia coli*, Promega, US) verdaut. Aufgrund der sehr kleinen Mengen an Reagenzien pro Versuchseinheit und um die Präzision der Laborarbeit zu gewährleisten, wurde ein Mastermix mit einem der Probenanzahl entsprechenden 10% bis 20%-igen Aufschlag erstellt (Tab. 5).

| Restriktion/Ligation | Stock | Endkonzentration | Reaktionsmix für einfachen Ansatz |
|-------------------------|------------|------------------|-----------------------------------|
| EcoRI Enzyme | 80 U/µl | 0,416 U/µl | 0,0625 µl |
| MseI Enzyme | 10 U/µl | 0,083 U/µl | 0,1 µl |
| T4 DNA Ligase | 3 U/µl | 0,05 U/ µl | 0,2 µl |
| BSA 1mg/ml | 1 mg/ml | 0,046 mg/ml | 0,55 µl |
| MseI Adapter | 50 pmol/µl | 4,16 pmol/µl | 1,0 µl |
| EcoRI Adapter | 5 pmol/µl | 0,416 pmol/µl | 1,0 µl |
| T4 DNA Ligase Puffer | X 10 | X 0.9 | 1,1 µl |
| 0,5M NaCl | 0,5 M | 0,045 M | 1,1 µl |
| ddH ₂ O | | | 1,53 µl |
| DNA | 50 ng/µl | 25ng/µl | 6 µl |
| Reaktionsvolumen | | | 12 µl |

Tabelle 5: Reaktionsmix Restriktion/Ligation

In einem Reaktionsvolumen von 12 µl wurden in 1,45 µl ddH₂O, 1,1 µl T4 10x DNA Ligase Puffer (Promega, US), 1,1 µl 0,5M NaCl, 0,55 µl BSA 1mg/ml, 1 µl Adapter MseI (Sigma-Aldrich, US), 1 µl Adapter EcoRI (Sigma-Aldrich, US), 0,1 µl MseI Enzym 10 U/µl, 0,0625 µl EcoRI Enzym 80 U/µl, 0,2 µl T4 DNA Ligase 3 U/µl (Promega, US) mit 6 µl DNA vermischt. Die Reaktion erfolgte über Nacht auf dem Thermocycler (Bio-Rad C 1000, Bio-Rad Laboratories, US) - mit der Programmeinstellung 'Inkubation' bei ausgeschalteter Deckelheizung. Die Inkubationsschritte waren 3 h bei 37 °C, 12 h bei 17 °C und Endkühlung bei 4 °C.

Inkubation Restriktion/Ligation

3 h bei 37 °C

12 h bei 17 °C

Endkühlung bei 4°C

Das Produkt wurde 10 sec. bei 7000 rcf/RT in der Tischzentrifuge geschleudert.

II.4.2 Agarose-Gelelektrophorese 1

Das Ergebnis der Restriktion/Ligation wurde mit der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In einer Gelkammer wurde ein 0,6%-iges Agarosegel erzeugt. Der Gelschlitten in der Gelkammer wurde mit einem Kamm, dessen Anzahl an Zähnen in etwa der Probenmenge entsprach, versehen. Für eine Gelkammer von 12 cm Länge wurde in einem 250 ml Erlenmeyerkolben 0,45 g peqGOLD Universal Agarose (peqlab, US) mit 75 ml 0,5 TBE Puffer in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Dieser Vorgang wurde in mehreren Schritten durchgeführt und der Kolben dabei mehrmals geschwenkt. Dadurch wurde ein Überkochen der Lösung vermieden. Nach kurzer Abkühlung des Kolbens unter Fließwasser wurden 7,5 µl des Farbstoffes GelRed (Biotium, US) hinzugefügt. Die Reagenzien wurde durch Schwenken des Kolbens gemischt und die Flüssigkeit unter Vermeidung von Luftblasen in die Kammer gegossen. Etwaige Luftblasen wurden mit einer sauberen Pipettenspitze an den Rand gezogen. Nach 30 minütiger Abkühlung des Gels wurde der Kamm entfernt, die Kammer das Gel großzügig bedeckend mit 0,5x TBE Laufpuffer gefüllt und jede Tasche mit einer auf Parafilm vorbereiteten Mischung aus 3 µl Bromophenolblau-Ladepuffer und 3 µl DNA-Probe beladen. Die Lauffront des Bromophenolblau-Ladepuffers entspricht Fragmenten einer Länge von 200 bis 400 bp. Als Größenstandard zur Bestimmung des Fragmentspektrums wurde 1 µl der DNA-Leiter peqGold 100 bp, die aus vierzehn Plasmidbanden einer Länge zwischen 100 und 3000 bp bestand, mit 3 µl Ladepuffer auf Parafilm gemischt und ebenfalls aufgetragen.

Nach der Laufzeit von 60 min., bei einer Spannung von 80 Volt, wurde das Gel entnommen, im UV-Transilluminator (BioView UST-20M-8R, 312 nm, Biostep, DE) unter Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert, mit der Software Argus X4 (Biostep, DE) eingerichtet und fotografiert (Abb. 13).

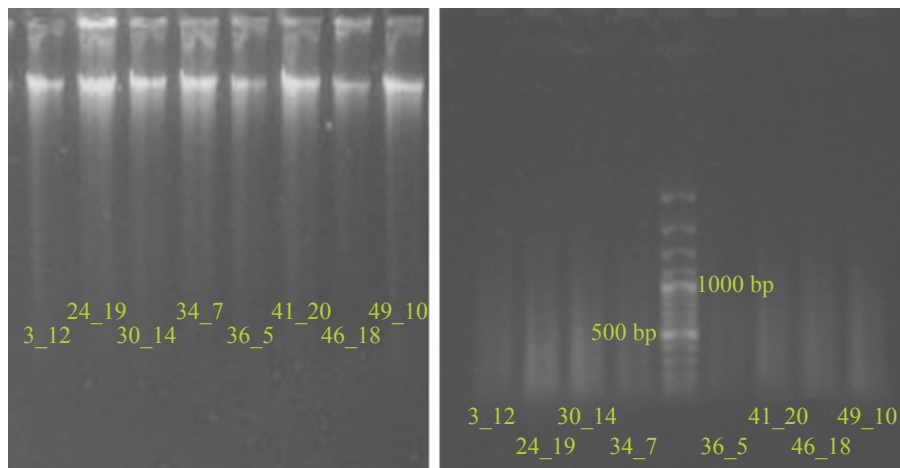


Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese
 Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10

links Ausgangs-DNA der 8 Proben: **rechts**: Restriktion/Ligation

Genomische DNA (links) wird mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und MseI verdaut. Es entstehen zahlreiche kurze Fragmente (rechts).

II.4.3 Auswahl der AFLP-Primer

Das Vorab-Screening wurde mit einer präselektiven und zwölf selektiven AFLP-Primerkombinationen, nach Schönswetter (Schönswetter, P. 2006) durchgeführt (Tab. 6). Davon wurde die präselektive Kombination A-C und die selektiven Kombinationen ACA-CAC, ACT-CTC, ACG-CAA für die Prüfung auf Wiederholbarkeit und für die AFLP-Analyse von 89 Individuen aus 18 Populationen ausgewählt. Kriterien für die Primerauswahl waren visuelle Klarheit, unmittelbare Interpretationsmöglichkeit und gleichmäßige individuelle Intensität der Signale. Für die Analyse geeignete Primer sollten genügend Polymorphismen aufweisen, um inter- und intrapopuläre Zusammenhänge zwischen Individuen dieser Populationen aufzeigen zu können. Zusätzlich wurden die für die Artengruppe bereits bekannten Selektivprimer GTC-CAG, GTC-CAG, GAC-CAG und daraus resultierend die präselektive Kombination G-C (Seidenberger, R. 2004) verwendet, sodass für die AFLP-Analyse sechs Primerkombinationen zum Einsatz kamen. Eine detaillierte Beschreibung aller AFLP-Primerkombinationen ist in Tabelle 6 ersichtlich.

Die EcoRI-Primer wurden mit den Farbstoffen FAMTM/blau, NEDTM/gelb, VICTM/grün (alle Applied Biosystems, US) fluoreszenzmarkiert.

| Verwendete Oligonukleotide | | | |
|---|----------------------------|------|---------|
| Adapter Ligation | | | |
| EcoRI: ADF | 5'CTCGTAGACTGCGTACC 3' | | |
| EcoRI: ADR | 5'AATTGGTACGCAGTCTAC 3' | | |
| MseI: ADF | 5'GACGATGAGTCCTGAG 3' | | |
| MseI: ADR | 5'TACTCAGGACTCAT 3' | | |
| Primer Sequenzen Basis | | | |
| EcoRI: | 5'GACTGCGTACCAATT(NN)3' | | |
| MseI: | 5'GATGAGTCCTGAGTAAN(NN) 3' | | |
| Primerkombinationen Präamplifikation | | | |
| Keygene | EcoRI | MseI | Keygene |
| E 01 | A | C | M 01 |
| E 03 | G | C | M 01 |
| 12 Primerkombinationen Selektive Amplifikation Screening | | | |
| Keygene | EcoRI | MseI | Keygene |
| E 35 | ACA/FAM | CAC | M 48 |
| E 38 | ACT/FAM | CTC | M 60 |
| E 35 | ACA/FAM | CAT | M 50 |
| E 44 | ATC/FAM | CTG | M 61 |
| E 36 | ACC/NED | CAG | M 49 |
| E 36 | ACC/NED | CAT | M 50 |
| E 32 | AAC/NED | CAT | M 50 |
| E 40 | AGC/NED | CTG | M 61 |
| E 41 | AGG/VIC | CTG | M 61 |
| E 33 | AAG/VIC | CTG | M 61 |
| E 37 | ACG/VIC | CAA | M 47 |
| E 45 | ATG/VIC | CTT | M 62 |
| 6 Primerkombinationen Selektive Amplifikation Auswahl | | | |
| Keygene | EcoRI | MseI | Keygene |
| E 35 | ACA/FAM | CAC | M 48 |
| E 38 | ACT/NED | CTC | M 60 |
| E 37 | ACG/VIC | CAA | M 47 |
| E 76 | GTC/FAM | CAG | M 49 |
| E 76 | GTC/NED | CTA | M 59 |
| E 64 | GAC/VIC | CAG | M 49 |

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

II.4.4 Präamplifikation

Die Präamplifikation wurde der Probenanzahl entsprechend entweder mit 8-gliedrigen Tubenstreifen oder mit 96-*well* Platten (Multiplate PCR Plates Low 96-*well* Clean, Bio-Rad Laboratories, US) mit dem Thermocycler (Bio-Rad C 1000, Bio-Rad Laboratories, US) durchgeführt. Es wurden zwei präselektive Primerkombinationen mit jeweils einem

selektiven Nukleotid verwendet (Tab. 6). Alle Reagenzien wurden auf Eis vorbereitet (Tab. 7). In einem Reaktionsvolumen von 10 μl pro Versuchseinheit bestand der Reaktionsmix aus 5,86 μl ddH₂O, 1,14 μl 10x RedTaq Puffer (Sigma-Aldrich, US), dieser Puffer enthielt 10 mM MgCl₂; 0,22 μl 10 mM dNTP mix (Ambion, US), 0,58 μl kombinierte Primer MseI 5 μM (Sigma-Aldrich, US) + Primer EcoRI 5 μM (Applied Biosystems, US), 0,2 μl RedTaq Polymerase (Sigma-Aldrich, US) und 2 μl 10x verdünntes Produkt der Restriktion/Ligation.

Es wurde ein der aufgerundeten Probenanzahl (mindestens +10%) entsprechender Mastermix erzeugt, um Pipettierfehler auszuschließen. Vorab wurden die EcoRI- und MseI-Primer equimolar in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Der Mastermix wurde bei 1000 rcf/RT kurz zentrifugiert. 8 μl Mastermix wurden aliquot in die Reaktionsgefäße vorgelegt und von jeder Probe 2 μl des 10x verdünnten Produktes der Restriktion/Ligation hinzupipettiert (Tab. 7). Die Reaktionsgefäße wurden sorgfältig verschlossen.

| Präamplifikation | Stock | Endkonzentration | Reaktionsmix |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------------------|
| ddH ₂ O | | | 5,86 μl |
| RedTaq Puffer | X 10 | X 1,14 | 1,14 μl |
| dNTP mix | 10 mM | 0,22 mM | 0,22 μl |
| Primer MseI+Primer EcoRI | 5 mM | 0,29 mM | 0,58 μl |
| RedTaq DNA Polymerase | 1U/ μl | 0,02 U/ μl | 0,2 μl |
| DNA-Produkt, 10x verdünnt | | | 2 μl |
| Reaktionsvolumen | | | 10 μl |

Tabelle 7: Reaktionsmix Präamplifikation

Für die Präamplifikation wurde eine PCR mit 26 Zyklen durchgeführt (Tab. 8). Die Reaktionen wurden für 2 min. bei 72 °C gestartet, die DNA für 5 sec. bei 94 °C denaturiert. Die Primer-Hybridisierung wurde bei 56 °C für 30 sec., die Elongation bei 72 °C für 2 min. und die finale Extension für 30 sec. durchgeführt. Die Initialtemperatur von 72 °C dient dem vollständigen Lückenschluss zwischen der Doppelstrang-DNA und den Adaptern durch die RedTaq Polymerase (Vos, P. 1995) und unterstützt die Inaktivierung der T4 DNA-Ligase.

| Präamplifikation PCR Protokoll | Temperatur | Zeit in min. |
|--------------------------------|------------|--------------|
| Hold | 72 °C | 02:00 |
| Denaturierung | 94 °C | 0:05 |
| 26 Zyklen | 56 °C | 0:30 |
| Elongation | 72 °C | 2:00 |
| Extension | 60 °C | 30:00 |
| Hold | 4 °C | ∞ |

Tabelle 8: PCR-Protokoll Präamplifikation

II.4.5 Agarose-Gelelektrophorese 2

Das Produkt wurde mit einer neuerlichen Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 14) geprüft und anschließend mit ddH₂O 10x verdünnt. Anstatt des Bromophenol-Ladepuffers wurde Xylencyanolpuffer, der eine Lauffront von etwa 4kb aufweist, verwendet. Dadurch wurde die Überlagerung von Fragmenten und Lauffront vermieden.

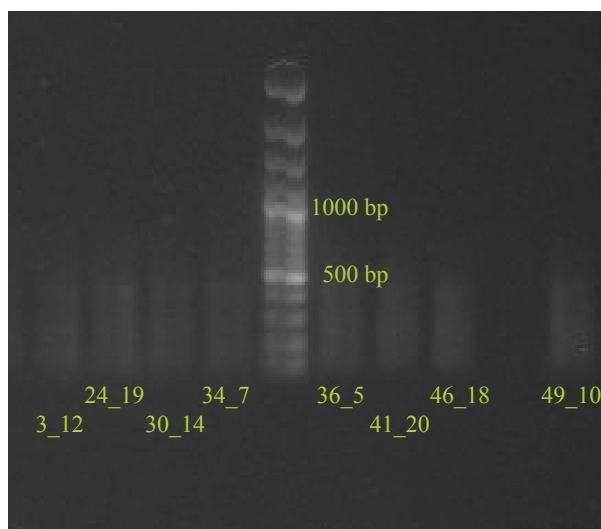


Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese: Präamplifikation
 Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10

Präamplifikation: Es entstehen zahlreiche kurze Fragmente, konzentrationsabhängig sichtbar, vorwiegend in einem Längenbereich zwischen 100 bp bis 700 bp. Die DNA liegt in geringer Konzentration vor. Nur ausgewählte, kürzere Fragmente des Restriktion/Ligation-Produktes wurden amplifiziert.

II.4.6 Selektive Amplifikation

Die selektive PCR wurde mit 96-well Platten bei einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Selektive EcoRI-Primer, die über 3 selektive Nukleotide verfügten, waren mit den Farbstoffen FAM, NED, VIC fluoreszenzmarkiert. Pro Versuchseinheit bestand der Reaktionsmix aus 5,5 µl ddH₂O, 1 µl 10x RedTaq Puffer (Sigma-Aldrich), 0,22 µl 10mM dNTP mix (Applied Biosystems), 0,54 µl 5µM Primer MseI (Sigma-Aldrich), 0,54 µl 1µM Primer EcoRI (Applied Biosystems), 0,2 µl RedTaq Polymerase (Sigma-Aldrich) und 2 µl des 10x verdünnten Produktes der Restriktion/Ligation. Der entsprechende Mastermix wurde bei 1000 rcf/RT kurz zentrifugiert. 8 µl Mastermix wurden aliquot in die Reaktionsgefäßen vorgelegt und von jeder DNA-Probe 2 µl des 10x verdünnten Restriktion/Ligation-Produktes hinzupipettiert (Tab. 9).

| Selektive Amplifikation | Stock | Endkonzentration | Reaktionsmix |
|---------------------------|-------|------------------|--------------|
| ddH ₂ O | | | 5,5 µl |
| RedTaq Puffer | X 10 | X 1 | 1,0 µl |
| dNTP mix | 10 mM | 0,22 mM | 0,22 µl |
| Primer MseI | 5 mM | 0,27 mM | 0,54 µl |
| Primer EcoRI | 1 mM | 0,054 mM | 0,54 µl |
| RedTaq DNA Polymerase | 1U/µl | 0,02 U/µl | 0,2 µl |
| DNA-Produkt, 10x verdünnt | | | 2 µl |
| Reaktionsvolumen | | | 10 µl |

Tabelle 9: Selektive Amplifikation

Die Tubenstreifen wurden verschlossen; die 96-well Platte wurde mit einer Noppen-Gummimatte bedeckt. Die selektive Amplifikation wurde nach einem TD-PCR Protokoll mit neun progressiven T_a-Schritten um jeweils 1°C (von 65 °C bis 57 °C) und 23 Zyklen mit gleich bleibender T_a von 56 °C durchgeführt (Tab. 10).

| Denaturierung | | Annealing | | Elongation | | Zyklen |
|---------------|-------|-----------|-------|------------|-------|--------|
| 94 °C | 02:00 | 65 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 64 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 63 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 62 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 61 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 60 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 59 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 58 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 57 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 1 |
| 94 °C | 00:01 | 56 °C | 00:30 | 72 °C | 02:00 | 23 |
| Extension | | 60 °C | 30:00 | | | |
| Final Hold | | 4 °C | ∞ | | | |

Tabelle 10: TD-PCR Protokoll

Für die AFLP-Analyse von je fünf Individuen aus achtzehn Populationen mit sechs selektiven Primern wurde ein Individuum (1_10) 4x pro 96-well Platte repliziert. Als Kontrolle wurden zwei Segmente ausschließlich mit dem Reaktionsmix (*blank*) beladen.

II.4.7 Kapillarelektrophorese

Vor der Durchführung der Kapillarelektrophorese mit dem automatisierten Sequenziergerät (3130 *xl* Applied Biosystems, US), (Abb. 15) wurden die Produkte der selektiven PCR mit Sephadex G-50 Superfine auf einer Multi Screen-HV 96-well Filterplatte (Millipore, US) gereinigt. Pro 96-well Platte wurden in einem Erlenmeyerkolben 5 g Sephadex unter UV-Licht mit 60 ml ddH₂O und 50 µl gelöst. Jedes Segment der 96-well Filterplatte wurde mit 200 µl der Sephadexlösung beladen und für 1 min. bei 600 rcf/RT in der Plattenzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf, DE) zentrifugiert. Die Flüssigkeit in der Auffangplatte wurde entsorgt und der Vorgang wiederholt. Nach einem dritten Konzentrationsschritt wurde 5 min. bei 600 rcf/RT zentrifugiert, die Auffangplatte geleert. Die Platte wurde vor jeder Zentrifugation gewogen, um den Gewichtsausgleich herstellen zu können. Von jeder

Probe wurden 5 µl PCR-Produkt von drei Primern (FAM, NED, VIC) additiv auf die konzentrierte Sephadex-Substanz pipettiert und die Platte mit 600 rcf/RT zentrifugiert. Die Geschwindigkeit für Konzentration der Sephadexmischung und die Aufreinigung des kombinierten Produktes musste, um die Konzentrationsdichte und Filterfunktion der Sephadex-Substanz zu erhalten, identisch sein. Der Durchfluss mit dem kombinierten PCR-Produkt wurde aufgefangen. Für die Elektrophorese wurde ein Mastermix aus 980 µl HiDi-Formamide und 10 µl des Größenstandards GeneScan™ 500 ROX™ (Applied Biosystems, US) vorbereitet. Der Größenstandard besteht aus rot markierten Fragmenten unterschiedlicher (75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 340, 350, 450, 490, und 500 bp) Länge und ermöglicht die Größenbestimmung der detektierten Signale aller Fluorophore. In einer neuen 96-*well* Platte wurden für jede Probe 10 µl Mastermix vorgelegt und 1 µl des gefilterten, kombinierten PCR-Produktes hinzupipettiert. Die 96-*well* Platte wurde kurz mit 1000 rcf/RT zentrifugiert und mit einer Gummimatte bedeckt. Auf dem Thermocycler wurden die Produkte bei 95 °C für 2 min. denaturiert, sofort auf Eis schockgekühlt und kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente wurden deren Längen mit der Software GENESCAN 3.7.2 (Applied Biosystems, US) anhand des internen Größenstandards GeneScan™ 500 ROX™ definiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GENOGRAPHER 1.6.0. (<http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer>). Für die weitere Statistik wurden die Ergebnisse in Excel (Excel 2008 for Mac, Vers. 12, Microsoft, US) transferiert und in eine binäre Datenmatrix transponiert.

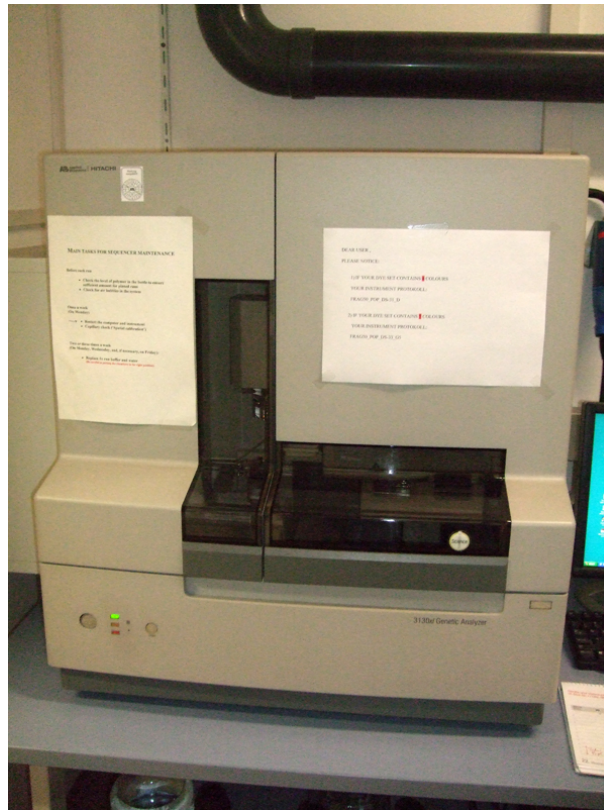


Abbildung 15: 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US)

II.4.8 Wiederholbarkeit

Um die Wiederholbarkeit der AFLP-Methode mit den 3 ausgewählten drei Primern zu überprüfen, wurden mit der DNA von 7 Individuen zwei weitere unabhängige Repetitionen durchgeführt. Für die AFLP-Analyse von vier bzw. fünf Individuen aus achtzehn Populationen mit sechs selektiven Primern wurde ein Individuum (1_10) 4x pro 96-well Platte repliziert. Die Polymorphismen der Wiederholungen wurden mit der Software Excel ausgewertet. Die Fehlerquote wurde aus dem Verhältnis der Differenz (0 versus 1) zu Übereinstimmung (1 versus 1), das die AFLP-Profile der replizierten Individuen aufwiesen, bestimmt (Bonin, A. et al. 2004).

II.5 Datenanalyse

II.5.1 DNA-Extraktion

Für die Auswertung der Ergebnisse der unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren wurden die Messkategorien 'Reinheit' und 'Konzentration' als Bewertungskriterien herangezogen. Aus den normierten Werten der einzelnen Messungen jeder Probe wurden mit Excel jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Median pro Aufreinigungsmethode berechnet. Die Relationen zwischen den einzelnen Methoden wurden anhand der Mittelwerte in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

II.5.2 AFLP-Analyse

Die Diversität der Akzessionen wurde durch die Auswertung der mit Kapillarelektrophorese erstellten Bandenmuster festgestellt. Aus den mit der Software ABI Prism GeneScan® 3.7.2 an den Größenstandard angeglichenen und mit dem Programm Genographer (Version 1.6.0., ©Montana State University 1998, <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>) manuell analysierten Polymorphismen aller Akzessionen an spezifischen Genloci wurde mit Excel eine binäre Datenmatrix erstellt. Die Präsenz einer Bande an einem bestimmten Locus wurde mit 1, die Absenz mit 0 bewertet. Es wurden Banden in einem Längenspektrum von 100 bp bis 550 bp, die ausreichend intensive Fluoreszenz aufwiesen, für die Analyse gewertet. Um Homoplasien in den zahlreich vorliegenden, kürzeren Fragmenten zu begrenzen, wurden Fragmente erst ab einer Länge von 100 bp berücksichtigt.

Die Analyse gemeinsamer Allele ('*allele-sharing*') der vorliegenden Ploidieniveaus und die Berechnung der Häufigkeitsverteilung der Allele bestimmter Längen über die 312 ermittelten AFLP-Loci aus 6 Primerkombinationen erfolgten mit Excel. Die Summen der Fragmente wurden in 9 Längensklassen a 50 bp (zwischen 100 bp und 550 bp) kategorisiert und durch ein Balkendiagramm dargestellt (Abb. 18).

Die Auswertung der Banden zur Ermittlung des Polymorphiegrades wurde mit der Software FAMD (Fingerprint Analysis with Missing Data 1.23 beta, © Schlüter, P. M., 2006) durchgeführt.

Die Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Genotypenklassen basierend auf den paarweisen Distanzen der Allele erfolgte Form in eines Histogramms, das mit der Software Software GenoType Version 1.2 2007 (Meirmans, P. G. et al. 2004) erstellt wurde. Für die Berechnung der Distanzmaße wurde die Option des unendlichen Allelemodells (*infinite allele model-IAM* nach Kimura, M. & Crow, J. F. 1964) verwendet. Dieser Distanzindex setzt eine Mutation als Limit, um zwei Allelezustände zu differenzieren. Das Distanzmaß besteht daher aus der Anzahl an Mutationen, die über alle Loci summiert, benötigt werden, um den Genotyp eines Individuums in den Genotyp eines anderen Individuums zu transformieren.

Aus dem AFLP-Datensatz wurden die paarweisen Unähnlichkeiten aller Akzessionen zueinander durch die euklidische Distanzfunktion berechnet und multidimensional räumlich definiert (Statistica V.6.1). Anhand dieser Datenmatrix wurde unter Anwendung des Algorithmus 2D_EUCLID (Saukel, J. et al. 2004) die Gruppenzuordnung der Proben in einem 2D_EUCLID Scatterplot dargestellt. Es handelt sich bei dieser Methode um die Transformation von Daten aus dem multidimensionalen Raum in eine oder mehrere zweidimensionale Ebenen. Die Differenzierung der Werte für die X- und Y-Achse oder die Anwendung eines Skalierfaktors ermöglichen die Minimierung des *'mapping errors'*. Optimierte Gruppenzuordnungen können graphisch umgesetzt werden. Die Schritte der Transformation und deren Berechnungsmodi sind in der Literatur (Saukel, J. et al. 2004) detailliert angegeben.

Um die Funktionalität des Datenmaterials und lineare Zusammenhänge zwischen den Skalen der Koordinaten zu überprüfen, wurde ein Korrelationskoeffizient unter Verwendung der Kovarianzen und Standardabweichungen aller Werte der Euclid 2D_1- und Euclid 2D_2-Achsen mit Excel ermittelt.

III Ergebnisse

III.1 Ergebnisse von 4 DNA-Extraktionsmethoden

Die jeweils mit den Verfahren

peqGOLD Plant DNA Mini Kit (peqlab) = PeQ

DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen)=Quia

Nucleo Spin Plant II (Macherey Nagel)=Mach

CTAB-Methode=CTAB

extrahierte DNA von 8 Individuen (Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10) wurden mit dem Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 gemessen und auf Konzentration und Reinheit überprüft. Aufgrund der hohen Werte beider oben genannter Kriterien, der unkomplizierten Handhabung, des schnellen Laborablaufes und der mittleren Probenanzahl des Projektes wurde der Nucleo Spin Plant II Kit von Macherey-Nagel für die Fortsetzung der AFLP-Analyse von 89 Individuen aus 18 Populationen ausgewählt.

III.1.1 DNA-Extraktion: Konzentration

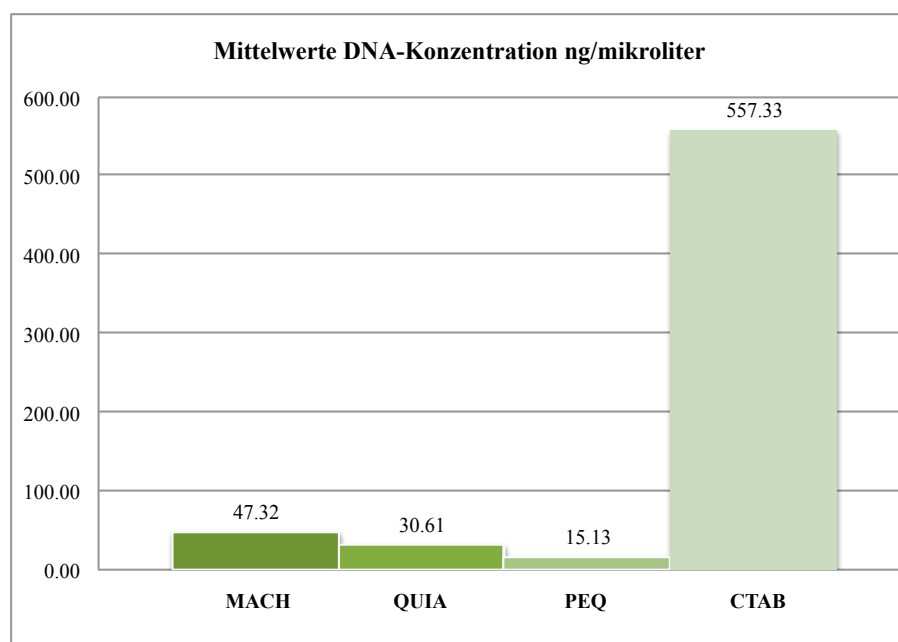


Abbildung 16: DNA – Konzentration: Vergleich 4 DNA-Extraktionsmethoden anhand der Mittelwerte in ng/μl

Die Konzentrationsmessungen in ng/μl und die daraus berechneten Mittelwerte der Proben (Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10) pro Extraktionsmethode ergaben mit 47,23 ng/μl für den Extraktionskit Nucleo Spin Plant II von Macherey-Nagel und 557.33 ng/μl für die CTAB Methode ausreichend hohe Werte um die erforderliche Menge von mindestens 250 ng DNA in einem Reaktionsvolumen von 12 μl (davon 6 μl DNA-Lösung) zu erhalten. Die Leistung der Extraktionskits PeQ und Quia betrug 15,13 ng/μl und 30,61 ng/μl. Die detaillierten Ergebnisse der Einzelmessungen aller DNA-Proben sind in Tabelle 11 aufgelistet.

III.1.2 DNA-Extraktion: Reinheit

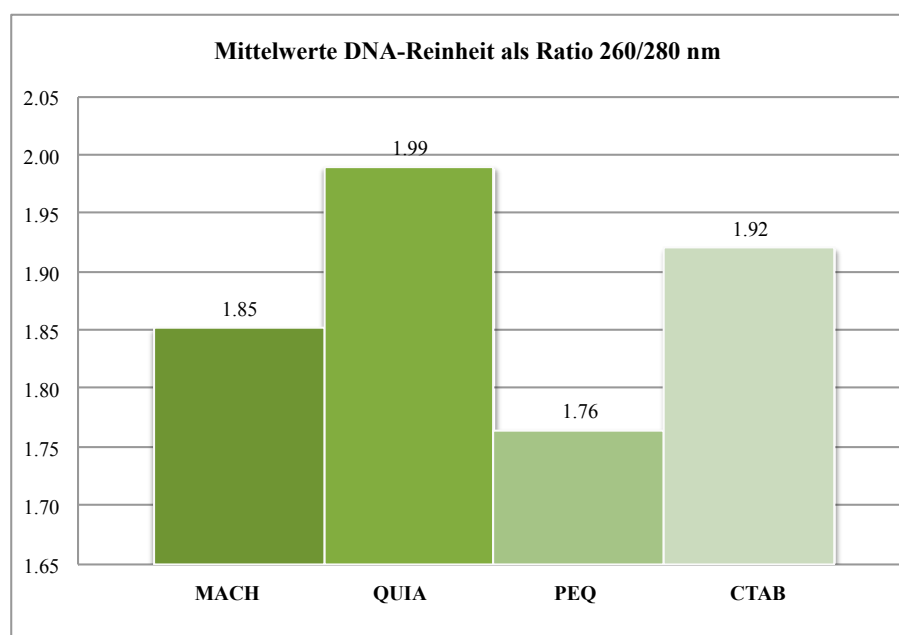


Abbildung 17: DNA – Reinheit: Vergleich von 4 DNA-Extraktionsmethoden anhand der Mittelwerte der Ratio 260/280 nm

Die Reinheit der DNA-Proben (Proben 3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10, Messwerte siehe Tabelle 11) wurde durch das Absorbtionsverhältnis von 260/280 nm bestimmt und lag bei mit den Methoden Mach, Quia und CTAB extrahierter DNA in einem Bereich über 1,8; ein Ergebnis, das die 3 Methoden für weitere Analysen qualifizierte. Die laborintensive CTAB-Methode erreichte als Mittelwert aller Messungen eine 260/280 nm Ratio von 1,92, was neben den Aufreinigungskits Mach und Quia (1,85 und 1,99) ein fast gleichwertiges Ergebnis (Abb. 17) bedeutete. Das Produkt PeQ lag mit einem Wert von 1,76 unter dem für PCR-Anwendungen erforderlichen DNA-Reinheitswert von 1,8 bis 1,9.

| Messdaten NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer | | | | | | |
|--|---------------|-----------|------|-----------|-----------|------|
| | Konzentration | | | Reinheit | | |
| | ng/µl | Mach alle | | 260/280nm | Mach alle | |
| Mach24_19 | 95.64 | 47.32 | MW | 1.71 | 1.85 | MW |
| Mach3_12 | 52.13 | 46.65 | MD | 1.59 | 1.85 | MD |
| Mach30_14 | 57.42 | 24.16 | STBW | 1.81 | 0.15 | STBW |
| Mach34_7 | 32.74 | 17.51 | MIN | 1.99 | 1.59 | MIN |
| Mach36_5 | 17.51 | 95.64 | MAX | 2.03 | 2.03 | MAX |
| Mach41_20 | 26.75 | 78.13 | DIFF | 1.98 | 0.44 | DIFF |

| | | | | | | |
|-----------|--------|------------------|------|------|------------------|------|
| Mach46_18 | 55.21 | | | 1.89 | | |
| Mach49_10 | 41.17 | | | 1.81 | | |
| | | Quia alle | | | Quia alle | |
| Quia24_19 | 52.29 | 30.61 | MW | 1.77 | 1.99 | MW |
| Quia3_12 | 31.71 | 28.91 | MD | 2.59 | 1.95 | MD |
| Quia30_14 | 46.59 | 14.06 | STBW | 1.84 | 0.27 | STBW |
| Quia34_7 | 14.75 | 12.72 | MIN | 2.07 | 1.73 | MIN |
| Quia36_5 | 12.72 | 52.29 | MAX | 2.02 | 2.59 | MAX |
| Quia41_20 | 26.10 | 39.57 | DIFF | 1.97 | 0.86 | DIFF |
| Quia46_18 | 36.06 | | | 1.73 | | |
| Quia49_10 | 24.64 | | | 1.92 | | |
| | | PeQ alle | | | PeQ alle | |
| PeQ24_19 | 13.67 | 15.13 | MW | 1.69 | 1.76 | MW |
| PeQ3_12 | 14.68 | 14.00 | MD | 1.95 | 1.83 | MD |
| PeQ30_14 | 41.83 | 11.91 | STBW | 1.84 | 0.35 | STBW |
| PeQ34_7 | 14.33 | 2.52 | MIN | 2.01 | 1.07 | MIN |
| PeQ36_5 | 2.52 | 41.83 | MAX | 1.07 | 2.21 | MAX |
| PeQ41_20 | 11.76 | 39.31 | DIFF | 1.53 | 1.14 | DIFF |
| PeQ46_18 | 5.00 | | | 2.21 | | |
| PeQ49_10 | 17.28 | | | 1.81 | | |
| | | CTAB alle | | | CTAB alle | |
| CTAB24_19 | 565.62 | 557.33 | MW | 1.88 | 1.92 | MW |
| CTAB3_12 | 407.51 | 532.39 | MD | 1.95 | 1.93 | MD |
| CTAB30_14 | 249.57 | 200.53 | STBW | 1.88 | 0.03 | STBW |
| CTAB34_7 | 499.15 | 249.57 | MIN | 1.92 | 1.88 | MIN |
| CTAB36_5 | 427.29 | 845.05 | MAX | 1.93 | 1.95 | MAX |
| CTAB41_20 | 845.05 | 595.48 | DIFF | 1.93 | 0.07 | DIFF |
| CTAB46_18 | 732.50 | | | 1.94 | | |
| CTAB49_10 | 731.95 | | | 1.93 | | |

Tabelle 11: Ergebnisse der DNA-Extraktionsmethoden
 Legende: MW-Mittelwert, MD-Median, STBW-Standardabweichung,
 MIN-Minimum, MAX-Maximum, DIFF-Differenz

III.2 Ergebnisse der AFLP-Analyse

III.2.1 Screening von 12 AFLP-Primerkombinationen

Für die Auswahl bestimmter, für die AFLP-Analyse des *Valeriana officinalis* Aggregates geeigneter Primerkombinationen, wurden 12 Primer mit 7 über das gesamte Verbreitungsgebiet ausgewählten Individuen aus 7 Populationen (3_12, 24_19, 30_14, 34_7, 36_5, 41_20, 46_18, 49_10) getestet. Die Auswahl (Tab. 12) von 3 Primern für weitere Versuche erfolgte aufgrund der Klarheit und der ausgeglichenen Verteilung der

Banden in einem Längenbereich zwischen 100 bp und 550 bp. Weitere Auswahlkriterien waren der Grad an Variabilität den die Banden aufwiesen und die Gleichförmigkeit der emittierten Fluoreszenzsignale.

| Primer | Eco | Mse | Total | Anzahl Banden polymorph | Polymorph % | Anzahl Banden monomorph | Monomorph % |
|-----------|------------|------------|-----------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 1 | ACA | CAC | 53 | 45 | 85 | 8 | 15 |
| 2 | ACT | CTC | 36 | 36 | 100 | 0 | 0 |
| 3 | ACA | CAT | 73 | 65 | 89 | 8 | 11 |
| 4 | ATC | CTG | 76 | 66 | 87 | 10 | 13 |
| 5 | ACC | CAG | 21 | 17 | 81 | 4 | 19 |
| 6 | ACC | CAT | 26 | 17 | 65 | 9 | 35 |
| 7 | AAC | CAT | 18 | 12 | 67 | 6 | 33 |
| 8 | AGC | CTG | 27 | 20 | 74 | 7 | 26 |
| 9 | AGG | CTG | 46 | 38 | 83 | 8 | 17 |
| 10 | AAG | CTG | 15 | 10 | 67 | 5 | 33 |
| 11 | ACG | CAA | 35 | 30 | 86 | 5 | 14 |
| 12 | ATG | CTT | 27 | 19 | 70 | 8 | 30 |

Tabelle 12: Ergebnisse der Testreihe, die mit 12 AFLP-Primerkombinationen durchgeführt wurde. Drei Primer (**bold**) wurden für die selektive Amplifikation ausgewählt.

Die Kombinationen ACA-CAC (85% polymorph, 15% monomorph), ACC-CAG (81% polymorph, 19% monomorph) und ACG-CAA (86% polymorph, 14% monomorph) mit insgesamt 109 DNA-Banden wurden für weitere Versuche ausgewählt.

III.2.2 Ergebnisse der AFLP Analyse von 89 Individuen aus 18 Populationen

Die Analyse der mit 6 AFLP-Primerkombinationen (Tab. 6) generierten der DNA-Marker ergab 312 klar zu identifizierende Banden in einem Längenbereich von 102 bp bis 534 bp (MW 249 bp, MD 242 bp). Davon waren mit 311 Banden 99,7% polymorph und mit einer Bande 0,3% monomorph. Die Cluster diploider, tetraploider und oktoploider Individuen wurde durch 217 (211 polymorph - 6 monomorph), 229 (220 polymorph - 9 monomorph) und 253 (220 polymorph - 9 monomorph) Banden charakterisiert. Es wurde die folgende Anzahl an Markern pro Primer ausgewertet: ACA-CAC – 68, ACC-CAG – 38, ACG-CAA – 47, GTC-CAG – 71, GTC-CTA – 50, GAC-CAG – 38. Pro Individuum wurde aus allen 6 Primerkombinationen ein

Mittelwert von 75 Banden generiert. Die Auflistung der molekularen Marker pro AFLP-Primerkombination befindet sich im Anhang auf den Seiten 100 bis 108.

III.2.3 Allele-Sharing

Aus dem Pool von 312 Banden wies der Cluster von Individuen des diploiden Zytotyps 25, des tetraploiden Zytotyps 14 und des oktoploiden Zytotyps 45 für das jeweilige Ploidieniveau exklusive Banden auf. Die Anzahl gemeinsamer Banden aller drei Ploidieniveaus betrug 159. Diploide und Tetraploide wiesen 179, Di- und Oktoploide 172, Tetra- und Oktoploide 195 gemeinsame Banden auf (Tab. 13). Somit waren von 217 Banden diploider Individuen 82% in Tetraploiden und 79% in Oktoploiden vorhanden. Von 229 Banden tetraploider Individuen lagen 85% in Oktoploiden vor. Oktoploide wiesen insgesamt 253 Banden auf.

| Allelesharing von 312 Banden nach Ploidieniveau | Art der Banden | Anzahl |
|---|----------------|--------------------|
| Diploide | exclusive | 25 |
| Tetraploide | exclusive | 14 |
| Oktoploide | exclusive | 45 |
| Gruppe 2x, 4x, 8x | shared | 159 |
| Gruppe 2x, 4x | group shared | 20/ shared sum 179 |
| Gruppe 2x, 8x | group shared | 13/ shared sum 172 |
| Gruppe 4x, 8x | group shared | 36/ shared sum 195 |

Tabelle 13: Allelesharing der Ploidieniveaus diploid, tetraploid, oktoploid

III.2.3.1 Analyse der Replikate

Die Vorab-Analyse von 5 Replikaten der Probe 1_10 mit den oben genannten 6 AFLP-Primerkombinationen erfolgte um die Stabilität der Reaktionen und die Gleichförmigkeit des Gellaufs zu prüfen (Tab. 14). Sie ergab 87 Banden, die Längen von 102 bp bis 510 bp aufwiesen. Die aus den Frequenzen pro Locus berechnete Fehlerquote lag bei 1.12%.

| Gesamtergebnis 5 Replikate Probe 1_10 mit 6 AFLP-Primern | | |
|---|--------------------|---------------|
| | Allelfrequenz Min. | 0.8000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| alle 6 AFLP-Primer | MW | 0.9885 |
| Einzelergebnisse 6 Primerkombinationen, 5 Replikate Probe 1_10 | | |
| | Allelfrequenz Min. | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| Primer ACA-CAC | MW | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Min. | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| Primer ACC-CAG | MW | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Min. | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| Primer ACG-CAA | MW | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Min. | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| Primer GTC-CAG | MW | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Min. | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| Primer GTC-CTA | MW | 1.0000 |
| | Allelfrequenz Min. | 0.8000 |
| | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | MD | 1.0000 |
| Primer GAC-CAG | MW | 0.8333 |

Tabelle 14: Überprüfung von 5 Replikaten der Probe 1_10
 Allelfrequenz 1.0000 = 100% Übereinstimmung der Wiederholungen
 pro Locus, MD: Median, MW: Mittelwert

III.2.3.2 Häufigkeitsverteilung von 9 Allelklassen, 312 Loci über 89 Individuen von *Valeriana officinalis* agg.

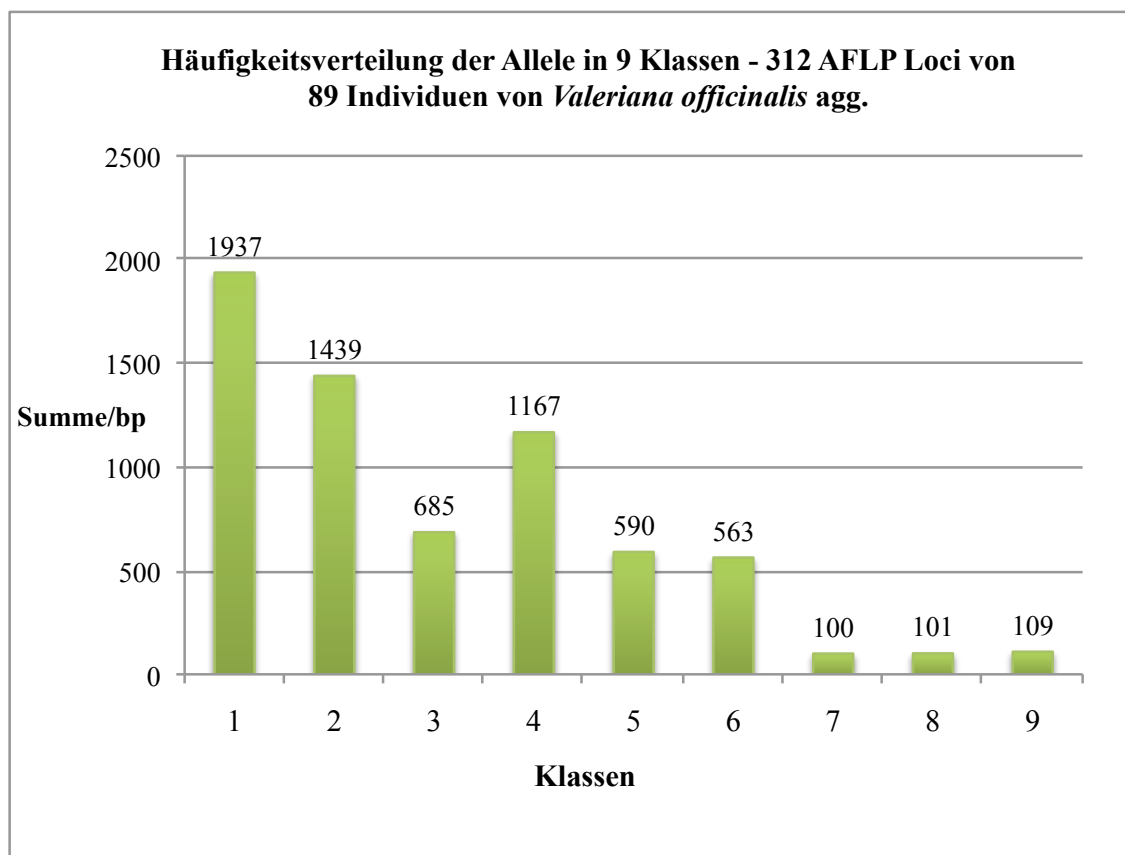


Abbildung 18: 312 AFLP Loci über 89 Individuen von *Valeriana officinalis* agg. in neun Klassen.
1:100-150 bp, 2:150-200 bp, 3:200-250 bp, 4:250-300 bp, 5:300-350 bp, 6:350-400 bp, 7:400-450 bp, 8:450-500 bp, 9:500-550 bp

III.2.3.3 Häufigkeitsverteilung der Genotypenklassen nach paarweisen Distanzen

Distanzindex: *infinite allele model-IAM*

| class | thresh | #pairs | #pairs |
|-------|--------|--------|--------|
| 0 | 0.00 | 0 | |
| 1 | 1.70 | 0 | |
| 2 | 3.39 | 0 | |
| 3 | 5.09 | 0 | |
| 4 | 6.79 | 0 | |
| 5 | 8.48 | 0 | |
| 6 | 10.18 | 0 | |
| 7 | 11.88 | 0 | |
| 8 | 13.58 | 0 | |
| 9 | 15.27 | 0 | |
| 10 | 16.97 | 0 | |
| 11 | 18.67 | 0 | |
| 12 | 20.36 | 0 | |
| 13 | 22.06 | 0 | |
| 14 | 23.76 | 1 | |
| 15 | 25.45 | 1 | |
| 16 | 27.15 | 2 | |
| 17 | 28.85 | 1 | |
| 18 | 30.55 | 5 | |
| 19 | 32.24 | 11 | * |
| 20 | 33.94 | 8 | * |
| 21 | 35.64 | 16 | ** |
| 22 | 37.33 | 18 | ** |
| 23 | 39.03 | 27 | **** |
| 24 | 40.73 | 13 | ** |
| 25 | 42.42 | 46 | ***** |
| 26 | 44.12 | 51 | ***** |
| 27 | 45.82 | 22 | *** |
| 28 | 47.52 | 66 | ***** |
| 29 | 49.21 | 98 | ***** |
| 30 | 50.91 | 47 | ***** |
| 31 | 52.61 | 103 | ***** |
| 32 | 54.30 | 141 | ***** |
| 33 | 56.00 | 146 | ***** |
| 34 | 57.70 | 79 | ***** |
| 35 | 59.39 | 163 | ***** |
| 36 | 61.09 | 203 | ***** |
| 37 | 62.79 | 127 | ***** |
| 38 | 64.48 | 226 | ***** |
| 39 | 66.18 | 212 | ***** |
| 40 | 67.88 | 132 | ***** |
| 41 | 69.58 | 239 | ***** |
| 42 | 71.27 | 223 | ***** |
| 43 | 72.97 | 112 | ***** |
| 44 | 74.67 | 219 | ***** |
| 45 | 76.36 | 220 | ***** |
| 46 | 78.06 | 171 | ***** |
| 47 | 79.76 | 74 | ***** |
| 48 | 81.45 | 160 | ***** |
| 49 | 83.15 | 116 | ***** |
| 50 | 84.85 | 51 | ***** |
| 51 | 86.55 | 95 | ***** |
| 52 | 88.24 | 59 | ***** |
| 53 | 89.94 | 28 | **** |
| 54 | 91.64 | 47 | ***** |
| 55 | 93.33 | 41 | ***** |
| 56 | 95.03 | 25 | *** |
| 57 | 96.73 | 13 | ** |
| 58 | 98.42 | 15 | ** |
| 59 | 100.12 | 16 | ** |
| 60 | 101.82 | 5 | |
| 61 | 103.52 | 7 | * |
| 62 | 105.21 | 6 | |
| 63 | 106.91 | 1 | |
| 64 | 108.61 | 2 | |
| 65 | 110.30 | 2 | |
| 66 | 112.00 | 4 | |

GENOTYPE ASSIGNMENT:
maximum distance: 112

Give the number of frequency classes (>1):
66

Give maximum distance for histogram:
112

Abbildung 19: GenoType-Histogramm der paarweisen Distanzen von Genotypen, dargestellt in 66 Klassen, maximale Distanz 112, für 89 Individuen an 312 AFLP-Loci
 Legende: class: Anzahl der Klassen von Genotypen
 threshold: der mit den Klassen in Korrelation stehende

Schwellenwert
#pairs: die Anzahl der aufgrund jedes Schwellenwerts
vorliegenden Genotypen und deren Anteil an der Gesamtheit in
graphischer Darstellung als *
Software GenoType Version 1.2, © Meirmanns, P. G., 2007

Die nach dem Distanzindex von Kimura, M. & Crow, J. F. 1964 berechnete Häufigkeitsverteilung der paarweisen Distanzen aller analysierten Genotypen ergab die Anordnung der Genotypenklassen im Sinne einer Normalverteilung. Sie zeigt auf dass sich unter den Proben keine Klone befanden (Abb. 19). Die maximale Distanz zwischen Genotypen betrug 112. Die Summen der Genotypen an jedem Schwellenwert sind im Histogramm in 66 Klassen komprimiert dargestellt.

III.2.3.4 AFLP-2D_EUCLID Algorithmus: Distanzberechnung und Scatterplot

Die Unähnlichkeitswerte wurden nach dem Maß Euklidische Distanz berechnet. Die Überprüfung auf lineare Korrelation der in der Distanzmatrix angegebenen räumlichen Koordinaten erfolgte unter Verwendung der Kovarianzen und Standardabweichungen aller Werte der 2D_Euclid 1 (= X-Achse) und 2D_Euclid 2 (=Y-Achse) Achsen. Der Korrelationskoeffizient ergab 0.09589. Im Ergebnis lag daher keine signifikante lineare Korrelation zwischen den Werten der beiden Hauptachsen vor (Abb.20).

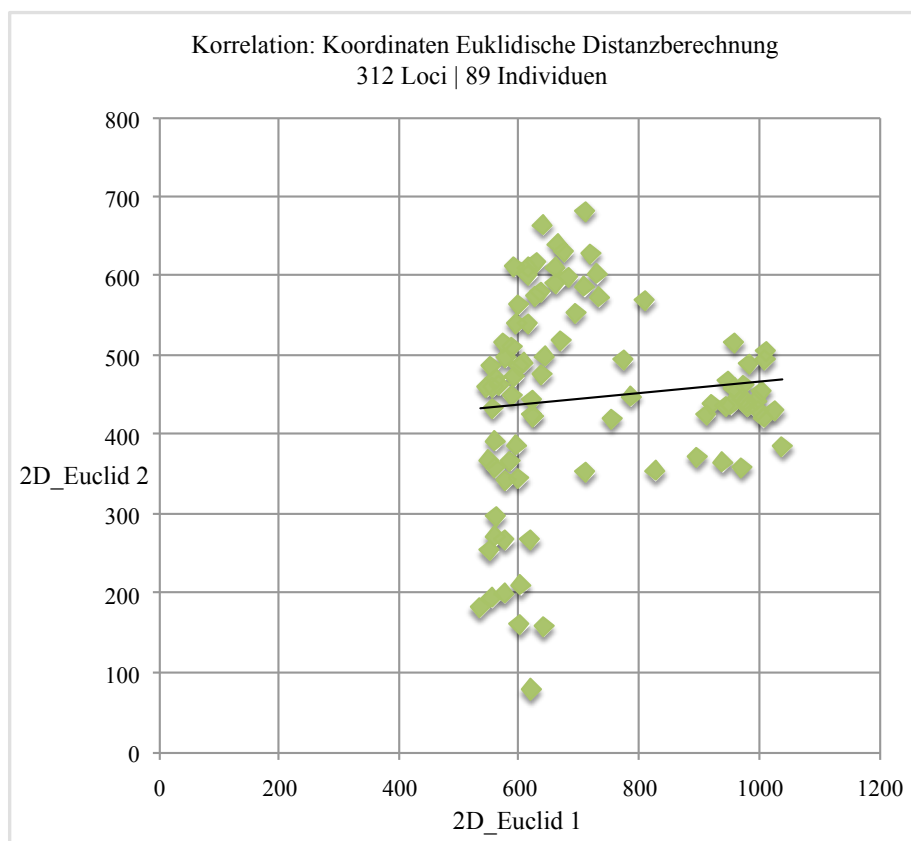


Abbildung 20: Streudiagramm, lineare Korrelation der Koordinaten für 89 Individuen von *Valeriana officinalis* agg., Korrelationskoeffizient 0.09589.

Die mit dem 2D_EUCLID Algorithmus durchgeführte Transformation der Distanzmatrix aus dem multi- in den zweidimensionalen Raum in Form einer Projektion in vier Ebenen zeigt vier unterschiedlich voneinander entfernte, informelle Gruppen. Gruppe 3 ist deutlich von den anderen Gruppen abgegrenzt und entspricht weitgehend dem diploiden Probenmaterial. Die Gruppen 1 und 2 enthalten mehrheitlich tetra- bzw. oktoploides Probenmaterial. Die Übergangsgruppe 4 weist einer geringere Anzahl von Individuen aller drei Ploidieniveaus auf, wobei die tetra- und die oktoploide Stufe häufiger vorliegen (Abb. 21).

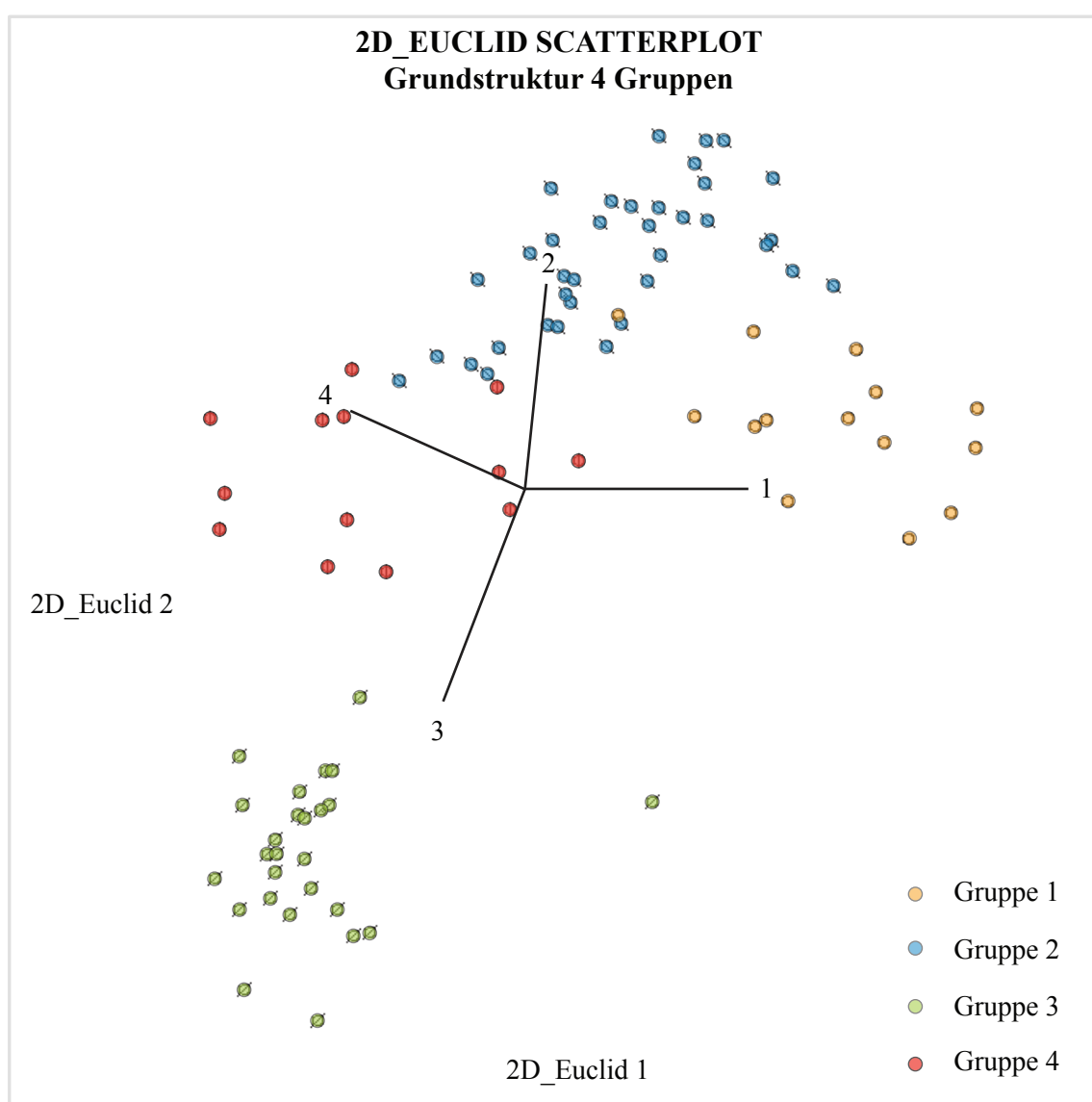


Abbildung 21: Grundstruktur in vier informellen Gruppen:
Scatterplot 2D_EUCLID Algorithmus, Transformation der Daten aus dem
multi- in den zweidimensionalen Raum

89 Individuen aus 18 Populationen von *Valeriana officinalis* agg.
Software Statistica V 6.1., Adobe Illustrator CS4, 14.0.0
Vergleich: Centroiddistanzen der Grundstruktur mit Abbildung
1 2 G 65 A 40 (25), 1 3 G 94 A100 (-6), 1 4 G 73 A 69 (5), 2 3 G100 A 99 (1),
2 4 G 59 A 48 (11), 3 4 G 78 A 57 (21), SW aus V HS 22 YS 15
mapping error: 0.0391268791925

Die konzentrierte Projektion in drei Ebenen unter Ausschluss von 29 Individuen, die Überschneidungen von Gruppen darstellen würden, konfiguriert drei voneinander deutlich separierte Gruppen. Sie beinhalten jene signifikanten Individuen, die den Ploidieniveaus diploid (Gruppe 1), tetraploid (Gruppe 2) und oktaploid (Gruppe 3) genau entsprechen (Abb. 22).

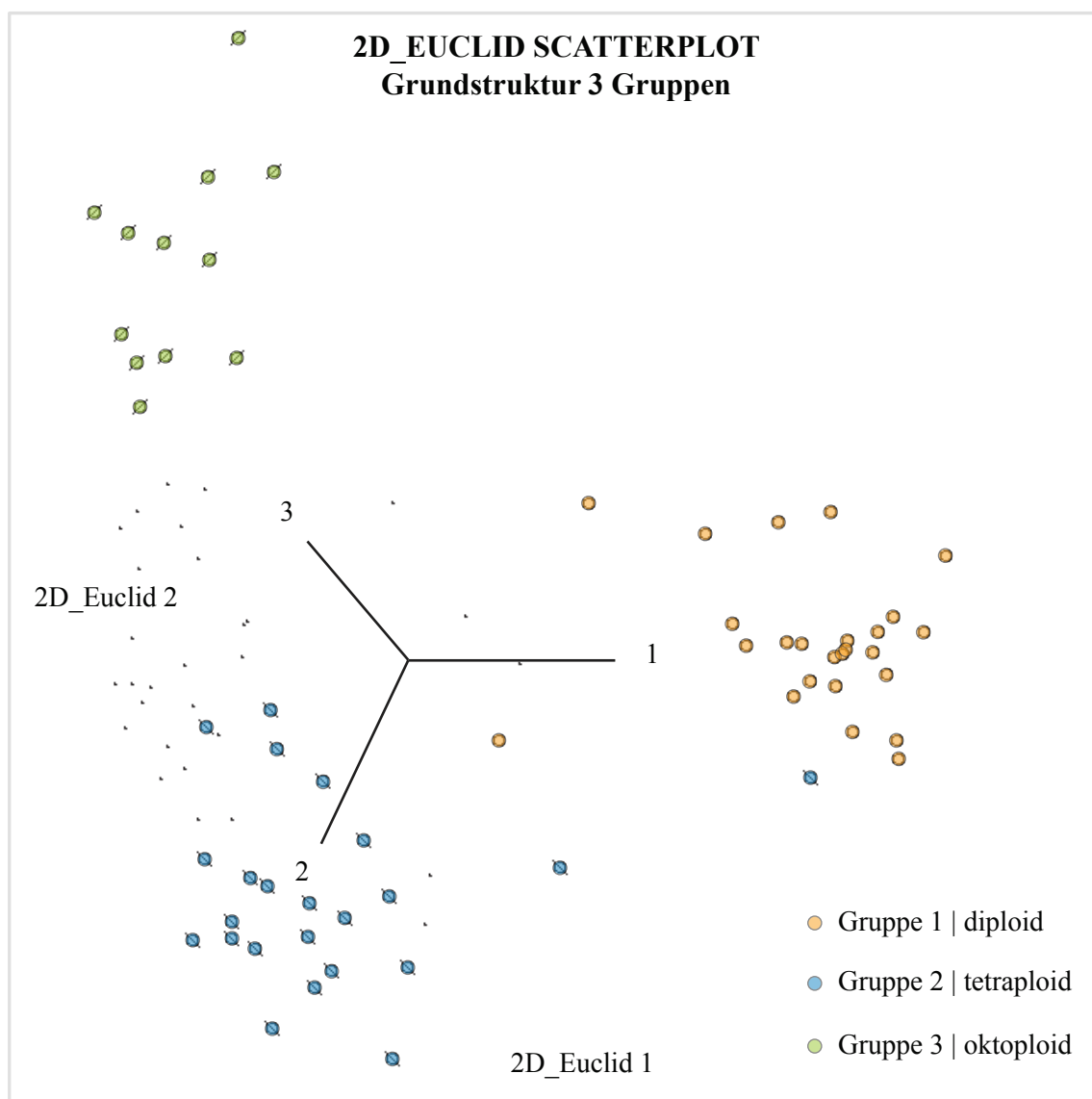


Abbildung 22: Grundstruktur in drei Gruppen:
 Scatterplot 2D_EUCLID Algorithmus, Transformation der Daten aus dem multi- in den zweidimensionalen Raum
 89 Individuen aus 18 Populationen von *Valeriana officinalis* agg.
 Software Statistica V 6.1., Adobe Illustrator CS4, 14.0.0
 Vergleich: Centroiddistanzen der Grundstruktur mit Abbildung
 1 2 G 88 A 74 (15), 1 3 G100 A100 (0),
 2 3 G 89 A 87 (-2), SW aus V 2 HS 15 YS 18
 mapping error: 0.008869359575264

Die Darstellung aller Akzessionen des *Valeriana officinalis* Aggregates unter Berücksichtigung der Ploidieniveaus diploid, tetraploid und oktoploid in drei Projektionsebenen zeigt die tetraploiden und oktoploiden Individuen in zwei angenäherten und zum Teil sich überlappenden Clustern liegend. Überschneidungen der Gruppen anhand einiger Individuen sind in allen drei Gruppen erkennbar, was auf gemischte Populationen, deren Individuen unterschiedliche Zytotypen aufweisen, schließen lässt (Abb. 23).

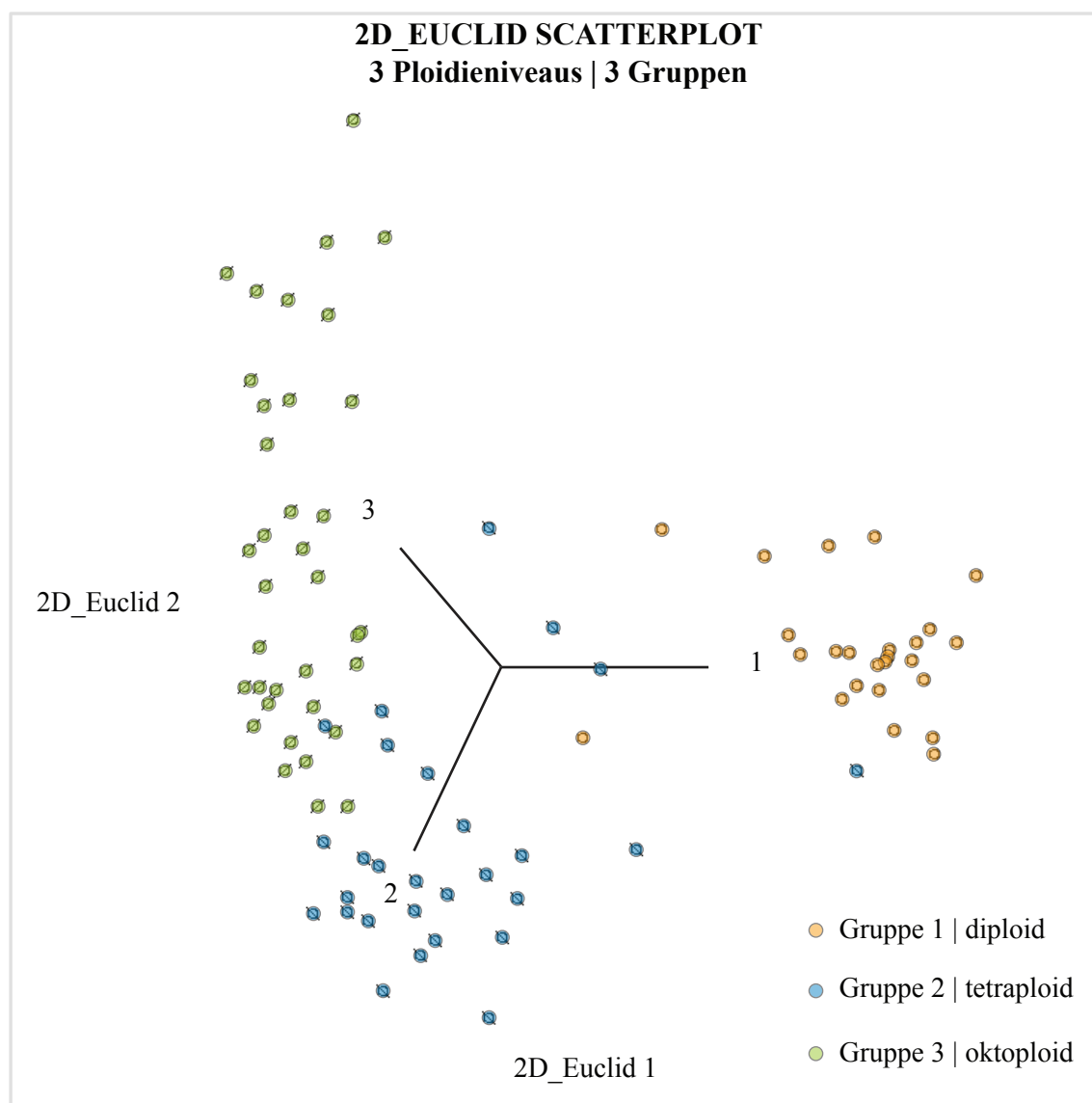


Abbildung 23: 3 Ploidieniveaus | 3 Gruppen:
Scatterplot 2D_EUCLID Algorithmus, Transformation der Daten aus dem multi- in den zweidimensionalen Raum
312 Loci für 89 Individuen aus 18 Populationen von *Valeriana officinalis* agg.
Software Statistica V 6.1, Adobe Illustrator CS4, 14.0.0
Vergleich: Centroiddistanzen der Grundstruktur mit Abbildung

1 2 G 84 A 79 (4), 1 3 G100 A100 (0), 2 3 G 61 A 58 (3)
 SV aus V 2 HS 15 YS 18
 mapping error: 0.001623416739584

| |
|--|
| Gruppe 1: Akzession: diploide Populationen_ Individuen |
| 6: 3_5, 7: 3_8, 8: 3_12, 9: 3_16, 10: 3_17, 45: 29_4, 46: 29_11, 47: 29_15, 48: 29_18, 49: 29_19, 55: 34_7, 58: 34_16, 59: 34_18, 76: 42_2, 78: 42_9, 80: 46_2, 81: 46_5, 82: 46_6, 83: 46_15, 84: 46_18, 85: 49_4, 86: 49_9, 87: 49_10, 88: 49_15, 89: 40_20 |
| Gruppe 2: Akzession: tetraploide Populationen_ Individuen |
| 11: 5_1, 12: 5_5, 13: 5_6, 14: 5_16, 15: 5_19, 16: 6_4, 17: 6_7, 18: 6_9, 19: 6_11, 20: 6_12, 21: 11_3, 22: 11_4, 23: 11_7, 24: 11_12, 25: 11_13, 40: 24_2, 41: 24_4, 42: 24_13, 43: 24_17, 44: 24_19, 70: 41_6, 71: 41_12, 72: 41_16, 73: 41_18, 74: 41_20, 75: 42_1 |
| Gruppe 3: Akzession: oktaploide Populationen_ Individuen |
| 1: 1_2, 2: 1_3, 3: 1_4, 4: 1_5, 5: 1_10, 26: 14_6, 27: 14_8, 28: 14_10, 29: 14_17, 30: 18_1, 31: 18_3, 32: 18_5, 33: 18_8, 34: 18_11, 35: 22_2, 36: 22_3, 37: 22_5, 38: 22_7, 39: 22_9, 50: 32_8, 51: 32_11, 52: 32_13, 53: 32_14, 54: 32_15, 56: 34_13, 57: 34_14, 60: 36_4, 61: 36_5, 62: 36_7, 63: 36_11, 64: 36_16, 65: 39_1, 66: 39_3, 67: 39_5, 68: 39_13, 69: 39_20 |

Tabelle 15: 2D_EUCLID Scatterplots Abb. 23: Gruppenzuordnung und Ploidieniveaus für 89 Individuen aus 18 Populationen von *Valeriana officinalis* agg.

III.2.4 Wiederholbarkeit der AFLP-Methode

Die Wiederholbarkeit der Methode wurde durch drei (ACA-CAC, ACC-CAG, ACG-CAA, GTC-CTA) und zwei (GTC-CAG, GAC-CAG) unabhängige präparative Ansätze mit den Proben 3_12, 24_19 und 41_20 überprüft. Die AFLP-Primerkombinationen ACA-CAC, ACC-CAG, ACG-CAA ergaben eine 98,5%-ige Wiederholbarkeit der Fingerprint-Analyse. Eine Gesamtanalyse unabhängiger Wiederholungen aller 6 verwendeten Primerkombinationen erreichte 95,8%. Die Einzelwerte lagen bei den sechs untersuchten AFLP-Primerkombinationen zwischen 84,6% und 100% (Tab. 16).

| Gesamtergebnis unabhängige Wiederholbarkeit 6 AFLP-Primer | | | |
|--|------------------------------|--------------------|---------------|
| Allelfrequenz Min. | | 0.3333 | |
| Allelfrequenz Max. | | 1.0000 | |
| MD | | 1.0000 | |
| MW | | 0.9580 | |
| Teilergebnisse Primer ACA-CAC, ACC-CAG, ACG-CAA | | | |
| Allelfrequenz Min. | | 0.6667 | |
| Allelfrequenz Max. | | 1.0000 | |
| MD | | 1.0000 | |
| MW | | 0.9851 | |
| Teilergebnisse Primer GTC-CAG, GTC-CTA, GAC-CAG | | | |
| Allelfrequenz Min. | | 0.3333 | |
| Allelfrequenz Max. | | 1.0000 | |
| MD | | 1.0000 | |
| MW | | 0.9167 | |
| Einzelergebnisse der Primer | | | |
| | Anzahl Wiederholungen | Allelfrequenz Min. | 0.6667 |
| | | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | | MD | 1.0000 |
| Primer ACA-CAC | 3x | MW | 0.9910 |
| | | Allelfrequenz Min. | 1.0000 |
| | | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | | MD | 0.0000 |
| Primer ACC-CAG | 3x | MW | 1.0000 |
| | | Allelfrequenz Min. | 0.6667 |
| | | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | | MD | 1.0000 |
| Primer ACG-CAA | 3x | MW | 0.9583 |
| | | Allelfrequenz Min. | 0.5000 |
| | | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | | MD | 0.2402 |
| Primer GTC-CAG | 2x | MW | 0.8462 |
| | | Allelfrequenz Min. | 0.3333 |
| | | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | | MD | 1.0000 |

| | | | |
|-----------------------|----|--------------------|---------------|
| Primer GTC-CTA | 3x | MW | 0.9583 |
| | | Allelfrequenz Min. | 0.5000 |
| | | Allelfrequenz Max. | 1.0000 |
| | | MD | 1.0000 |
| Primer GAC-CAG | 2x | MW | 0.9333 |

Tabelle 16: Ergebnis von drei bzw. zwei unabhängigen Wiederholungen der AFLP-Methode mit sechs Primern
Allelfrequenz 1.0000 = 100% Übereinstimmung der Wiederholungen pro Locus
MD: Median, MW: Mittelwert

IV Diskussion

Extraktionsmethoden

Die getesteten DNA-Extraktionsmethoden Mach, Quia, PeQ und CTAB zeigten hinsichtlich Quantität und Qualität der DNA unterschiedliche Ergebnisse.

Für sensitive molekularbiologische Methoden ist eine saubere und kontaminationsfreie Nukleinsäure die Grundvoraussetzung. Durch die Anwendung des geeigneten Extraktionsverfahrens muss die nachzuweisende DNA möglichst in hochmolekularer Form und von die nachfolgende Analytik inhibierenden Substanzen befreit vorliegen. Fette, Zucker, Proteine und sekundäre Inhaltsstoffe sind Bestandteile der zellulären Matrix und erschweren die DNA-Extraktion. Chemische und physikalische Parameter (pH-Wert, Temperatur, Enzyme, Scherkräfte) sind ebenfalls für die Qualität der extrahierten DNA entscheidende Faktoren. Hohe Temperaturen und saure pH-Werte führen zu unerwünschter Fragmentierung der DNA. Rückstände von organischen Lösungsmitteln (Phenol, Ethanol), Enzyme, Proteine oder Salze können zur Inhibition der PCR führen. Die differenzierten Resultate der einzelnen Verfahren weisen darauf hin, dass es sinnvoll ist, die Extraktionsmethode dem Versuchsobjekt anzupassen.

Im Versuch erwiesen sich die Methoden Mach, Quia und CTAB als für das *Valeriana officinalis* Aggregat funktionierend. Für die Auswahl sind neben den Faktoren Qualität und Quantität nicht zuletzt auch das Laborprotokoll sowie Kostenfaktoren entscheidend. Hinsichtlich des Protokolls ist das Produkt Mach aufgrund des schnellen Ablaufes am besten geeignet. Die CTAB-Methode ist besonders aufgrund der hohen Konzentration an DNA interessant, sofern diese die nötige Reinheit aufweist. Es kann etwa die zehnfache DNA-Konzentration der Extraktionskits erreicht werden, was einen Vorteil bei umfangreichen Studien, die Wiederholungen erfordern, bedeutet. Ein Nachteil dieser aufgrund des geringen Materialeinsatzes kostengünstigen Methode ist der etwa 3-fach höhere Zeitaufwand im Labor. Der Extraktionskit Quia kann ebenfalls für *Valeriana officinalis* agg. verwendet werden; das Protokoll ist jedoch etwas aufwändiger. Die Methode PeQ erscheint aufgrund der niedrigen Konzentration und geringen Reinheit der DNA-Proben für diese Artengruppe wenig geeignet.

AFLP-Methode

Die Etablierung der AFLP-Methode mit 6 AFLP-Primerkombinationen wird durch die im Folgetext angeführten Punkte dokumentiert. Funktionelle AFLP-Primerkombinationen sind durch Anzahl, signifikative Verteilung, gleichmäßige Signalintensität der erzielten Marker sowie durch eine hohe Reproduzierbarkeit voneinander unabhängiger Versuchsansätze definiert.

Anzahl und Aussagekräftigkeit der molekularen Marker

Die AFLP-Methode mit 6 ausgewählten Primern ergab mit 312 Banden eine für die Gruppenzuordnung ausreichende und im Vergleich mit anderen Studien zu Populationen von *Valeriana officinalis* agg. an ökologisch differenzierten Standorten (ie.g. Grassi et al., 2004) eine um etwa 30% höhere Anzahl an selektiven molekularen Markern. Die in dem 2D_EUCLID Scatterplot ersichtliche Anordnung aller Individuen in drei Cluster (Abb. 3, Gruppen 1, 2, und 3) spiegelt bei hoher Diversität (97% Polymorphismen) des Probenmaterials eine gleichzeitig geringe genetische Distanzierung der Phänotypen wieder. Die Aufgliederung erfolgt fast ausschließlich in die Ploidieniveaus diploid, tetraploid und oktaploid. Im Gegensatz zu der Studie über *Valeriana wallrothii* Kreyer von Grassi et al. konnte der Etablierungsversuch mit den genannten AFLP-Primerkombinationen klare Populationsstrukturen vorerst nicht aufzeigen. Eine über die Ploidieniveaus hinausgehende Clusterbildung innerhalb der drei Gruppen ist nicht klar erkennbar. Ursprüngliche, klonale Strukturen sind aufgrund der unterschiedlichen Positionen aller einzelnen Individuen nicht nachvollziehbar. Eine evolutive Entwicklung durch Hybridisierung erscheint, da mit 82 % (2x in 4x), 79 % (2x in 8x) und 85 % (4x in 8x) eine hohe Anzahl von Banden unterschiedlichen Ploidiestufen gemeinsam ist, möglich. Dieses hohe Maß an Übereinstimmung deutet eine über einen langen Zeitraum stattfindende Entwicklung mit eingeschränktem Genfluss an. Die Zusammensetzung der aufeinandertreffenden Komponenten kann dabei nicht bestimmt werden. Da die diploide Gruppe nicht weiter differenziert werden konnten und auch keine zweite diploide Art von *Valeriana* an den Sammelstandorten bekannt ist, bleiben der Schritt zur Tetraploidie und daraus folgend auch die Entwicklung zum oktaploiden Zytotyp unklar.

Reproduzierbarkeit der Methode

In Abhängigkeit von der stringenten Durchführung aller Teilschritte ist die Methode unter Verwendung ausgewählter Primerkombinationen zu einem hohen Prozentsatz – die Maxima der Wiederholbarkeit der leistungsfähigsten Primerkombinationen liegen zwischen 99% und 100% - in unabhängigen Ansätzen reproduzierbar. Die während der Testanalysen erzielten Fehlerquoten einzelner Primerkombinationen lagen in einem Bereich zwischen 15% und 0% (Tab. 15). Dieses Spektrum weist bereits auf Herausforderungen bei der Umsetzung der AFLP-Methode hin. Als potentielle Störfaktoren gelten neben DNA-Verunreinigungen schwankende Parameter der Reaktionsabläufe und Fehler bei der Markerbestimmung (*scoring error*) (Bonin, A. 2004). Die von Bonin et al. für die AFLP-Methode kommunizierte Fehlerrate von 5% wurde unter Anwendung der 6 Kombinationen ACA-CAC, ACC-CAG, ACG-CAA, GTC-CAG, GTC-CTA, GAC-CAG bei unabhängigen Repetitionen mit 4,2%, bei Analyse der parallel ablaufenden Reaktionen der Replikate 1,1% positiv unterschritten. Daraus folgt, dass diese AFLP-Primerkombinationen für weitere Analysen geeignet sind. Eine Verringerung der Fehlerquote auf 2,0% wird erreicht, wenn für weitere AFLP-Analysen ausschließlich die vier Kombinationen ACA-CAC, ACC-CAG, ACG-CAA, GTC-CTA verwendet werden. Die Anzahl der Loci würde dann für die genannten 89 Individuen 203 betragen.

Die AFLP-Analyse des *Valeriana officinalis* Aggregates kann mit einer höheren Probenanzahl, die in biostatistisch relevanter Relation zur Anzahl möglicher zu erzielender Marker stehen muss, mit jenen Primerkombinationen, die sowohl unabhängig als auch parallel repliziert, die geringsten Fehlerraten aufwiesen, fortgesetzt werden.

Abgrenzung von Kleingruppen und Populationen, evolutionäre Entwicklung

Die vorliegende Partialanalyse des Gesamtmaterials konnte zwar alle Individuen einzeln identifizieren, die genetische Entwicklung der 18 Populationen des *Valeriana officinalis* Artkomplexes wird innerhalb der drei Cluster der 2D_EUCLID Darstellung jedoch nicht eindeutig charakterisiert. Eine Differenzierung, die den ökologischen, morphologischen oder geographischen Grundlagen der analysierten Populationen

entsprechen könnte, wurde vermutet, ist an den AFLP-Ergebnissen nicht abzulesen. Individuen der diploiden Populationen 3 und 49, deren Vorkommen sowohl geographisch als auch ökologisch distanziert ist, liegen in einem Cluster vor, was auf geringe genetische Differenzierung zwischen diesen Populationen schließen lässt. Nach Grassi et al. können anthropogene Einflüsse die Ursache für eine geringe genetische Isolation von Populationen bedeuten (Grassi, F. et al. 2004). Da die analysierten Populationen nicht eindeutig voneinander abgegrenzt wurden, ist die evolutionäre Entwicklung der unterschiedlichen Kleingruppen und die Entstehung der Ploidiestufen anhand des vorliegenden Datenmaterials nicht nachvollziehbar.

Ausblick

Da es sich hier um eine Studie mit geringem Probenumfang handelt, müssen diese Resultate nicht als endgültig angesehen werden. Trotz der unklaren Aussage hinsichtlich der Kleinarten und Populationen können AFLP-Marker eine wertvolle phylogenetische Informationsquelle unter nahe verwandten Taxa sein, da Gruppierungen, die genetische Muster in Form von Ploidiestufen reflektieren, aufgezeigt wurden.

Die Ergebnisse bieten die Anleitung für die Fortsetzung der molekularbiologischen Analyse mit ausgewählten AFLP-Primerkombinationen. Eine Erweiterung der Perspektive könnte durch die Untersuchung einer größeren Anzahl von Individuen und Populationen erreicht werden. Die Kombination eines umfassenderen AFLP-Datensatzes mit den Daten weiterer im Projekt angewandter biometrischer Methoden wie Morphometrie, Durchfluss-Zytometrie und Chromosomenzählung und deren statistische Auswertung durch eine multivariate Datenanalyse kann möglicherweise zu neuen Erkenntnissen in der Systematik von *Valeriana officinalis* agg. führen.

In weiterer Folge könnten neue taxonomische Ergebnisse zur Konkretisierung der Anwendungsmöglichkeiten von *Valerianae radix* in der Pharmazie beitragen. Im Fall einer möglichen Zuordnung bestimmter Phänotypen zu Gruppen können diese analysiert, anhand spezifischer Qualitäten charakterisiert, und sofern diese Qualitäten als Vorteil erkennbar sind (Resistenz, Konzentration der Sekundärmetaboliten, größere ökologische Plastizität), in der Nutzpflanzenzüchtung zur Anwendung kommen.

V Zusammenfassung

Die Systematik des heterogenen *Valeriana officinalis* Aggregates ist gegenwärtig nicht eindeutig aufgeklärt. Die Aufgliederung des Taxons in zahlreiche Unterarten bzw. Kleinarten basiert auf einem natürlichen 'Typenkonzept', dem Datensätze unvollendeter morphologischer und karyologischer Untersuchungen zugrunde liegen. 2008 wurde demnach ein Forschungsprojekt mit der Zielsetzung, die Taxonomie und die evolutive Entwicklung der Artengruppe zu definieren, initiiert. Die Grundlage multivariater Analysen wird Pflanzenmaterial aus 82 Populationen (1618 Individuen) von *Valeriana officinalis* agg., die in Vorarlberg, Tirol (Nord-, Südtirol), Bayern, Schweiz und Niederösterreich gesammelt werden, sein. Die interdisziplinäre Ausrichtung des Projektes ist durch die gleichwertige Anwendung etablierter Methoden wie Durchfluss-Zytometrie, Chromosomenzählung, Morphometrie, Vegetationsanalyse und molekularbiologischer Methoden wie e.g. AFLP charakterisiert.

Die Aufgabe dieser Diplomarbeit war die Etablierung der AFLP-Methode für die Artengruppe sowie deren Erprobung mit 89 Individuen aus 18 Populationen, die einen Teil des 2009 bereits vorhandenen Pflanzenmaterials von 50 Populationen (je 20 Individuen) und 88 Einzelpflanzen darstellten. Das Ergebnis sollte eine Evaluierung dieses Verfahrens hinsichtlich der Anwendung für das Gesamtprojekt ermöglichen.

In einem Screening wurden zwölf AFLP-Primerkombinationen mit sieben Individuen unterschiedlicher Ploidiestufen hinsichtlich Variabilität und Qualität der detektierten Banden getestet. Drei Primerkombinationen wurden ausgewählt und eine Reproduzierbarkeit der Phänotypen mit dem Ergebnis von max. 98,5 % bestimmt. Diese Kombinationen und drei weitere, vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft erhaltene, wurden für die AFLP-Analyse von 89 Individuen unterschiedlichen Zytotyps aus 18 Populationen verwendet. Mit sechs Primerpaaren wurden 312 DNA-Banden generiert, von denen 99,7% polymorph und 0,3% monomorph waren. Die unabhängige Wiederholbarkeit der 6 Primerkombinationen erreichte 95,8 % die der parallelen Replikate 98,9%. Der mit dem dem 2D_EUCLID Distanz-Algorithmus nach Saukel (Saukel, J. et al. 2004) generierte Scatterplot ergab eine Auftrennung der Akzessionen in drei Gruppen, die weitgehend den, für dieselben Individuen mit anderen Verfahren festgestellten, bekannten

Ploidiestufen diploid, tetraploid und oktaploid entsprach. Die molekularen Daten zeigten vorwiegend eine genetische Struktur, die sich in der zytologischen Differenzierung in unterschiedliche Ploidieniveaus manifestierte, auf. Eine darüber hinausreichende genetische Charakterisierung der Phänotypen war in der aktuellen Studie nicht erkennbar. Sie kann möglicherweise durch die Analyse der Gesamtheit des Pflanzenmaterials unter Verwendung der AFLP-Primerkombinationen, die die geringste Fehlerrate bei unabhängiger Wiederholung aufwies, erzielt werden. Die Differenzierungen genetischer Muster aller Populationen können hinsichtlich Übereinstimmung oder Divergenz mit den Ergebnissen morphometrischer und weiterer in dem Projekt angewandter Methoden verglichen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass daraus resultierend, neue Informationen in die Taxonomie von *Valeriana officinalis* agg. einfließen werden.

VI Summary

The systematics of heterogeneous *Valeriana officinalis* aggregate are not clearly understood at present. The categorization of the taxon in numerous subspecies or small species is based on a natural "type concept," whose records are based on incomplete morphological and karyological analysis. Therefore a research project was initiated in 2008 with the objective of defining the taxonomy and evolutionary development of the group of species. The basis of multivariate analysis will be plant material from 82 populations (1618 Individuals) of *Valeriana officinalis* agg., which will be collected in Vorarlberg, Tyrol (North, South Tyrol), Bavaria, Switzerland and Lower Austria. The interdisciplinary orientation of the project is characterized by the equivalent application of established methods such as flow cytometry, chromosome count, morphometrics, vegetation analysis and molecular biological methods such as AFLP (Applied Fragment Length Polymorphism).

The task of this thesis was the establishment of the AFLP method for the group of species and their testing with part of the plant material from 2009 which consisted of 50 populations (20 individuals each) and 88 single plants. The result should enable an evaluation of this procedure in application to the overall project in the future.

Twelve AFLP-primer combinations with seven individuals, of different ploidy levels have been tested in a screening with regards to variability and quality of the detected bands. Three primer combinations were selected and a reproducibility of phenotype resulting in 98.5 % was determined. These combinations and three more, which were received from the Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft, were used for AFLP analysis of 89 individuals representing different cytotypes of 18 populations. With 6 primer combinations pairs 312 DNA bands were generated of which 99.7 % were polymorphic and 0.3 % monomorphic. The independent reproducibility of 6 primer combinations resulted in 95.8 %, parallel reactions of replicates 98.9 %. The 2D_Scatterplot based on the distance matrix which was computed using the 2D_EUCLID algorithm by Saukel (Saukel, J. et al. 2004) showed a separation of the accessions in 3 groups, which largely corresponded to the results of other measurements of the individuals well-known ploidy levels: diploid, tetraploid and octoploid. The molecular data illustrated a genetic

structure that manifested in cytological differentiation into discrete ploidy levels. A wider genetic characterization of phenotypes was not recognizable in the current study. However, this could be achieved by analyzing the complete plant material, i.e. by conducting the study with a greater number of samples using the 3-4 AFLP-primer combinations which had the lowest error rate for independent repetition. The differentiations of genetic patterns of all populations can be compared with respect to conformity or divergence with the differentiations of morphometrical and all further methods which are applied in the project. There is the possibility that as a result, new information will enrich the taxonomy of *Valeriana officinalis* agg.

Literaturverzeichnis

Printmedien

- Akkaya, M. S.; Bhagwat, A. A.; Cregan, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, *Genetics* 132: S. 1131-1139.
- Albertin, W.; Balliau, T.; Brabant, P.; Chevre, A.-M.; Eber, F.; Malosse, C.; Thiellement, H. 2007. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* 173: S. 1101-1113.
- Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): S. 796-815.
- Arber, W. & Linn, S. 1969. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry* 38: S. 467-500.
- Bonacum, J.; Stark, J.; Bonwich, E. In DeSalle, R.; Giribet, G.; Wheeler, W. (eds.) 2001. *Techniques in molecular systematics and evolution*. Birkhäuser Verlag: S. 322.
- Bonin A.; Bellemain, E.; Bronken Eidesen P.; Pompanon F.; Brochmann C.; Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Molec. Ecol.* 13: S.3261-3273.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davies R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: S. 314-331.
- Bos, R.; Woerdenbag, H.J.; Hendriks, H.; Scheffer, J. J. 1997. Composition of the essential oils from underground parts of *Valeriana officinalis* L. s.l. and several closely related taxa. *Flavour and Fragrance Journal* 12 (5): S. 359-370
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; van Putten, F. M.; Hendriks H.; Scheffer, J. J. 1998. Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta medica* 64(2): S. 143-147.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Pras, N. 2002. Determination of valepotriates. *Journal of Chromatography A* 967(1): S. 131-146
- Chase, M. W. & Hills, H. H. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: S. 215-220.

-
- Chen, Z. J. 2007. Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58: S. 377-406.
- Chen, Z. J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15(2): S. 57-71.
- Chien, A. ; Edgar, D. B.; Trela, J. M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 127(3): S. 1550-1557.
- Clausen, J.; Keck, D.D.; Hiesey, W. M. 1945. II. Plant evolution through amphiploidy and autopolloidy, with examples from the Madiinae. Carnegie Institute of Washington, Pub. 564.
- Cline, J.; Jeffery C. Braman, J. C.; Hogrefe, H. H. 1996. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24(18): S. 3546-3551.
- Coen, E.; Strachan, T.; Dover, G. J. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *Mol. Biol.* 158(1): S. 17-35.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. . 2004. Speciation. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, MA 1. Aufl.(13): S. 322-324.
- Danna, K. & Nathans, D. 1971. Specific changes of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Sciences* 68, S. 2913-2917.
- Darlington, C. D. 1963. Chromosome botany, and the origins of cultivated plants. New York, Hafner Pub. Co., 2. Auflage: S. 101.
- Davis, J. I.; Stevenson, D. W.; Petersen, G.; Seberg, O.; Campbell, L. M.; Freudenstein, J. V.; Goldman, D. H.; Hardy, Ch. R.; Michelangeli, F. A.; Simmons, M. P.; Specht C. D.; Vergara-Silva, F.; Gandolfo, M. 2004. A Phylogeny of the Monocots, as Inferred from *rbcL* and *atpA* Sequence Variation, and a Comparison of Methods for Calculating Jackknife and Bootstrap Values. *Systematic Botany* 29(3): S. 467-510.
- Dobeš, Ch. & Vitek, E. 2000. Documented Chromosome Number, Checklist of Austrian Vascular Plants. Verlag des Naturhistorischen Museums Wien. 1: S. 298, 301.
- Don, R. H.; Cox, P. T.; Wainwright, B. J.; Baker, K.; Mattick, J.S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19(14): S. 408.
- Doyle, J. J. 1991. DNA protocols for plants. G. Hewitt, A. W. B. Johnson, and J. P. W. Young (eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series H, Cell Biology 57: S. 283-293.
-

- Doyle, J. J. & Dickson, E. E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36: S. 715-722.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: S. 11-15.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: S. 13-15.
- Doyle, J. J.; Flagel, L. E.; Paterson, A. H.; Rapp, R. A.; Soltis, D.; Soltis, P.; Wendel, J. F. 2008. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics* 42: S. 443–461.
- Europäisches Arzneibuch, Verlag Österreich GmbH, Ph. Eur. 7.0: S. 1753.
- Fischer, M. A. A.; Oswald, K.; Adler, W. 2008. Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, 3. Aufl.: S. 795-797.
- Frohne, D. & Jensen, Uwe 1998. Systematik des Pflanzenreichs: unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 5. Aufl.: S. 266-268.
- Gallardo, M. H.; González, C. A.; Cebrián, I. 2006. Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Genomics* 88 (2): S. 214-221.
- Goff, S. A.; Ricke, D.; Lan, T. H.; Presting, G.; Wang, R.; Dunn, M.; Glazebrook, J.; Sessions, A.; Oeller, P.; Varma, H.; Hadley, D.; Hutchison, D.; Martin, C.; Katagiri, F.; Lange, B. M.; Moughamer, T.; Xia, Y.; Budworth, P.; Zhong, J.; Miguel, T.; Paszkowski, U.; Zhang, S.; Colbert, M.; Sun, W. L.; Chen, L.; Cooper, B.; Park, S.; Wood, T. C.; Mao, L.; Quail, P.; Wing, R.; Dean, R.; Yu, Y.; Zharkikh, A.; Shen, R.; Sahasrabudhe, S.; Thomas, A.; Cannings, R.; Gutin, A.; Pruss, D.; Reid, J.; Tavtigian, S.; Mitchell, J.; Eldredge, G.; Scholl, T.; Miller, R. M.; Bhatnagar, S.; Adey, N.; Rubano, T.; Tusneem, N.; Robinson, R.; Feldhaus, J.; Macalima, T.; Oliphant, A.; Briggs, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296(5565): S. 92-100.
- Gottschalk, Werner 1971. Die Bedeutung der Genmutationen für die Evolution der Pflanzen. Fischer Verlag, Stuttgart, Band VII, 296 S. B: S. 4-5.
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York, 23: S. 300
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York, 23: S. 322
- Grassi, F.; Imazio, S.; Gomarasca, S.; Citterio, S.; Aina, R.; Sgorbati, S.; Sala, F.; Patrignani, G.; Labra, M. 2004. Population Structure and genetic variation within *Valeriana wallrothii* Kreyer in relation to different ecological locations. *Plant Science* 166: S. 1437-1441.

- Hänsel, R.; Sticher, O. 2007. *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. Springer Verlag, Heidelberg, 8. Aufl.: S. 838-845.
- Hegarty M. J. & Hiscock S. J. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Elsevier Ltd. Current Biology* 18(10): S. 435-444.
- Helentjaris, T.; King, G.; Slocum, M.; Siedenstrang, C.; Wegman, S. 1985. Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5: S. 109-118.
- Helentjaris, T.; Slocum, M.; Wright, S.; Schasfer, A.; Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 72: S. 761-769.
- Hering, S.; Khom, S.; Baburin, I.; Timin, E.; Hohaus, A.; Trauner G.; Kopp, B. 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* 53: S. 178-187.
- Hidalgo, O.; Garnatje, T.; Susanna, A.; Mathez, J. L. 2004. Phylogeny of Valerianaceae based on matK and ITS markers, with reference to matK individual polymorphism. *Annals of Botany* 93: S. 283-293.
- Hillis, D. M. & Davis, S. K. 1988. Ribosomal DNA: Intraspecific Polymorphism, Concerted Evolution, and Phylogeny Reconstruction. *Systematic Zoology*, 37(1): S. 63-66.
- Houghton, P. J. 1999. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: S. 505-512.
- Judd, W. S.; Campbell, Ch. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. 2008. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, MA 3. Aufl.(5): S. 103.
- Khom, S.; Strommer, B.; Ramharter, J.; Schwarz, T.; Schwarzer, C.; Erker, T.; GF Ecker, G. F.; Mulzer, J.; Hering, S. 2010. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABA_A receptor ligands – in vitro and in vivo characterization. *British Journal of Pharmacology* 161: S. 65-78.
- Kimura, M. & Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: S. 725-38.
- Korbie, D. J. & Mattick, J. S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* 3(9): S. 1452-1456.
- Leitch, I. J. & Bennet M. D., 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 12: S. 470-476.
- Leitch, A. R. & Leitch, I. J. 2008. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. *Science* 320(5875): S. 481-483.

- Letchamo, W.; Ward, W.; Heard, B.; Heard, D. 2004. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12): S. 3915-3919.
- Litt, M. & Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene, *Am. J. Hum. Genet.* 44: S. 397-401.
- Liu, B. & Wendel, J. F. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: S. 365-379.
- Levy A. A. & Feldman, M. 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: S. 607-613.
- Lo, Y. M.; Chan, K. C.; Introduction to the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 2006; 336: S. 1-10.
- Manen, J. F.; Sinitsyna, O.; Aeschbach, L.; Markov, A. V.; Sinitsyn, A. A fully automatable enzymatic method for DNA extraction from plant tissues. *BMC Plant Biology* 2005 5: S. 23.
- Meirmans, P. G.; Van Tienderen P. H. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*. 4:S 792–794.
- Meudt, H. M. & Clarke A. C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12 (3): S. 106-17.
- Mitton, J. & Grant, M. C. 1984. Relationships among protein heterozygosity, growth rate, and developmental stability. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: S. 479-499.
- Morgan, R.D. 1988. Mse I, a unique restriction endonuclease from *Micrococcus* species which recognizes 5' TTAA 3'. *Nucleic Acids Res.* 16 (7): S. 3104.
- Morrison, C. & Gannon, F. 1994. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim. Biophys. Acta* 1219: S. 493-498.
- Mueller, U. G.; Wolfenbarger, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 14 (10): S. 389-394.
- Mullis, K. B.; Falloona, F. A.; Scharf, S.; Saiki, R. K.; Horn, G.; Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: S. 263-73.
- Mullis, K. B. & Falloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: S. 335-350.

- Mülhardt, C. 2009. Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. Springer Verlag, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009: S. 84-120
- Müntzing, A. 1937. The effects of chromosomal variation in *Dactylis*. 23(1-2): S. 113-235.
- Nell, M.; Wawrosch, Ch.; Steinkellner, S.; Vierheilig, H.; Kopp B.; Lössl, A.; Franz, Ch.; Novak, J.; Zitterl-Eglseer, K. 2010. Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentrations in *Valeriana officinalis* L. *Planta Med.* 76(4): S. 393-398.
- Nolan, T.; Novak T.; Huggett, J. Taking control of the polymerase chain reaction. In Bustin, S.A. (ed.) 2009. The PCR revolution - Basic technologies and applications. Cambridge University Press. S. 137-139.
- Olsen, K. M. & Schaal, B. A. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO 63130, Communicated by Peter H. Raven, Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: S. 5586-5591. Evolution
- Palmer, J. D. & Herborn, L. A. 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence, *J. Mol. Evol.* 28: 87-97.
- Palmer, J. D. & Zamir, D. 1982. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: S. 5006-5010.
- Parisod, Ch.; Holderegger, R.; Brochmann, Ch. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist Special Issue: Plant polyploidy*, 186 (1): S. 5-17.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: S. 589-639.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998. Pathways, Mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: S. 467-501.
- Robba, L.; J. Russell, S. J.; Barker G. L.; Brodie J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *coxI* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta) *American Journal of Botany* 93: S. 1101-1108.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson A. R.; 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: S. 5463-5467
- Saukel, J.; Anchev, M.; Guo, Y.-P.; Vitkova, A.; Nedelcheva, A.; Goranova, V.; Konakchiev, A.; Lambrou, M.; Nejati, S.; Rauchensteiner, F.; Ehrendorfer, F. 2004 Comments on the biosystematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) in Bulgaria. *Phytol. Balcan.* 9: S. 361-400.
- Schlüter, P. M. & Harris, S. A., 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes* 6: S. 569-572.

- Schnable, P. S.; Ware, D.; Fulton, R. S.; Stein, J. C.; Wei, F.; Pasternak, S.; Liang, Ch.; Zhang, J.; Fulton, L.; Graves, T. A.; Minx, P.; Reily, A. D.; Courtney, L.; Kruchowski, S. S.; Tomlinson, Ch.; Strong, C.; Delehaunty, K.; Fronick, C.; Courtney, B.; Rock, S. M.; Belter, E.; Du, F.; Kim, K.; Abbott, R. M.; Cotton, M.; Levy, A.; Marchetto, P.; Ochoa, K.; Jackson, S. M.; Gillam, B.; Chen, W.; Yan, L.; Higginbotham, J.; Cardenas, M.; Waligorski, J.; Applebaum, E.; Phelps, L.; Falcone, J.; Kanchi, K.; Thane, T.; Scimone, A.; Thane, N.; Henke, J.; Wang, T.; Ruppert, J.; Shah, N.; Rotter, K.; Hodges, J.; Ingenthron, E.; Cordes, M.; Kohlberg, S.; Sgro, J.; Delgado, B.; Mead, K.; Chinwalla, A.; Leonard, S.; Crouse, K.; Collura, K.; Kudrna, D.; Currie, J.; He, R.; Angelova, A.; Rajasekar, S.; Mueller, T.; Lomeli, R.; Scara, G.; Ko, A.; Delaney, K.; Wissotski, M.; Lopez, G.; Campos, D.; Braidotti, M.; Ashley, E.; Golser, W.; Kim, H. R.; Lee, S.; Lin, J.; Dujmic, Z.; Kim, W.; Talag, J.; Zuccolo, A.; Fan, Ch.; Sebastian, A.; Kramer, M.; Spiegel, L.; Nascimento, L.; Zutavern, T.; Miller, B.; Ambroise, C.; Muller, S.; Spooner, W.; Narechania, A.; Ren, L.; Wei, S.; Kumari, S.; Faga, B.; Levy, M. J.; McMahan, L.; Van Buren, P.; Vaughn, M. W.; Ying, K.; Yeh, Ch.-T.; Emrich, S. J.; Jia, Y.; Kalyanaraman, A.; Hsia, A.-P.; Barbazuk, B. W.; Baucom, R. S.; Brutnell, T. P.; Carpita, N. C.; Chaparro, C.; Chia, J.-M.; Deragon, J.-M.; Estill, J. C.; Fu, Y.; Jeddelloh, J. A.; Han, Y.; Lee, H.; Li, P.; Lisch, D. R.; Liu, S.; Liu, Z.; Nagel, D. H.; McCann, M. C.; SanMiguel, P.; Myers, A. M.; Nettleton, D.; Nguyen, J.; Penning, B. W.; Ponnala, L.; Schneider, K. L.; Schwartz, D. C.; Sharma, A.; Soderlund, C.; Springer, N. M.; Sun, Q.; Wang, H.; Waterman, M.; Westerman, R.; Wolfgruber, T. K.; Yang, L.; Yu, Y.; Zhang, L.; Zhou, S.; Zhu, Q.; Bennetzen, J. L.; Dawe, R. K.; Jiang, J.; Jiang, N.; Presting, G. G.; Wessler, S. R.; Aluru, S.; Martienssen, R. A.; Clifton, S. W.; McCombie, W. R.; Wing, R. A.; Wilson, R. K. 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 326(5956): S. 1112-1115
- Schönswetter, P.; Suda, J.; Popp, M.; Weiss-Schneeweiss, H.; Brochmann, C. 2006. Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. *Molecular phylogenetics and evolution* 42: S. 92-103.
- Seidenberger (Schürmer), R. 2004. Untersuchungen zur genetischen Diversität bei *Mentha* L. und *Valeriana officinalis* L. mit Hilfe von AFLP-Markern. Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät.
- Small, R. L.; Cronn, R. C.; Wendel, J. F. 2002. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany* 17(2): S. 145-170.
- Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the
- Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(13): S. 7051-7057.
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Zanis, M. J. 2002. Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. *American Journal of Botany* 89(10): S. 1670-81.

- Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Schemske, D. W.; Hancock, J. F.; Thompson, N.; Husband, B. C.; Judd, W. S. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56 (1): S. 13-20.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Ewald Arnold, London VI: S.185
- Stupar, R. M.; Albertin, W.; Brabant, P.; Catrice, O.; Eber, F.; Jenczewski, E.; Chevre A. M.; Thiellement, H. 2005. Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics* 5: S. 2131-2139.
- Stupar, R. M.; Bhaskar, P. B.; Yandell B. SS; Rensink W. A.; Hart A. L.; Ouyang, S.; Veilleux, R. E.; Busse J. S.; Erhardt, R. J.; Buell C. R. 2007. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: S. 2055-2067.
- Tate, J. A.; Soltis, D. E.; Soltis, P. S. 2005. Polyploidy in plants. In T. Ryan Gregory (ed.). *The evolution of the genome*. Elsevier Inc., 1. Aufl.: S. 380.
- Tautz D. & Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12(10): S. 4127-4138.
- Thermo Scientific, US 2008. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer user manual v3-2.7. 3: S. 1.
- Thermo Scientific, US 2008. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer user manual v3-2.7. 19: S. 2.
- Titz, W. 1969. Beitrag zur Kenntnis der österreichischen Sippen des *Valeriana officinalis*-Aggregats und ihrer Chromosomenzahlen. *Österr.Bot. Z.* 116: S. 172-180.
- Titz, E. 1984. Die Arzneibaldriane Deutschlands mit besonderer Berücksichtigung Bayerns. *Ber. Bayer. Bot. Ges.* 55: S. 25-48.
- Titz, W. 1984. Morphometrische Studien an *Valeriana officinalis* s.l., II. Ordination durch Diskriminanzanalyse. *Botanica Helvetica* 94: S. 67-81
- Titz, W. & Titz, E. 1979. „*Valeriana versifolia*“ und andere oktoploide Arznei-Baldriane in den Schweizer Alpen und angrenzenden Regionen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* Vol. 89 (3/4): S. 251-277.
- Titz, W. & Titz, E. 1980. Die Arzneibaldriane Vorarlbergs und Liechtensteins. *Jahrb. des Vorarlberger Landesmuseumsvereins* 1980/81: S. 203-213.
- Titz, E. & Titz, W. 1981. Die diploiden und tetraploiden Arznei-Baldriane der Schweiz & angrenzender Regionen (Valerianaceae). *Botanica Helvetica* 91: S. 169-188.

- Titz, W. & Titz, E. 1982. Analyse der Formenmannigfaltigkeit der *Valeriana officinalis*-Gruppe im zentralen und südlichen Europa. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 95: S. 155-164.
- Titz, W.; Timischl, W.; Titz, E. 1983. Morphometrische Studien an *Valeriana officinalis* s.l., Auswahl, Analyse und Aufbereitung der Merkmale. Pl. Syst. Evol. 141: S. 313-319.
- Tousi, L., S. E.; Radjabian, T.; Ebrahimzadeh, H.; Niknam, V. Enhanced production of valerenic acids and valepotriates by in vitro cultures of *Valeriana officinalis*, 2010. International Journal of Plant Production 4(3): S. 209-221.
- Trauner, G.; Khom, S.; Baburin, I.; Benedek, B.; Hering, S.; Kopp, B. 2007. Modulation of GABA_A receptors by Valerian extracts is related to the content of Valerenic Acid, *Planta Med* 2008 74: S. 19-24.
- Valpiani, C. 1995. *Valeriana officinalis*. Journal of the Australian Traditional Medicine Society 1(2): S. 57-62.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Lee, Th. van der; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* 23 (21): S. 4407-4414.
- Vuylsteke, M.; Mank, R.; Antonise, R.; Bastiaans, E.; Senior, M.L.; Stuber, C.W., Melchinger, A.E.; Lübberstedt, X.X.C.; Stam, P.; Zabeau, M.; Kuiper, M. 1999 Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: S. 921-93
- Weberling, F. 1961. Die Infloreszenzen der Valerianaceen und ihre systematische Bedeutung. Steiner Verlag Wiesbaden: S. 51-77.
- Wendel, J. F. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42(1): S. 225-249.
- Weising, K.; Winter, P.; Hüttel, B.; Kahl, G. 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. *J. Crop Prod.* 1: S. 113-143.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants : principles, methods, and applications. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton 2. Aufl.: S. 235-275.
- Wichtl, M. (ed.) 2009. Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 5. Aufl.: S. 692
- Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22): S. 6531-6535.

Wolfe, K. H.; Li, W. H.; Sharp, P. M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (24), 9054–9058.

Wong, G. K.-S.; Passey, D. A.; Huang, Y.-Z.; Yang Z.; Yu, J. 2000. Is “Junk” DNA Mostly Intron DNA? Genome Res. 10(11): S. 1672-1678.

Zabeau, M & Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.

Internetquellen

University of Leicester - Making an Agarose Gel
<http://www.youtube.com/watch?v=wXiiTW3pflM>

University of Leicester - Running an Agarose Gel
http://www.youtube.com/watch?v=U2-5ukpKg_Q&feature=relmfu

Fegredo, D. 2006. Kapillarelektrophorese
<http://www.biocompare.com/Articles/ProductReview/395/Applied-Biosystems-3130-and-3130xl-Genetic-Analyzers.html>

Schmitz, O. J. 2010
<http://www.kapillarelektrophorese.de>

Wolf Lab 2000. PCR Protocol Pre-Amplification
http://bioweb.usu.edu/wolf/aflp_protocol.htm

Software Genographer, Version 1.6., ©Montana State University 1998
<http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>

Anhang

Auflistung aller analysierten Individuen_Populationen, Standortbeschreibung, SammlerIn und Sammeldatum

| POP | BGRD | °N | GRD | °E | MEHÖ m | LD | BDLD | ORT | Standort Beschreibung | SammlerIn | Datum |
|-----|----------|----------|------|----|-----------|----------------------|------|-----|---|-------------------|---------|
| 1 | 48,27224 | 10,75058 | 515 | D | BY | Burgwalden | | | Südlich Burghausen, Anghauser Tal, Wegrand und Bachufer | VKLA | 1/5/09 |
| 3 | 47,48701 | 9,6261 | 399 | Ö | VB | Höchst | | | ca. 1,7 km N Höchst; Seestraße immer weiter fahren bis zu Sumpfwiesen rechts und links der Straße | VKLA | 2/7/09 |
| 5 | 47,28749 | 11,01075 | 629 | Ö | NT | Thannrain | | | zwischen Fichtenwaldrand und B 171/ Inntal-Radweg, ca. 50 km W des Gasthofes Hirschen /Tenne Stams) | VKLA | 11/7/09 |
| 6 | 47,18667 | 10,6421 | 740 | Ö | NT | Starkenbach | | | rechtes Innufer, Feldweg zwischen Bahnlinie und Inn; S von Starkenbach; teils trockene Abschnitte mit Pinus, Orchis; Baldrian in den feuchteren Abschnitten | VKLA | 11/7/09 |
| 11 | 47,17512 | 9,7655 | 539 | Ö | VB | Ludesch | | | Ludesch; Gewerbegebiet Richtung Bahnhof, Zementwerkstraße (gesperrt), unter der Bahn durch bis zur Gerichtseiche, durch Fichtenschonung ans Ill-Ufer, Weidengebüsch an der Uferböschung zwischen Radweg und Ill | VKLA, CHD, SBR | 27/7/09 |
| 14 | 47,07675 | 10,65248 | 1195 | Ö | NT | Ladis | | | Burgberg Schloss Laudegg, Ponyweider vom Haus Zwingerhof, NW-Hang | VKLA, CHD, SBR | 29/7/09 |
| 18 | 47,13949 | 10,17025 | 1619 | Ö | NT | Stuben am Arlberg | | | Arlberg-Bundesstraße von St.Christoph Richtung Zürs/Lech, ca. 400 m nach der Abzweigung rechts am Hang | VKLA, CHD, SBR | 30/7/09 |
| 22 | 46,95932 | 10,56531 | 1357 | Ö | NT | Nauders | | | südliches Ortsende Nauders, Böschung rechte Straßenseite ortsauswärts, gegenüber Hotel Erika | CHD, SBR | 1/8/09 |
| 24 | 46,9104 | 10,4955 | 1195 | Ö | NT | Nauders | | | Straße von Pfunds nach Nauders, kurz nach der Festung Finstermünz links, Müllablagerplatz der Gemeinde Nauders | VKLA, SBR | 1/8/09 |
| 29 | 47,25878 | 10,77456 | 785 | Ö | NT | Tarrenz | | | Oberes Ende des "Stausees" bei der "Knappenwelt Gurglbach", Gurglbachufer und Altwasserufer gleich NO der Brücke in Richtung Heilquelle | VKLA, SBR | 5/8/09 |
| 30 | 47,07703 | 10,95686 | 111 | Ö | NT | Längenfeld | | | Auwald der Ötztaler Ache flussaufwärts dem Wasserkraftwerk Längenfeld, | VKLA, SBR | 6/8/09 |

| POP | BGRD | °NLGRD | °E MEHÖ | LD | BDLD | ORT | Standort Beschreibung | SammlerIn | Datum |
|-----|----------|----------|---------|----|------|-------------------------|--|-----------|---------|
| | | | m | | | | an der Straße von Unterlängenfeld nach Oberried, linkes Ufer | | |
| 32 | 47,06856 | 10,84496 | 1351 | Ö | NT | St. Leonhard im Pitztal | Uferbereich und Wiese zwischen Eggenstall und St. Leonhard | VKLA, SBR | 7/8/09 |
| 34 | 47,42883 | 10,77768 | 1033 | Ö | NT | Bichlbach | Zwischen Bichlbach und Heiterwang, ca. 1 km nach Bichlbach; gleich nach der Brücke über den Grundbach rechts Richtung Sessellift | VKLA, SBR | 13/8/09 |
| 36 | 47,53163 | 9,93567 | 1001 | Ö | VB | Lindenschwend | Lindenschwend bis ganz nach hinten fahren, Feldweg rechts hoch zu dem Bienenhaus, entlang am Bach | VKLA, SBR | 14/8/09 |
| 39 | 47,25313 | 10,3231 | 1095 | Ö | NT | Walchen | Lechauen-Radweg auf der linken Lechseite (in Fließrichtung), zwischen Walchen und Hägerau | VKLA, SBR | 15/8/09 |
| 41 | 47,10666 | 11,60874 | 1612 | Ö | NT | Kasern im Schmirntal | Schragerbach-Ufer von Gasthaus Kasern bis Zusammenfluss mit Kasererbach | VKLA, AF | 18/8/09 |
| 42 | 47,08596 | 11,44603 | 1094 | Ö | NT | Steinach am Brenner | Wiesenweg von Steinach nach Gschnitz, Gschnitzufer | VKLA, AF | 18/8/09 |
| 46 | 47,15993 | 11,3677 | 902 | Ö | NT | Mieders | Von Schönberg Richtung Telfes Ruderalfläche links vor der Abfahrt Telfes, in der Nähe der Müllablagerungsfläche | VKLA, AF | 21/8/09 |
| 49 | 48,6106 | 16,42525 | 238 | Ö | NÖ | Zwentendorf | Radweg entlang der Zaya in Richtung Wenzerdorf, beiderseits auf dem Damm, Mähwiese | VKLA, AF | 7/9/09 |

Abkürzungen:

AF Alice Fischer
 BGRD Breitengrad
 BY Bayern
 CHD Christoph Dobeš
 D Deutschland
 Ind. Individuen
 LD Land
 LGRD Längengrad

MEHÖ Meereshöhe
 NÖ Niederösterreich
 NT Nordtirol
 Ö Österreich
 Pop. Population
 SBR Sabine Bressler
 VB Vorarlberg
 VKLA Valerie Klatter-Asselmeyer

Populationen_Individuen

| Analysierte Populationen_Individuen | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| 1_10 | 24_13 | 34_18 | 46_2 |
| 1_2 | 24_17 | 34_7 | 46_5 |
| 1_3 | 24_19 | 36_11 | 46_6 |
| 1_4 | 24_2 | 36_16 | 49_10 |
| 1_5 | 24_4 | 36_4 | 49_15 |
| 11_12 | 29_11 | 36_5 | 49_20 |
| 11_13 | 29_15 | 36_7 | 49_4 |
| 11_3 | 29_18 | 39_1 | 49_9 |
| 11_4 | 29_19 | 39_13 | 5_1 |
| 11_7 | 29_4 | 39_20 | 5_16 |
| 14_10 | 3_12 | 39_3 | 5_19 |
| 14_17 | 3_16 | 39_5 | 5_5 |
| 14_6 | 3_17 | 41_06 | 5_6 |
| 14_8 | 3_5 | 41_12 | 6_11 |
| 18_1 | 3_8 | 41_16 | 6_12 |
| 18_11 | 30_14 | 41_18 | 6_4 |
| 18_3 | 32_11 | 41_20 | 6_7 |
| 18_5 | 32_13 | 42_1 | 6_9 |
| 18_8 | 32_14 | 42_11 | |
| 22_2 | 32_15 | 42_2 | |
| 22_3 | 32_8 | 42_3 | |
| 22_5 | 34_13 | 42_9 | |
| 22_7 | 34_14 | 46_15 | |
| 22_9 | 34_16 | 46_18 | |

AFLP-Marker

| Locus NR. | Primer | Anzahl Basenpaare |
|------------------|----------------|--------------------------|
| 1 | ACA-CAC | 112 |
| 2 | | 126 |
| 3 | | 127 |
| 4 | | 130 |
| 5 | | 132 |
| 6 | | 134 |
| 7 | | 135 |
| 8 | | 136 |
| 9 | | 149 |
| 10 | | 151 |
| 11 | | 153 |
| 12 | | 154 |
| 13 | | 157 |
| 14 | | 158 |
| 15 | | 160 |
| 16 | | 169 |
| 17 | | 171 |
| 18 | | 190 |
| 19 | | 192 |
| 20 | | 194 |
| 21 | | 198 |
| 22 | | 203 |
| 23 | | 214 |
| 24 | | 220 |
| 25 | | 226 |
| 26 | | 229 |
| 27 | | 232 |
| 28 | | 245 |
| 29 | | 246 |
| 30 | | 256 |
| 31 | | 258 |
| 32 | | 259 |

| | | |
|----|--|-----|
| 33 | | 261 |
| 34 | | 273 |
| 35 | | 275 |
| 36 | | 277 |
| 37 | | 286 |
| 38 | | 288 |
| 39 | | 290 |
| 40 | | 292 |
| 41 | | 295 |
| 42 | | 300 |
| 43 | | 302 |
| 44 | | 308 |
| 45 | | 315 |
| 46 | | 322 |
| 47 | | 323 |
| 48 | | 327 |
| 49 | | 332 |
| 50 | | 333 |
| 51 | | 336 |
| 52 | | 337 |
| 53 | | 339 |
| 54 | | 344 |
| 55 | | 348 |
| 56 | | 350 |
| 57 | | 351 |
| 58 | | 352 |
| 59 | | 360 |
| 60 | | 366 |
| 61 | | 367 |
| 62 | | 369 |
| 63 | | 390 |
| 64 | | 429 |
| 65 | | 484 |
| 66 | | 510 |
| 67 | | 514 |

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 68 | | 517 |
| 69 | ACC-CAG | 107 |
| 70 | | 108 |
| 71 | | 110 |
| 72 | | 112 |
| 73 | | 125 |
| 74 | | 126 |
| 75 | | 127 |
| 76 | | 134 |
| 77 | | 136 |
| 78 | | 146 |
| 79 | | 151 |
| 80 | | 154 |
| 81 | | 158 |
| 82 | | 161 |
| 83 | | 162 |
| 84 | | 163 |
| 85 | | 165 |
| 86 | | 182 |
| 87 | | 185 |
| 88 | | 186 |
| 89 | | 188 |
| 90 | | 202 |
| 91 | | 203 |
| 92 | | 206 |
| 93 | | 219 |
| 94 | | 231 |
| 95 | | 234 |
| 96 | | 246 |
| 97 | | 261 |
| 98 | | 279 |
| 99 | | 281 |
| 100 | | 287 |
| 101 | | 298 |
| 102 | | 316 |

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 103 | | 346 |
| 104 | | 374 |
| 105 | | 384 |
| 106 | | 390 |
| 107 | ACG-CAA | 104 |
| 108 | | 105 |
| 109 | | 109 |
| 110 | | 111 |
| 111 | | 113 |
| 112 | | 114 |
| 113 | | 123 |
| 114 | | 130 |
| 115 | | 131 |
| 116 | | 137 |
| 117 | | 153 |
| 118 | | 163 |
| 119 | | 164 |
| 120 | | 165 |
| 121 | | 166 |
| 122 | | 167 |
| 123 | | 169 |
| 124 | | 174 |
| 125 | | 194 |
| 126 | | 197 |
| 127 | | 199 |
| 128 | | 200 |
| 129 | | 217 |
| 130 | | 220 |
| 131 | | 224 |
| 132 | | 224 |
| 133 | | 225 |
| 134 | | 226 |
| 135 | | 237 |
| 136 | | 245 |
| 137 | | 251 |

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 138 | | 253 |
| 139 | | 256 |
| 140 | | 257 |
| 141 | | 258 |
| 142 | | 259 |
| 143 | | 260 |
| 144 | | 260 |
| 145 | | 261 |
| 146 | | 283 |
| 147 | | 300 |
| 148 | | 320 |
| 149 | | 325 |
| 150 | | 331 |
| 151 | | 345 |
| 152 | | 399 |
| 153 | | 415 |
| 154 | GTC-CAG | 102 |
| 155 | | 104 |
| 156 | | 106 |
| 157 | | 109 |
| 158 | | 112 |
| 159 | | 119 |
| 160 | | 125 |
| 161 | | 126 |
| 162 | | 127 |
| 163 | | 129 |
| 164 | | 129 |
| 165 | | 130 |
| 166 | | 134 |
| 167 | | 151 |
| 168 | | 154 |
| 169 | | 182 |
| 170 | | 187 |
| 171 | | 192 |
| 172 | | 204 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 173 | | 205 |
| 174 | | 206 |
| 175 | | 210 |
| 176 | | 216 |
| 177 | | 221 |
| 178 | | 249 |
| 179 | | 251 |
| 180 | | 252 |
| 181 | | 253 |
| 182 | | 254 |
| 183 | | 255 |
| 184 | | 266 |
| 185 | | 267 |
| 186 | | 268 |
| 187 | | 279 |
| 188 | | 281 |
| 189 | | 282 |
| 190 | | 283 |
| 191 | | 292 |
| 192 | | 294 |
| 193 | | 318 |
| 194 | | 319 |
| 195 | | 328 |
| 196 | | 331 |
| 197 | | 332 |
| 198 | | 334 |
| 199 | | 353 |
| 200 | | 363 |
| 201 | | 373 |
| 202 | | 376 |
| 203 | | 377 |
| 204 | | 378 |
| 205 | | 386 |
| 206 | | 389 |
| 207 | | 390 |

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 208 | | 405 |
| 209 | | 409 |
| 210 | | 412 |
| 211 | | 413 |
| 212 | | 423 |
| 213 | | 426 |
| 214 | | 429 |
| 215 | | 434 |
| 216 | | 440 |
| 217 | | 445 |
| 218 | | 454 |
| 219 | | 455 |
| 220 | | 457 |
| 221 | | 462 |
| 222 | | 475 |
| 223 | | 475 |
| 224 | | 534 |
| 225 | GTC-CTA | 116 |
| 226 | | 117 |
| 227 | | 117 |
| 228 | | 119 |
| 229 | | 119 |
| 230 | | 123 |
| 231 | | 123 |
| 232 | | 138 |
| 233 | | 141 |
| 234 | | 144 |
| 235 | | 148 |
| 236 | | 149 |
| 237 | | 150 |
| 238 | | 155 |
| 239 | | 158 |
| 240 | | 159 |
| 241 | | 190 |
| 242 | | 191 |

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 243 | | 194 |
| 244 | | 206 |
| 245 | | 220 |
| 246 | | 222 |
| 247 | | 228 |
| 248 | | 232 |
| 249 | | 235 |
| 250 | | 236 |
| 251 | | 239 |
| 252 | | 245 |
| 253 | | 246 |
| 254 | | 261 |
| 255 | | 262 |
| 256 | | 264 |
| 257 | | 265 |
| 258 | | 266 |
| 259 | | 267 |
| 260 | | 276 |
| 261 | | 278 |
| 262 | | 286 |
| 263 | | 325 |
| 264 | | 344 |
| 265 | | 345 |
| 266 | | 346 |
| 267 | | 366 |
| 268 | | 384 |
| 269 | | 396 |
| 270 | | 398 |
| 271 | | 424 |
| 272 | | 433 |
| 273 | | 454 |
| 274 | | 455 |
| 275 | GAC-CAG | 102 |
| 276 | | 105 |
| 277 | | 111 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 278 | | 113 |
| 279 | | 119 |
| 280 | | 127 |
| 281 | | 129 |
| 282 | | 130 |
| 283 | | 133 |
| 284 | | 140 |
| 285 | | 144 |
| 286 | | 155 |
| 287 | | 159 |
| 288 | | 188 |
| 289 | | 190 |
| 290 | | 192 |
| 291 | | 197 |
| 292 | | 201 |
| 293 | | 207 |
| 294 | | 212 |
| 295 | | 221 |
| 296 | | 239 |
| 297 | | 246 |
| 298 | | 253 |
| 299 | | 261 |
| 300 | | 267 |
| 301 | | 269 |
| 302 | | 289 |
| 303 | | 293 |
| 304 | | 309 |
| 305 | | 334 |
| 306 | | 349 |
| 307 | | 352 |
| 308 | | 354 |
| 309 | | 371 |
| 310 | | 379 |
| 311 | | 446 |
| 312 | | 469 |

Reagenzien und Bezugsquellen

| Reagenzien | Hersteller |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Bromophenolblau | Laborbestand |
| Bovine Serum Albumin | Carl Roth, DE |
| Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) | Laborbestand |
| Chlorophorm | Carl Roth, DE |
| DNA-Gel Farbstoff GelRed | Biotium, US |
| DNA-Leiter 100 bp peqGOLD | peqlab, DE |
| DNA-Leiter 100 bp peqGOLD | peqlab, DE |
| dNTPs | Ambion, US |
| EcoRI | Promega, US |
| EcoRI Adapter | Applied Biosystems, US |
| EDTA | Carl Roth, DE |
| Ethanol | Carl Roth, DE |
| Größenstandard GeneScan™ 500 ROX™ | GeneScan, DE |
| HCl | Laborbestand |
| HiDi-Formamide | Applied Biosystems, US |
| Isoamylalkohol | Carl Roth, DE |
| Isopropanol | Carl Roth, DE |
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth, DE |
| MseI | NEB New England Biolabs, US |
| MseI Adapter | Sigma-Aldrich, US |
| NaCl | Carl Roth, DE |
| peqGOLD Universal Agarose | peqlab, DE |
| Primer EcoRI (FAM) | Sigma-Aldrich, US |
| Primer EcoRI | Applied Biosystems, US |
| Primer MseI | Sigma-Aldrich, US |
| REDTaq® DNA Polymerase | Sigma-Aldrich, US |
| REDTaq® DNA Polymerase Puffer | Sigma-Aldrich, US |
| Sephadex G-50 Superfine | Applied Biosystems, US |
| T4 DNA Ligase (3U/ul) | Promega, US |
| T4 DNA Ligase Puffer | Promega, US |
| Tris | Carl Roth, DE |
| Xylencyanol | Laborbestand |

Puffer, Lösungen, Agarose-Gelelektrophorese

| 2x CTAB Puffer | Endkonzentration | Stock | Molekulargewicht | Für 500 ml |
|---|------------------|-------|------------------|------------|
| Tris: mit HCl auf pH.8 | 100 mM | 0,5 M | 121,21 g/mol | 100 ml |
| NaCl | 1,4 M | 5 M | 58,44 g/mol | 140 ml |
| EDTA | 20 mM | 0,5 M | 372,2 g/mol | 20 ml |
| CTAB | 2% | | | 10 g |
| β-Mercaptoethanol (sterilisiert durch Autoklavieren) 0,2% | | | | |
| PVP 40% (bei Phenolen) 0,1% | | | | |
| pH-Wert Kontrolle pH.8, Aufbewahrung RT | | | | |

| 10x TBE-Puffer | Endkonzentration | Menge für 1000 ml | Molekulargewicht |
|--|------------------|-------------------|------------------|
| Tris | 1 M | 108 g | 121,21 g/mol |
| EDTA pH.8 | 100 mM | Stock 0,5 M/40 ml | 372,2 g/mol |
| Borat | 889,4 mM | 55g | 61,83 g/mol |
| Substanzen in 700 ml Acqua dest. auflösen, titrieren pH.8, auf 1000 ml auffüllen | | | |
| Agarose-Gelelektrophorese: 0,5x Puffer =1:20 mit Acqua dest. verdünnen | | | |
| Aufbewahrung: RT | | | |

| Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 | Endkonzentration | Für 250 ml |
|--------------------------------|------------------|------------|
| Chloroform | 96 % | 240 ml |
| Isoamylalkohol | 4 % | 10 ml |
| Aufbewahrung: 4 °C | | |

| 1x TE-Puffer | Endkonzentration | Stock | Für 250 ml |
|--|------------------|-------|------------|
| Tris: mit HCl auf pH.8 | 10 mM | 0,5 M | 5,5 ml |
| EDTA | 1 mM | 0,5 M | 0,5 ml |
| Substanzen in 150 ml ddH ₂ O auflösen, mit HCl auf pH.8 titrieren, auffüllen auf 250 ml | | | |
| Aufbewahrung: RT | | | |

| Agarose-Gelelektrophorese Basic | |
|---|-------------|
| Kammergröße | 12 cm |
| Erlenmeyerkolben | 250 ml |
| 0,5x TBE Puffer 75 ml | 75 ml |
| 0,6 % peqGOLD Universal Agarose | 0,45 g |
| Laufpuffer 0,5x TBE Puffer 1l | 1l |
| Biotum GelRed Anwendung 1:10 000 | 7,5 µl |
| DNA-Ladepuffer | 3 µl |
| DNA-Leiter 100 bp peqGOLD1 µ | 1 µl |
| DNA-Leiter 6x Ladepuffer/ddH ₂ O 1:3 | 4 µl |
| DNA 3 µl | 3 µl |
| Mikrowelle bis zur Auflösung der Agarose | 3 min. |
| Laufzeit | 1 h/80 Volt |

Protokolle DNA Extraktion

Protokoll: CTAB-Methode (Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid-Methode)

CTAB-Puffer wird in einem Wasserbad bei 60 °C vorinkubiert. Davon werden pro Versuchseinheit 700 µl zügig in die mit homogenisiertem Pflanzenmaterial vorbereiteten 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen pipettiert, kurz mittels Vortexgerät gemischt und auf dem Thermoblock bei 60 °C unter gelegentlicher Invertierung 60 min. inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Durch oftmaliges, leichtes Schütteln werden die Reagenzien in der Suspension vermischt. Das etwas milchige Resultat ruhte 30 min. auf Eis. Mit dem Ziel die Phasen zu konzentrieren, werden die Reaktionsgefäße in der Tischzentrifuge 10 min. bei 11.000 rcf/RT zentrifugiert. Es entstanden die obere wässrige Phase, eine Grenzschicht und die untere, gelbgrünliche, dabei transparente Chloroformphase. Die wässrige Phase enthält die DNA. An der Grenzschicht liegen Zellabfall sowie abgebaute Proteine. In der Chloroformphase befinden sich Polysaccharide, Proteine, Lipide und Sekundärmetaboliten. Nach diesem Schritt zeigt sich die wässrige Phase klar, sie kann aber auch leicht gefärbt sein. Die obere Phase wird mit einer 1000 µl Pipette in eine neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt

und 2/3 des überführten Volumen an Isopropanol hinzugefügt um die Präzipitation der DNA auszulösen. Nach einem weiteren Ruheschritt von 30 min. auf Eis wird erneut 10 min. bei 11000 rcf/RT zentrifugiert. Ohne das etwa 1,25 mm³ große DNA-Pellet am Grund der Eppendorf-Reaktionsgefäße zu verlieren, wird der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wird in je 500 µl 70% EtOH gewaschen. Danach wird 5 min. bei 13000 rcf/RT zentrifugiert; das 70% EtOH wird dekantiert. Dieser Vorgang wird 2x durchgeführt. Abschließend wird das Pellet in der Vakuumzentrifuge 30 min. getrocknet. Die getrockneten Pellets aller Proben erschienen klar. Weißliche oder farbige Pellets würden Kontamination durch Polysaccharide, Phenole oder weitere Stoffe bedeuten. Das Pellet wird nun in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

2 µl RNase wird zum RNA-Verdau hinzugefügt. Dieser Vorgang dauert auf dem bereits auf 37 °C vorgewärmten Thermoblock 30 Minuten.

Protokoll: peqGOLD Plant DNA Mini Kit (peqlab)

Mit diesem Kit ist es möglich bis zu 30 µg gesamtzellulärer DNA aus Kern, Plastiden und Mitochondrien von Pflanzenzellen zu isolieren. Maximal können 50 mg Trockenmaterial pro Versuchseinheit verwendet werden. Bei der eingesetzten Menge von 10 mg Trockenmaterial ist laut Herstellerangabe eine Ausbeute zwischen 2-10 µg DNA zu erwarten. Vorbereitend für den späteren Waschschrift werden 4 ml 'DNA Wash Buffer' mit 6 ml 96% EtOH gemischt. Der Thermoshaker wird auf 65 °C vorgewärmt. Das homogenisierte Pflanzenmaterial in den 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen wird mit je 400 µl 'Lysis Puffer PL1' und 15 µl RNase (20 mg/ml) durch Vortexen für 10 sec. vermischt. Im Thermoshaker wird dieser Ansatz bei 65 °C für 30 min. inkubiert. Ein weiterer 'Lysis Puffer PL2' wird zugegeben und der Ansatz durch Vortexen 5 sec. vermischt. Nach 5 min. auf Eis wird die Suspension für 5 min. bei 13.000 rcf/RT zentrifugiert. Der Überstand wird in den Mikrofilter, der in einer frischen 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angebracht worden ist, verlustfrei überführt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 rcf/RT wird der Mikrofilter verworfen und der Durchfluss für die Schritte 'Laden' und 'Binden' durch Zugabe von 225 µl 'DNA Binding Buffer' vorbereitet. Dazu wird der Ansatz mit der Pipette sorgfältig gemischt und gesamt auf die 'PerfectBind DNA Column' geladen, die in einer weiteren 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet worden ist. Nach erneuter Zentrifugation für 1

min. bei 13000 rcf/RT werden der Säulendurchfluss und die Auffang-Eppendorf-Reaktionsgefäß verworfen. Nun erfolgt die Wäsche der DNA. Die Säule mit der Silikamembran, die die DNA enthält, wird nun in eine weitere 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. 650 µl des vorab komplettierten 'DNA Wash Buffers' (Zugabe von Pufferkonzentrat plus 1,5 x Phänotypen EtOH) werden auf die 'PerfectBind DNA Column' pipettiert. Der Säulendurchfluss und die Auffang-Eppendorf-Reaktionsgefäß werden nach erneuter Zentrifugation für 1 min. bei 13000 rcf/RT wieder verworfen. Der Waschschrift wird 2x durchgeführt. Für den folgenden Trockenschritt wird die 'PerfectBind DNA Column' in eine neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und zur vollständigen Trocknung 2 min. bei 13.000 rcf/RT zentrifugiert. Für den finalen Elutionsschritt wird die Säule in einer 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angebracht. Dann werden 50 µl Elutionspuffer aufpipettiert und die Säule 2 min. bei RT inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 7000 rcf/RT werden die Elution wiederholt, wobei das erste Eluat im Reaktionsgefäß beibehalten wird. Die für jeden Schritt in Bezug auf die Herstellerangaben relativ geringe Menge an Elutionspuffer von 50 µl wird gewählt, um eine hohe DNA-Konzentration, wenn auch bei geringerer Menge an Eluat, zu erhalten.

Protokoll: DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen)

Der Quiagen DNeasy Plant Mini Kit verarbeitet maximal 20 mg Trockenmaterial bei einer möglichen Ausbeute von 3 bis 30 µg DNA. Die durchschnittliche DNA-Konzentration sollte bei einem Elutionsvolumen von 50 µl bis 400 µl im Bereich von 26 bis 83 ng/µl liegen. Zuerst werden 25 ml Phänotypen Ethanol zu den Pufferkonzentraten 'AW' und 'AP3/E' hinzugefügt und der Thermoblock auf 65 °C erhitzt. 400 µl 'Buffer AP1' und 4 µl 'RNase' werden in die 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, die das homogenisierte Blattmaterial enthalten, pipettiert und die Suspension mit dem Vortexgerät kräftig gemischt. Um die Lyse der Zellen zu erreichen wird die Substanz 10 min. auf dem Thermoblock inkubiert. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden in diesem Zeitraum 3x invertiert. Zu dem Lysat wird 130 µl 'Buffer AP2' hinzugefügt und die Mischung 5 min. auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Fällung von Detergenten, Proteinen und Polysacchariden. Um das spätere Ergebnis zu optimieren und eine mögliche Beschädigung der DNA durch Scherkräfte zu vermeiden, werden die

Präzipitate bei 13000 rcf/RT für 5 min. abzentrifugiert. Der Überstand wird in die 'QIAshredder Mini spin column', die in einer 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert worden ist, pipettiert und 2 min. bei 13000 rcf/RT zentrifugiert. In dieser Säule werden Präzipitate und Zelldebris entfernt. Der Durchfluss wird in eine neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Zu den etwa 450 µl an klarem Lysat werden 675 µl Buffer 'AP3/E' hinzugefügt und sofort mit der Pipette gemischt. In einer 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wird die 'DNeasy Mini' spin column vorbereitet. 650 µl der Mischung werden in die Säule pipettiert und für 1 min. bei 7000 rcf/RT zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Der noch vorhandene Rest der Lysatmischung wird additiv in die Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert. Der Durchfluss und die Eppendorf-Reaktionsgefäß werden verworfen. Die Säule wird in eine neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und 500 µl an EtOH-haltigem 'Buffer AW' hinzugefügt. Dann wird 1 min bei 7000 rcf/RT zentrifugiert. Der Waschschritt wird 2x durchgeführt, beim zweiten Mal wird jedoch 2 min. zentrifugiert. Nun wird die Säule vorsichtig, ohne wieder in Kontakt mit dem ethanolhaltigen Durchfluss zu kommen, in eine 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und es werden für die Elution 50 µl 'AE Buffer' direkt auf die DNA-haltige Membran pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wird 1 min. bei 7000 rcf/RT zentrifugiert. Der Vorgang wird wiederholt, wobei die Gesamtmenge an Eluat (100 µl) in einer Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgesammelt wird.

Protokoll: Macherey Nagel-Kit Nucleo Spin Plant II Kit

Dieser Kit ist für die Menge von bis 20 mg trockenem Pflanzenmaterial optimiert und ermöglicht eine Ausbeute von maximal 30 µg reiner, genomischer DNA in 100 µl Eluat. Zuerst werden 24 ml 96% EtOH zu 6 ml 'Wash Buffer PW2' Konzentrat hinzugefügt. 1,5 mg RNase A werden in 150 µl ddH₂O aufgelöst und bei 4 °C aufbewahrt. Der 'Elution Buffer' wird im Wasserbad auf 65 °C vorgewärmt. 400 µl CTAB-Lysepuffer 'PL1' werden auf das pulverisierte Pflanzenmaterial in die 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einem sorgfältigen Vortexschritt werden für den RNA Verdau 10 µl der RNase Lösung hinzugefügt und mit der Pipette gut gemischt. Die folgende Inkubation auf dem Thermoblock dauert 10 min. bei 65 °C. Für die Lyse der Zellen wird der 'Nucleo Spin Filter' in einer neuen 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angebracht und das gesamte Lysat mit der Pipette in die Säule transferiert und für 2

min. bei 13000 rcf/RT zentrifugiert. Bei diesem Schritt sollte die gesamte Flüssigkeit den Filter passieren. Proben, bei denen dies nicht stattgefunden hat, werden nochmals zentrifugiert. Der Durchfluss wird gesammelt und die Säulen werden verworfen. Durch die Zugabe von 450 µl 'Buffer PC' und vortexen werden die Bedingungen für die folgende Bindung der DNA an die Silikamembran optimiert. Eine neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wird mit der 'Nucleo Spin Plant II Column' versehen und bis zu 700 µl der Probe werden auf die Silikamembran in die Säule pipettiert. Nach neuerlicher Zentrifugation von 1 min. bei 13000 rcf/RT wird der Durchfluss verworfen. Nun werden 700 µl des mit 96% EtOH vorbereiteten Washpuffers 'Buffer PW2' hinzugefügt und für den ersten Waschschrift 1 min. bei 13000 rcf/RT zentrifugiert. Der Durchfluss wird entsorgt. Im zweiten Waschschrift wird dieselbe Menge an Puffer verwendet, jedoch 2 min. zentrifugiert. Um die DNA-haltige Silikamembran vollkommen zu trocknen, wird ein in der Anleitung des Herstellers nicht vorgesehener Schritt durchgeführt. Dazu wird die Säule in eine neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und für 2 min. bei 13000 rcf/RT zentrifugiert. Die Elution der DNA für die erste Isolationsreihe erfolgt 2x in dieselbe Eppendorf-Reaktionsgefäß mit je 50 ml 'Buffer PE' wobei jeweils für 5 min. bei 70 °C auf dem Thermoblock inkubiert wird. Um eine möglichst hohe DNA-Konzentration sicherzustellen, kann die Menge an Buffer 'PE' auf 25 ml pro Elution reduziert werden.

Die DNA-Endprodukte alle Aufreinigungsmethoden werden bei 4 °C für die kurzfristige Weiterverarbeitung gelagert. Eine länger andauernde Lagerung erfolgt bei 20 °C.

Geräte und Software

| | |
|---|------------------------------|
| Filterplatte Millipore Multi Screen-HV 96 well | Millipore, US |
| GPS-Gerät Garmin etrex | Garmin, US |
| Gelelektrophoresekammer | Bio-Rad Laboratories, US |
| Glaskügelchen N032.1 | Carl Roth, DE |
| Mini-Vortexer | VWR, DE |
| Mini-Zentrifuge VWR Galaxy Mini | VWR, DE |
| PCR Thermocycler Bio-Rad C 1000 | Bio-Rad Laboratories, US |
| pH-Meter WTW Infolab pH 720 | Infolab, US |
| Plattenzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810R | Eppendorf, DE |
| Plattenzentrifuge Heraeus Function Line Labofuge 400 H | Heraeus Sepatech, DE |
| Reaktionsgefäße Bio-Rad 0,2 ml 8-tube Strips and Domed Cap Strips | Bio-Rad Laboratories, US |
| Reaktionsgefäße Bio-Rad Multiplate PCR Plates Low 96-well Clean | Bio-Rad Laboratories, US |
| Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf, DE |
| Rüttler Ikamag RCT | Ika, DE |
| Schwingmühle Retsch MM 200 und MM2000 | Retsch, DE |
| Sequenzer 3130xl ABI | Applied Biosystems, US |
| Thermo Scientific NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific, US |
| Thermoblock Grant, Grant Forest Products, US | Grant Forest Products, US |
| UV-Vis Transilluminator BioView UST -20M8R-312 nm | Biostep, DE |
| Vakuumzentrifuge Heto Lab Equipment VR-1 | Heto Lab Equipment, DK |
| Zentrifuge Sorvall Heraeus Biofuge fresco | Heraeus Sepatech, DE |

Software:

| | |
|----------------------|--|
| Argus X4 | Biostep, DE |
| EUCLID_2D Saukel | ©Johannes Saukel, AT |
| F.A.M.D. 1.23 | ©Philipp Schlüter, 2006 http://www.famd.me.uk/index.html , UK |
| Genographer 1.6.0 | ©Montana State University 1998 http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer , US |
| GenoType 1.2 | © Meirmanns, P. G., 2007, Universiteit van Amsterdam, meirmans@science.uva.nl , NL |
| Microsoft Excel 2008 | Microsoft, US |

(for Mac Vers. 12)

Software GENESCAN 3.7.2.

Statistica V 6.1.

Eurofins-GeneScan GmbH DE

StatSoft, DE

Lebenslauf

| | |
|-----------------------|--|
| Name | Alice Fischer |
| 1960 | Geburt in Wien |
| 1979 | Matura, Neusprachliches Gymnasium St. Pölten |
| 1979-1980 | Koordination Galerie für Moderne Kunst Julius Hummel Wien |
| 1980-1985 | Universität für Angewandte Kunst in Wien Meisterklasse Design/Mode Karl Lagerfeld, Jil Sander |
| 1984 | 1. Preis der österreichischen Wirtschaftskammer - Modeteam der Stadt Wien 3. Preis der österreichischen Wirtschaftskammer - Modeteam der Stadt Wien |
| 1986-1988 | Senior Designer Gruppo Stefanel |
| 1989-1995 | Leading Design Consultant Gruppo Stefanel |
| seit 1989 bis 2012 | Inhaberin und Geschäftsführerin Alisher Design GmbH Studio für integriertes Design und visuelle Mediengestaltung Creative Direction, Trendforecast, Kollektionserstellung und Gestaltung von Lifestyleprodukten für Unternehmen wie Anglobal, Cashmongol Association, Charivari, Deni Cler, Domani, Gago, Geiger, Henry Bendel, International Wool Secretariate, Les Copains, Liberty, Lodenfrey, Peninsula Knitters, Sportalm, Stoll, Swarovski et al. |
| 1989-1997 | Design und Produktion des Labels Alisher Modeschauen in Paris, Mailand, Düsseldorf, New York und Dubai |
| Fremdsprachen | Deutsch (Muttersprache), Englisch, Französisch, Italienisch |
| Computer skills | Adobe CS Creative Suite, Microsoft Office, Apple Final Cut Pro, Apple Motion |