

Untersuchungen zu potentiellen ökologischen Effekten von gentechnisch  
vermittelter Nematodenresistenz auf pflanzengenetische Ressourcen am Beispiel  
der Zuckerrüben-Wildform (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*)

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen vorgelegte Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

von  
Diplom-Biologin  
Ute Wehres  
aus Neuss

Berichter:  
Prof. Dr. rer. nat. Detlef Bartsch, BVL, Berlin  
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ingolf Schuphan

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.



---

|  |           |
|--|-----------|
| I Einleitung   | 1         |
| II Allgemeiner Teil  | 5         |
| III Material und Methoden  | 15        |
| <b>3.1 Untersuchungsgebiet</b>   | <b>15</b> |
| <b>3.2 Pflanzenmaterial</b>  | <b>16</b> |
| <b>3.3 Wildrüben/Kontrollen</b>  | <b>18</b> |
| <b>3.4 Untersuchungen zur ökologischen Wechselwirkung<br/>        Nematoden/Wildrüben</b>              | <b>18</b> |
| 3.4.1 Anzucht der Pflanzen   | 18        |
| 3.4.2 Untersuchungen von Bodenproben auf <i>H. schachtii</i>   | 19        |
| 3.4.3 Infektionsversuch  | 20        |
| 3.4.4 Versuchsauswertung   | 22        |
| 3.4.5 Statistische Auswertung  | 24        |
| <b>3.5 Methoden zur Bestimmung der genetischen Diversität</b>  | <b>26</b> |
| 3.5.1 DNA-Gewinnung  | 26        |
| <b>3.6 PCR-RFLP zur Bestimmung von CMS Markern</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.7 Methode der AFLP</b>  | <b>30</b> |
| 3.7.1 Durchführung der AFLP  | 31        |
| 3.7.2 Auswertung der DNA-Fingerprint Techniken   | 35        |
| IV Ergebnisse  | 37        |
| <b>4.1 Populationsdaten</b>  | <b>37</b> |
| <b>4.2 Auswertung der Bodenproben</b>  | <b>39</b> |
| <b>4.3 Überprüfung von <i>H. schachtii</i> in den italienischen<br/>        Bodenproben</b>            | <b>40</b> |
| <b>4.4 Auswertung des Infektionsversuches mit <i>H. schachtii</i></b>                                  | <b>41</b> |
| <b>4.5 Genetische Charakterisierung der Wildrüben <i>B. vulg.</i> ssp.<br/>        <i>maritima</i></b> | <b>46</b> |
| 4.5.1 PCR-RFLP zur Bestimmung von CMS-Markern  | 46        |
| 4.5.2 Genetische Charakterisierung mit Hilfe der AFLP-Analyse  | 49        |
| 4.5.3 Bestimmung des Polymorphiegrades   | 50        |
| 4.5.4 Genetische Distanzen und genetische Ähnlichkeit  | 51        |
| 4.5.5 Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen   | 54        |

|   |     |
|---|-----|
| V Diskussion  | 56  |
| 5.1 Suszeptibilität der Wildformen von <i>Beta</i> , speziell <i>B. vulg. ssp. maritima</i> gegenüber dem Befall des Rübenzystennematoden <i>H. schachtii</i> | 56  |
| 5.2 Toleranz in der Wirt-Parasit-Interaktion <i>B. vulg. ssp. maritima</i> zu <i>H. schachtii</i> unter Einfluss von abiotischem Stress                       | 58  |
| 5.3 Nachweis von <i>H. schachtii</i> in den Bodenproben der italienischen Standorte   | 61  |
| 5.4 Biodiversität der Wildrübenpopulationen <i>B. vulg. ssp. maritima</i> und deren Erhalt als pflanzengenetische Ressource                                   | 62  |
| 5.4.1 Erfassung und Etablierung der Wildrübenpopulationen an der italienischen Adriaküste, im Hinblick als pflanzengenetische Ressource                       | 62  |
| 5.4.2 Veränderungen der genetischen Diversität der erfassten Wildrübenpopulationen an der italienischen Adriaküste  | 64  |
| 5.4.3 Bestätigung der AFLP-Analyse durch CMS Nachweis in Wildformen   | 66  |
| 5.5 Folgen einer Auskreuzung und Introgression von gentechnisch erzeugter Nematodenresistenz  | 67  |
| VI Zusammenfassung  | 73  |
| 6.1 Abstract  | 67  |
| VII Verzeichnisse   | 76  |
| 7.1 Literaturverzeichnis  | 76  |
| 7.2 Abbildungsverzeichnis   | 86  |
| 7.3 Tabellenverzeichnis   | 88  |
| VIII Anhang   | 90  |
| 8.1 ANOVA (Rohdaten der statistischen Auswertung)   | 90  |
| 8.2 Rohdaten der gezählten Nematodenzysten  | 94  |
| 8.3 Zusammensetzung und Dosierungsvorschrift der Steiner-Nährlösung   | 102 |
| 8.4 0/1 Matrix der AFLP-Ergebnisse  | 103 |
| 8.5 Polymorphiegrad (Rohdata)   | 111 |
| 8.6 Shannon Index (Rohdata)   | 113 |

## I Einleitung

Weltweit wurden 2005 auf 90 Millionen Hektar gentechnisch veränderte Nutz- und Kulturpflanzen angebaut (ISAAA<sup>1</sup> 2006). Zu den wichtigsten Anbaugebieten gehören vor allem die USA und Kanada, aber auch in den so genannten Schwellenländern wie China, Argentinien, Brasilien und Indien steigen die Anbauflächen von gentechnisch veränderten Pflanzen kontinuierlich an. Mit ca. 60.000 Hektar kommerziell angebautem gv-Mais trat Spanien im Jahr 2006 anteilmäßig an die Spitze innerhalb der Europäischen Union. In Deutschland wurden in diesem Jahr lediglich auf ca. 950 ha gv-Mais (Standortregister BVL<sup>2</sup>) kommerziell angebaut.

Rechtlich ist der Anbau von zugelassenen gv-Pflanzen in den EU-Ländern möglich. Bevor gv-Pflanzen, als Lebens- und/oder Futtermittel oder zum Anbau zugelassen werden, ist eine begleitende Sicherheitsforschung notwendig. Diese Sicherheitsforschung liefert unter anderem Daten, die in Zusammenhang mit der Begutachtung von Anträgen auf Inverkehrbringen nötig sind. Als ein Instrument des Risikomanagements, dient die Umweltbeobachtung (Monitoring) nach dem Inverkehrbringen (Tiedje et al. 1989, Kareiva et al. 1994, Bartsch & Schuphan 1998, EFSA<sup>3</sup>). Unter dem Begriff des Monitorings versteht man nach Anhang VII der EU-Richtlinie 2001/18/EG<sup>4</sup> die Beobachtung nachteiliger Effekte für die Umwelt und die menschliche Gesundheit, die in der Umweltrisikoprüfung identifiziert wurden (fallspezifische Beobachtungen) und auch die möglichst frühzeitige Beobachtung eventueller unerwünschter Effekte, die unvorhergesehen auftreten könnten (allgemeine Beobachtung).

Auch 16 Jahre nach dem ersten Freisetzungsvorfall in Deutschland, werden gv-Pflanzen hinsichtlich ökologischer und ökonomischer Folgen noch immer kontrovers diskutiert. Ein aktueller Schwerpunkt der ökonomischen Diskussion ist die Sicherung der Wahlfreiheit zwischen GVO-nutzender und GVO-vermeidender Landwirtschaft (Koexistenz). Die Bewertung der ökologischen Konsequenzen

---

<sup>1</sup> ISAAA: International Service for Acquisition of Agrobiotech Application. [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org)

<sup>2</sup> BVL: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Zuständige Zulassungsbehörde bei Freisetzungen und Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in Deutschland. [www.bvl.bund.de](http://www.bvl.bund.de)

<sup>3</sup> European Safety Authority: europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit. Sie wurde 2002 als zentrale Behörde für die wissenschaftliche Risikobewertung der Lebens- und Futtermittelsicherheit in der EU eingerichtet. Seit 2005 ständiger Sitz in Parma. [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)

<sup>4</sup> 2001/18/EG: Richtlinie über die absichtliche Freisetzung von GVO in die Umwelt.

beschäftigt Wissenschaftler aus den Fachbereichen der Molekularbiologie, Ökologie und der Landwirtschaft.

Werden in Deutschland Freisetzungsversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen durchgeführt, so dienen diese unter anderem der Erforschung und Entwicklung verschiedener Anwendungen, wie zum Beispiel der Resistenzzüchtung gegen Krankheitserreger. So wurden Zuckerrüben entwickelt die mit Hilfe der Biotechnologie gegen ihre Krankheitserreger und Schädlinge resistent sind. Es liegen inzwischen einige praktische Erfahrungen möglicher Einflüsse auf die Umwelt aus Freisetzungsversuchen vor (Bartsch et al. 2003a;b), so dass beispielsweise eine wissensbasierte Risikoabschätzung für den Anbau von Pflanzen, die eine gentechnisch erzeugte Virusresistenz und/oder Herbizidresistenz besitzen, möglich ist.

Vergleichsweise wenig Erfahrungen gibt es für eine Umweltrisikoprüfung von Zuckerrüben, die eine gentechnisch erzeugte Resistenz gegen Nematoden als Schädling und/oder Krankheitserreger besitzen. Dabei ist die Entwicklung von Resistenzen gegen Nematoden ein wichtiges Zuchtziel. Besonders der Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* (Schacht 1859) führt im Zuckerrübenanbau immer wieder zu großen wirtschaftlichen Einbußen. Dieser Schädling ist für die so genannte Rübenmüdigkeit verantwortlich. Die Bekämpfung von *H. schachtii* mit chemischen Mitteln wurde sowohl aus Kostengründen, als auch aufgrund ökotoxikologischer Bedenken in den achtziger Jahren in der Bundesrepublik eingestellt. Der Ertragsverlust, durch *H. schachtii* bei häufigem Anbau von Zuckerrüben auf der gleichen Fläche, beträgt unter mitteleuropäischen Bedingungen bis zu 25 Prozent (Schlang 1991a). Damit stellt *H. schachtii* den wirtschaftlich bedeutendsten tierischen Schädling im Zuckerrübenanbau dar.

Ein wichtiger Aspekt bei der Sicherheitsforschung gentechnisch veränderter Pflanzen ist die mögliche Verbreitung des „Transgens“ in der Umwelt. Eine besondere Rolle spielen dabei mögliche Kreuzungspartner wie wildverwandte Arten der angebauten Kulturpflanzen. Diese Wildpflanzen stellen als pflanzengenetische Ressource ein wichtiges Schutzziel dar (Hawkes 1997, Frankel & Bennett 1970). Ein Verlust an innerartlicher genetischer Vielfalt wäre

hinsichtlich zukünftiger Nutzungsmöglichkeiten für die Pflanzenzüchtung unerwünscht. Ein Wirkungspfad für das Auftreten potentiell unerwünschter Effekte resultiert aus der Verbreitung transgener Eigenschaften, wie dem langfristigen Verbleiben von gv-Pflanzen in der Umwelt, z.B. auf brachfallenden Landwirtschaftsflächen. Bei Zuckerrüben kann zum Beispiel die Überwinterungsfähigkeit wichtig für die Verbreitung sein (Pohl-Orf et al. 1999). Für die bienne Zuckerrübe ist das Überdauern in der vegetativen Form von großer Bedeutung, damit im zweiten Jahr nach der Blütenbildung, die Verbreitung des Pollens und die Bildung von Samen erfolgen kann. Neben den zweijährigen Kulturformen gibt es jedoch noch einjährige Wildformen. Der monogen-dominant vererbte einjährige Generationszyklus der Wildformen, kann nach Hybridisierung und Introgression bei der Produktion von Kulturrübensaatgut in schossenden Zuckerrüben wiederzufinden sein (Boudry et al. 1994, Abe et al. 1997).

Der Genfluss zwischen gv-Kulturformen und Wildformen wird zwar zu begrenzen sein, er ist aber nicht grundsätzlich zu vermeiden. Hinsichtlich der potentiellen Konsequenzen für die Umwelt sollten deshalb Basisdaten der ökologischen Relevanz der gv-Kulturpflanzen in der betroffenen Umwelt erhoben werden, wie z.B. geographische Verbreitung von Wild- und Kulturformen und das Auftreten von Nematoden zur Abschätzung der Interaktion mit der Umwelt. Diese Daten sind für die Zulassung zum kommerziellen Anbau und für den Aufbau einer Umweltbeobachtung eine wichtige Voraussetzung.

Folgende Komplexe sind Bestandteil für die Bewertung ökologischer Auswirkung einer potentiellen Auskreuzung gentechnisch veränderter Merkmale auf wildverwandte Arten:

- Ausbreitung des gentechnisch übertragenen Nematodenresistenzgens und die Auswirkung auf die genetische Diversität von Wildrübenpopulationen, wenn diese empfindlich auf den Befall des Nematoden reagieren
- Faktoren die das Entkommen von „Transgenen“ von Kultur- zu Wildformen fördern (z.B. Einjährigkeit)

Ausgewählt für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden Populationen der Wildrübe *Beta vulgaris* ssp. *maritima* im Po-Delta der norditalienischen Adriaküste. Diese Wildrübenpopulationen sind von besonderem Interesse, da sie

in unmittelbarer Nähe zu Saatgutvermehrungsfeldern liegen. Zur Produktion von Zuckerrübensaatgut ist es notwendig, dass diese Rüben blühen und Samen bilden. Diese blühende Kulturform kann gleichzeitig mit der Blüte von benachbarten Wildrübenpopulationen auftreten.

Im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes wurden am Lehrstuhl für Biologie V an der RWTH-Aachen Untersuchungen zu Fragen der biologischen Sicherheit bei Anbau gentechnisch veränderter Zuckerrüben durchgeführt. Die erhobenen Daten sollen dazu beitragen, aus der Erfassung der lokalen genetischen Diversität und der Wirt-Parasit-Interaktion die ökologischen Folgen von der Verbreitung der Nematodenresistenzgene in Wildrübenpopulationen abzuschätzen.

Dazu wurden folgende Fragenstellungen bearbeitet:

- Sind Wildformen von *Beta* gegenüber Nematodenbefall durch *H. schachtii* anfällig und wenn ja, haben höhere Bodensalzkonzentrationen an natürlichen Standorten von *B. vulg. ssp. maritima* einen Einfluss auf die Wirt-Parasit-Interaktion von Nematoden und Rübenpflanzen?

Dazu wurde in einem Gewächshausversuch Rübenpflanzen mit verschiedenen Salzkonzentrationen bewässert und die Empfindlichkeit gegenüber Nematodenbefall untersucht.

- Wie hoch ist die genetische Diversität innerhalb der lokalen Population von *B. vulg. ssp. maritima*?

Hierzu sollten Polymorphismen in der DNA-Sequenz der einzelnen Genotypen innerhalb der verschiedenen Populationen bestimmt werden. Methodisch wurden mit Hilfe der AFLP-Analyse und der RFLP-PCR die Verwandtschaftsbeziehungen der Populationen zueinander beschrieben. Es wurde für diese Untersuchungen Pflanzenmaterial der letzten 10 Jahre ausgewertet.



## II Allgemeiner Teil

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Döll) gehört zur Familie der Gänsefußgewächse (Chenopodiaceae). Sie stammt von der mediterranen Strandpflanze *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.) Arcangeli, der wilden Runkelrübe ab. Die Abkömmlinge der Stammpflanze werden heute in der Unterart *Vulgaris* zusammengefasst. Zu den Verwandten der Zuckerrübe gehören unter anderem die folgenden Nutz- und Kulturpflanzenformen: die Rote Rübe/Beete (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *conditiva* Alef.), die Runkel-/Futterrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *crassa*) und der Mangold (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* convar. *vulgaris* und convar *flavenescens* DC.) (Letschert 1993) (Abb.2.1).



**Abb.2.1:** Aus der Wildrübe wurden die folgenden Kultur- und Nutzpflanzen kultiviert: die Zuckerrübe, die Runkel-/Futterrübe, der Mangold und die Rote Rübe/Beete (Letschert 1993). Von links nach rechts, beginnend mit der Wildrübe.

Alle Formen der Gattung *Beta* (Tranzschel 1927, Ulbrich 1934, Zosimovic 1934) sind untereinander kreuzbar und können nur durch strenge Isolierung rein gehalten werden. Eine Sonderstellung in dieser Gattung nimmt *Beta macrocarpa* (Gos.) ein, die zwar mit *Beta vulgaris* kreuzbar ist, aber aufgrund morphologischer Merkmale als eine eigene Art eingestuft werden kann (Bartsch & Ellstrand 1999).

Eine charakteristische Eigenschaft für Pflanzen der Gattung *Beta* ist die Zweijährigkeit. Allerdings sind auch einjährige Pflanzen in der Gattung *Beta* vorhanden, die das dominant vererbte *B* Gen besitzen (Boudry et al. 1994). Das *B*-Gen ist verantwortlich für frühes Schossen (Einjährigkeit) (Munerati 1931). Die Pflanzen werden hauptsächlich windbestäubt und vorwiegend fremdbefruchtet (Barocka 1985). Nach der Blüte und der Fruchtbildung, die im zweiten Jahr erfolgen, stirbt die Pflanze ab und überdauert als Samen.

Die einjährigen Wildrüben blühen zwischen Juni und August. Die unscheinbaren, grünlichen, zwittrigen Blüten sind meist zu 2-4 Knäueln vereinigt und sitzen an einem langen beblätterten, rispigen Blütenstand. Die Blütenhülle ist fünfspaltig und ist am Grund mit dem Fruchtknoten verwachsen (Tutin et al. 1946). Bei der Fruchtreife erhärten die Blütenhüllblätter, schließen die Frucht ein und fallen mit dieser ab. Der Blütenstand wird zwischen 0,5m bis zu 1m lang (Abb.2.2). Die Blätter sind klein und fleischig und stehen überwiegend in einer grundständigen Rosette.



**Abb.2.2:** Die Blüten der Gattung *Beta* stehen in einer Rispe. Der Blütenstand ist eher unscheinbar und besteht aus einer Blütenhülle, die mit dem Fruchtknoten verwachsen ist.

Die salzliebenden (halophilen) Gänsefußgewächse, sind in Salzwüsten, entlang der Meeresküsten und als Ruderalpflanzen verbreitet. Zu finden sind die Wildformen der Gattung *Beta* in China, Zentral- und Westasien (Knapp 1958), entlang der Küsten des Atlantiks und auch an der Nordseeküste (Barocka 1985, Letschert 1993). Im Ostseeraum sind die Wildformen, von der Mitte Schwedens über Dänemark bis hin zur deutschen Ostseeküste verbreitet (Christensen 1996, Driessen 1999; 2001). Sogar in Kalifornien (Bartsch & Ellstrand 1999) und Australien (Curtis 1967) wurden Wildpopulationen der Gattung *Beta* gefunden. Entsprechend ist auch das Verbreitungsgebiet der *B. vulg. ssp. maritima* in küstennahen Regionen, wobei sie in südlichen Bereichen auch im Inland zu finden ist (Aellen 1979, Desplanque et al. 1998). Die ältesten archäologischen Funde sind Fruchtkelche, die in einer jungsteinzeitlichen Küstensiedlung (ca. 2000 v. Chr.) in Nordholland gefunden wurden (Lippmann 1925). Früchte der Wild- und Kulturrübe sind aber nicht zu unterscheiden und Hinweise für einen Anbau als Gemüsepflanze gibt es bis jetzt keine. Grabungsfunde von Fruchtknäueln in römischen Kastellen, z.B. Novaesium (heute: Neuss) belegen, dass der Mangold (und/oder Rüben) durch die Römer nach Deutschland kam. Das erste schriftliche Zeugnis ist wohl das „Capitulare de villis“<sup>5</sup> von Karl dem Großen, in dem *Betas* (Mangold oder Rüben) benannt werden. Im 16 Jhd. beschrieben Otto Brunfels und Leonhardt Fuchs in ihren Herbarien, eindeutig

---

<sup>5</sup> In der Verordnung „*Capitulare de villis vel curtis imperialibus*“ werden in einer Liste 73 Nutzpflanzen beschrieben, die in den bewirtschafteten kaiserlichen Herrnhöfen zu wachsen hatten. Diese Verordnung wurde im Jahre 812 durch den Kaiser „Karl der Große“ in Aachen erlassen.

den „weißen oder römischen Mangold“. Dieser steht den „Rotrüben“ mit verdickter und ovaler Wurzel gegenüber. Es werden in der antiken Literatur rote (*teutlion*) und weiße (*sicula*) Formen von *Beta* unterschieden. Aber es fehlt die Beschreibung einer Verdickung der Wurzel, wofür die heutige gültige Bezeichnung die Varietät *cicla* ist, daher lässt darauf schließen, dass bei den *Betas* die in den Capitularen beschrieben werden, wohl eher um Mangold handelt.

Die ursprüngliche Zuckerrübe stammt von der oberschlesischen Runkelrübe ab und ist eine weltweit bekannte Kulturpflanze (Schiemann 1932). Mit der Bekanntmachung der Entdeckung des Rübenzuckers am 17. November 1747 durch Andreas Sigismund Marggraf sind fast 260 Jahre vergangen. Seither erfolgt in fabriknahen Gebieten, in meist eng gestellten Fruchtfolgen, intensiver



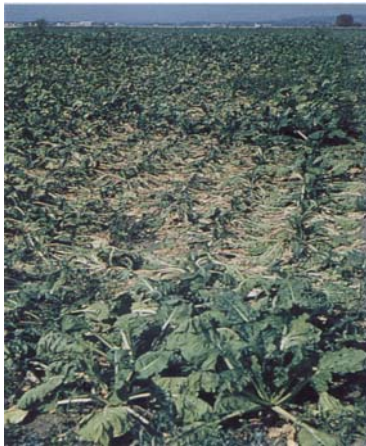
**Abb.2.3:** Der Rübenzystennematode *H. schachtii* gehört zum Stamm der *Nemathelminthes* (Rundwürmer), darunter zur Klasse der *Nematoda* (Fadenwürmer) und zur Ordnung der *Tylenchida*.

Zuckerrübenanbau. Diese Intensivierung förderte schon Mitte des 19. Jahrhunderts einen ertragsreduzierenden Schädling. Der Botaniker Schacht berichtete 1859 erstmalig über kleine Fadenwürmer (Abb.2.3), die an den Wurzeln der Rüben parasitieren. Zwölf Jahre später wurde dieser Parasit von Schmidt systematisch zum Stamm der Rundwürmer *Nemathelminthes* zugeordnet und zu Ehren seines Entdeckers als *H. schachtii* benannt. Er ist in ganz Europa, aber auch in weiten Teilen Asiens und Australien verbreitet (Abb.2.4) und

stellt in vielen Rübenanbaugebieten den ertragsbegrenzenden Faktor dar. Unter mitteleuropäischen Bedingungen können die Verluste bis zu 25 Prozent betragen. Der Rübenzystennematode kann insgesamt etwa 200 Pflanzenarten als Nahrungsquelle nutzen (Steele 1965, Schlang 1991b). Neben der Zuckerrübe und anderen *Chenopodiaceae* stellen *Cruziferae* eine weitere wichtige Wirtspflanzenfamilie dar. Pro Jahr können sich unter geeigneten Bedingungen 2-3 Generationen entwickeln. Die Anzahl der Generationen und die Entwicklungsdauer werden dabei entscheidend von der Temperatursumme und der Feuchtigkeit beeinflusst (Fichtner 1985).

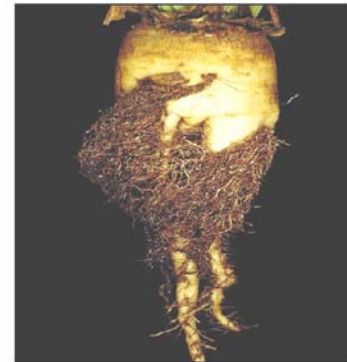


**Abb.2.4:** Verbreitung von *H. schachtii* in Europa aus: KWS 2002



**Abb.2.5:** Nematodenbefallsnest im Feld (KWS 2002).

Das Schadbild, das der Rübenzystennematode erzeugt, gleicht dem der Viruskrankheit Rhizomania<sup>6</sup>. Beide Symptome erzeugen eine Art Rübenmüdigkeit (Abb.2.5). Hierbei kommt es hauptsächlich bei älteren Pflanzen mit ausgeprägtem Blattwerk zu Welkeerscheinungen. Bei stark befallenen Pflanzen kommt es zum kümmerlichen Wuchs; die äußeren Blätter sterben dabei ab und die nachwachsenden Blätter besitzen eine reduzierte Blattspreite. Wie bei Rhizomania reagieren die Zuckerrüben bei Befall mit *H. schachtii* durch verstärkte Bildung von Seitenwurzeln, wodurch die Hauptwurzel stark verkürzt bleibt und sich ein sogenannter Wurzelbart bildet (Abb.2.6).



**Abb.2.6:** Wurzelbart an einer Zuckerrübe bei Nematodenbefall (KWS 2002)

Der Lebenszyklus von *H. schachtii* beginnt als Zyste im Boden, in der er bis zu zehn Jahren überdauern kann. Die Überdauerungszyklen sind meist Stecknadelkopf groß und können ca. 200-500 Larven enthalten (Decker 1963, Hilleshög 2002). Um zu schlüpfen benötigen die Larven einen Schlupfreiz durch Wurzelexsudate der Wirtspflanzen (Gray et al. 1992). Verlassen die



**Abb.2.7:** Lebenszyklus von *H. schachtii* mit den verschiedenen Larvenstadien

geschlechtlich undifferenzierten Larven nach dem zweiten Juvenilstadium die Zysten, bewegen sie sich nur zentimeterweise weiter. Dies erklärt das nesterartige Auftreten der Krankheit im Feld (Jung & Wyss 1999). Bei den befallenen Wurzeln, werden Nährzellen (Syncytien) gebildet. In diesen Zellen durchlaufen die Nematoden das dritte und vierte Larvenstadium, um dann zur Geschlechtsdifferenzierung zu gelangen. Die Männchen halten die Wurmform bei. Die Weibchen verbleiben im Syncytium und werden von den Männchen aktiv aufgesucht. Nach

<sup>6</sup> Rhizomania ist eine Infektionskrankheit an der Zuckerrübe die durch den BNYV Virus (*Beet necrotic yellow vein virus*) hervorgerufen wird

der Befruchtung kommt es beim Weibchen zum Anschwellen des Hinterleibes, in dem sich die befruchteten Larven befinden. Während dieses Prozesses sterben die Weibchen ab. Die so erzeugten Zysten fallen von den Wurzeln ab und reifen allmählich zu dunkelbraunen, zitronenförmigen und hartwandigen Überdauerungszysten heran (Abb.2.7). Diese Zysten sind äußerst widerstandsfähig gegen Temperaturunterschiede, Chemikalien und mechanische Einflüsse. Nach Herauslösen oder Absterben der Wirtspflanze verbleiben die Zysten im Boden und können bei der Bodenbearbeitung und Erntemaßnahmen so leicht verschleppt werden. Für eine optimale Entwicklung von *H. schachtii* sind hohe Bodentemperaturen, mittlere Korngrößenverteilung im Boden und eine mittlere Bodenfeuchte Voraussetzung (KWS 2002, Fichtner 1985; 1986).

Meistens wurden chemische und/oder physikalische Methoden zur Bekämpfung von *H. schachtii* eingesetzt. Der größte Teil der chemischen Mittel zur Bekämpfung sind nicht mehr erhältlich (Bell et al. 1996, Baron 1994). Die einzigen in Deutschland zugelassenen Nematizide sind zur Zeit Basamid® und Hostathion® (BBA 2000). Natürliche Feinde gegen die Rübenzystennematoden kommen zum größten Teil nur im Reich der Pilze vor. Von diesen Pilzen sind bis heute ca. 150 Arten bekannt (Dürschner 1993, Dowe 1969, Balke 2001). Wie die chemischen Mittel sind auch die eingesetzten physikalischen Methoden nur von geringer Effizienz und unökonomisch. Die physikalischen Methoden, wie Überflutung, Bodenisolation und Bodendämpfung sind nicht nur wenig effektiv, sondern auch teuer und werden nur noch in Ausnahmefällen angewandt (Decker 1969). Daher wird durch die geringe Wirksamkeit dieser Methoden, immer mehr auf kulturtechnische Maßnahmen zurückgegriffen.

Durch den Einsatz von Zwischenfrüchten oder der Anbau resistenter Sorten kann die Befallsdichte des Schädling reduziert werden. Wird eine Wirtspflanze, wie z.B. *Sinapis alba* (Weißer Senf) angebaut, kommt es zwar zum Schlupfreiz der Larven, aber ohne dass diese ihren Entwicklungszyklus beenden können und ohne sich vermehrt zu haben, absterben (Rose 2001, Schlang 2001). Der Anbau erweiterter Fruchtfolgen wirft häufig praktische Probleme auf und lässt sich aus Gründen der Betriebs- und Arbeitswirtschaft oft nicht realisieren (KWS 2002). Daher liegt es nahe, eine Zuckerrübe zu züchten, die sich auf natürliche Weise gegen ihre Schädlinge schützen kann.

Seit Beginn der Einführung der Zuckerrüben in die landwirtschaftliche Nutzung, wurde sie durch viele pflanzenzüchterische Maßnahmen in ihrer Produktivität optimiert. Allerdings war bis vor rund zehn Jahren nur wenig über die Vererbung wichtiger Eigenschaften der Zuckerrübe bekannt. Bis heute wurden über 600 Markerloci auf den neun Chromosomen der Zuckerrübe kartiert (Pillen et al. 1992, Barzen et al. 1992, Hallden et al. 1994, Schondelmaier et al. 1996, Schumacher et al. 1997). Zum Beispiel wurde in der Mitte von Chromosom zwei, das Gen für frühes Schossen (*B*) lokalisiert. Dieses Gen ist vor allem in der eng verwandten Wildart *B. vulg. ssp. maritima* verbreitet. Es bewirkt das frühzeitige Strecken der Sprossachse (Schossen) mit anschließender Bildung von Blütentrieben ohne vorherige Einwirkung kühler Temperaturen (Vernalisation). Diese Eigenschaft ist für die Wildarten wichtig, die an Standorten vorkommen, an denen die Temperaturen im Winter relativ mild sind und eine frühe Blüte einen Vorteil darstellt. Solche Pflanzen sind auch in den Gebieten verbreitet, in denen Zuckerrübensaatgut erzeugt wird. Die spontane Einkreuzung kann hier zu Zuckerrüben mit einer Schosneigung führen. Neben den Genen zur Einzelfruchtigkeit (Monokarpie) und dem Restoreragen, sind auch die Loci der Resistenzgene gegen einige Krankheiten lokalisiert worden: Zu diesen Krankheiten gehören die Viruserkrankung Rhizomania und auch Gene für eine Nematodenresistenz. Diese Gene liegen auf dem Chromosom neun, welches natürlich bei der Wildart *B. procumbens* vorkommt. Für die Züchtung resistenter Sorten waren langjährige Rückkreuzungen nötig, um die negativen Eigenschaften (z.B. kleinere Knollenbildung, schlechtere Zuckerqualität) wieder zu verdrängen.

In neuerer Zeit, bietet nun die Gentechnik, die Möglichkeit, resistente Sorten mit einem geringen Aufwand zu züchten. Mit Hilfe der Transformationstechnik (Dale et al. 1993) besteht in der Pflanzenzüchtung nun die Möglichkeit, jedes beliebige Gen von einem Organismus artübergreifend in eine Pflanzenzelle zu integrieren. Die Gentechnik verkürzt vor allem die Entwicklung neuer Sorten ganz erheblich. Kommerzielle Züchtungsmethoden würden normalerweise 10-15 Jahre in Anspruch nehmen und deren Entwicklung ca. 2-5 Millionen Euro kosten kann (Büchting 1998). Bei der Züchtung einer nematodenresistenten Zuckerrübe, dient die Wildrübe *B. procumbens* als Quelle für das Resistenzgen. Das so genannte Hs1<sup>pro-1</sup> wurde isoliert und als Resistenzgen identifiziert (Jung 1997, Kleine et al. 1997). Die so entstandene transgene Zuckerrübe, soll sich somit von

selbst gegen ihren Erreger erwehren können. Das Prinzip hat sich allerdings bis heute noch nicht etablieren können. Es besteht die Möglichkeit, dass durch einen hohen Selektionsdruck durch den Nematoden, entsprechende Virulenzgene die Resistenz überwinden können. Daher wäre der Einsatz der gentechnisch erzeugten nematodenresistenten Zuckerrübe zeitlich begrenzt und es müssten weiterhin Zwischenfrüchte angebaut werden. Diese Maßnahme wäre dann ein Bestandteil eines Resistenzmanagements beim kommerziellen Anbau der gv-Zuckerrüben.

Neben einem anbaubegleitenden Resistenzmanagement, müsste dann auch ein anbaubegleitendes Monitoring als Voraussetzung für den Anbau gentechnisch veränderter Zuckerrüben erarbeitet werden. Wie schon erwähnt, ist die Zuckerrübe mit den Verwandten der Gattung *Beta* frei kreuzbar. Durch die Anwesenheit von z.B. Wildformen wie *B. vulg. ssp. maritima* in der Nähe von Zuckerrübenanbaugebieten könnte es zu einem Genfluss der beiden Arten kommen.

Gerade im politischen Hinblick, stellt sich daher die Frage der Koexistenz gentechnisch veränderter Kulturpflanzen und konventionell angebauten Pflanzen oder/und deren Wildformen. Der Genfluss zwischen den Kulturpflanzen mit ihren wildverwandten Arten ist ein Phänomen, welches bei der Pflanzenzüchtung und dem einhergehenden Anbau zwangsläufig auftritt. Zwölf der dreizehn weltweit wichtigsten Kulturpflanzen sind mit ihren wildverwandten Arten kreuzbar und können fertile Nachkommen bilden (Hybride) (Ellstrand et al. 1999). Das Ausmaß des Genflusses zwischen verschiedenen Pflanzen kann sich allerdings je nach Art, Population, Individuen oder sogar von Jahr zu Jahr enorm unterscheiden und ist deshalb eine schwer einzuschätzende Größe (Ellstrand 1992). Erfolgt die Befruchtung und die Bildung eines keimfähigen Samens, so ist die F1-Generation (Hybrid) häufig in ihrer Fruchtbarkeit reduziert. Die Bildung von Hybriden wird von vielen Faktoren beeinflusst (Grant 1981): Dazu gehört das zeitgleiche Blühen beider Arten, sowie die gegenseitige Kompatibilität des Pollens. Auch die räumliche Entfernung der Kulturpflanzen zu den Wildformen und auch umgekehrt, spielen eine ausschlaggebende Rolle (Ellstrand & Hoffmann 1990). Mit einhergeht natürlich auch der Verbreitungsfaktor des Pollens (Arias & Rieseberg 1994). Wenn diese Faktoren aber alle gegeben sind, so ist selbst bei

geringer Auskreuzungswahrscheinlichkeit ein Genaustausch unvermeidbar (Ellstrand 1988, Kareiva et al. 1994). Besteht nun die Möglichkeit der Auskreuzung im Hinblick passender Umweltfaktoren, so stellt sich die Frage der Einkreuzung des transgenen Erbgutes auf Wildarten und damit die eventuelle Verbreitung außerhalb der Anbauflächen. Damit verbunden sind auch die Folgen eines solchen Szenarios, wie auch mögliche Unterschiede im Auskreuzungsverhalten zwischen konventionell gezüchteten und gentechnisch veränderten Pflanzen (Bartsch & Schuphan 2002). Im Fall der Zuckerrübe wurde nachgewiesen, dass im Auskreuzungsverhalten zwischen transgenen und nichttransgenen Zuckerrüben keinerlei Unterschied besteht.

Unter dem Begriff Risiko versteht man das Produkt aus Wahrscheinlichkeit und Ausmaß des Auftretens von unerwünschten und nachteiligen Wirkungen. Dass kann je nach Sicht des Betrachters unterschiedlich bewertet werden. Bei der Freisetzung und Kommerzialisierung der gentechnisch veränderten Pflanzen, sind die Risiken häufig schwer zu erfassen, dementsprechend sind die Erfahrungen, die vorliegen zu bewerten. Ein wichtiger Aspekt in der ökologischen Sicherheitsforschung ist eine mögliche unkontrollierte Ausbreitung und eine anschließende Veränderung der heimischen Flora (Raybould & Gray 1993). Stellen im Zuge natürlichen Genflusses zwischen Kultur- und Wildpflanzen übertragene Gene für die Hybridform einen selektiven Vorteil dar, könnte dies eine Populationszunahme und Verbreitung dieser veränderten Pflanze zur Folge haben. Speziell daraus hervorgehende neue Unkräuter können problematisch werden, sofern aus ihrer Veränderung ein Fitnessvorteil gegenüber anderen Unkräutern resultiert. Eine Ausbreitung in andere Ökosysteme ist dadurch denkbar, zumal schon ein einziges Gen eine Steigerung der Fitness zur Folge haben kann (Darmency 1994). Insbesondere Gene, die eine erhöhte Stresstoleranz z.B. gegenüber Frost, Salz, Trockenheit oder aber Krankheitsresistenz bewirken. Die Bekämpfung solcher Pflanzen mit Unkraut-eigenschaften im Anbau, kann dadurch enorm erschwert werden (z.B. Resistenzbildung gegen Herbizide). Bedeutet eine zusätzliche Eigenschaft im natürlichen Habitat jedoch für eine Pflanze keinen Selektionsvorteil, wird sie sich kaum gegen konkurrierende Pflanzen durchsetzen können (Bartsch 1997). Allerdings kann der natürliche Gentransfer zwischen Kultur- und Wildpflanzen auch zu einem nachteiligen Effekt für eine Hybridpflanze führen und im



Extremfall sogar das Aussterben der Population zur Folge haben, z.B. durch Übertragung von Sterilität oder Zwergwuchs (Ellstrand & Hoffman 1990). Zur Abschätzung des Verhaltens transgener Pflanzen in der Umwelt und ihres Invasionsverhaltens werden Erfahrungswerte mit Neophyten und deren Verbreitung herangezogen (Sukopp & Sukopp 1993a).

Auch bei der Freisetzung transgener Zuckerrüben, müssen mögliche Folgen von Gentransfer und Übertragung der Resistenzen auf Wild- oder Unkrautformen berücksichtigt werden. Unkrautrüben als mögliche Pollenspender im Feld können eventuell als Brücke zwischen Kultur- und Wildrüben dienen und so eine Übertragung veränderter Gene fördern. Eine mögliche unerwünschte Folge wären einjährige transgene Zuckerrüben (Saeglitz 1999). Dieser Einfluss könnte einen Verlust genetischer Ressourcen darstellen.

Die pflanzengenetischen Ressourcen stellen einen wichtigen Bestandteil der Biodiversität dar. Der Verlust der Biodiversität gehört derzeit neben solchen bedeutenden Faktoren wie Klimawandel und der gesicherten Versorgung mit Wasser zu den zentralen Problemen der Menschheit (Hammer 1998). Im allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Landwirtschaft wesentlich daran interessiert ist, eine maximale Produktion mit wenigen ausgewählten Organismen durchzuführen, daher wird sie als ein Hauptfaktor zur Reduktion der Biodiversität insgesamt eingeschätzt. Die Besonderheit besteht aber darin, dass sie selbst in starkem Maße von der Biodiversität abhängig ist (Hammer 1998). Die Biotechnologie hat einen besonderen Einfluss auf den Erhalt pflanzengenetischer Ressourcen. Auf der einen Seite ermöglicht sie eine bessere Nutzung des Ausgangsmaterials (*smart breeding*); andererseits trägt sie auch zu den Erhaltungsmöglichkeiten bei. Beide Begriffe, Biodiversität und pflanzengenetische Ressource, haben das gleiche Ziel mit unterschiedlichem Ursprung. Die Biodiversität befasst sich mit dem Erhalt der biologischen Vielfalt und der pflanzengenetischen Ressource liegt der Erhalt der Diversität zugrunde. Der Vergleich der Biodiversität zwischen Kulturpflanzen und ihren verwandten Wildarten wird als infraspezifische Variabilität bezeichnet. Untersuchungen haben ergeben, dass Kulturpflanzen genetisch heterogener sind, als die verwandten Wildarten (Hamrick & Godt 1997), die genetische Variabilität aber innerhalb der Wildarten ist größer (Petersen et al. 1994). Dies wird auf den Gründereffekt bei

der Domestikation zurückgeführt, da die Auswahl der ein neues Gebiet besiedelnden Individuen zufallsbedingt nur einen kleinen Ausschnitt der gesamten genetischen Variation enthalten. Daher werden diese Populationen sowohl untereinander, als auch gegenüber der Ausgangspopulation auf genetischer Ebene zu unterscheiden sein. Der Erhalt der genetischen Ressource der Wildrübenpopulationen ist in Europa von besonderem Interesse. Die hier gefundenen Formen von Wild-, Unkraut- und Kulturrüben, sind alle untereinander kreuzbar und bilden fertile Nachkommen (Boudry et al. 1993). Die Möglichkeit der Hybridisierung besteht also und konnte auch praktisch nachgewiesen werden (Kapteijns 1993, Raybould & Gray 1993, Bartsch & Pohl 1996). Durch die mögliche Vermischung der Arten untereinander ist die Herkunft und die genetische Interaktion ein wichtiger zu untersuchender Aspekt. Ebenso sind Kenntnisse zur genetischen Variabilität von Arten und Populationen von Bedeutung, um mögliche Verarmung durch genetische Faktoren zu messen (Tiedemann 2001). Zur Messung der genetischen Diversität, bedient man sich der Methode von molekularen Markern. Mit Hilfe der molekularbiologischen Methode, wie z.B. den AFLPs ist es möglich, einen oder mehrere Marker auf ihre Variabilität hin zu untersuchen. Diese Variabilität wird dann als Maß für die zu erwartende Variabilität im gesamten Erbmateriale angesehen. Auch die Herkunft einzelner Populationen, kann anhand molekularer Marker untersucht werden. Zum Beispiel kann durch das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des *B*-Gens (Schosser-Gen) die Einteilung in Nord- und Südeuropa gemacht werden (Boudry et al. 1994, vanDijk et al. 1997). Weitere bekannte Marker spielen im Hinblick, der Interaktion zwischen Kulturrüben und Wildrüben eine Rolle. Dabei handelt es sich zum Beispiel um die Genloci des CMS (Cytoplasmatic male sterility). Diese Eigenschaft wurde kommerziell für die Hybridsaatgutproduktion entwickelt. Bei den Zuckerrüben wurde das CMS von Owen (1945) entdeckt, es wird bei der Zuckerrübenzüchtung weltweit angewandt (Saumitou-Laprade et al. 1993). Dieses Cytoplasma führt in den meisten Fällen zur Pollensterilität. Besonders im Bereich der Hybridzüchtung werden solche Eigenschaften eingesetzt. Aufgehoben werden diese durch Restorerogene, die im entstandenen Hybrid die Fertilität wieder herstellt. Die cytoplasmatische männliche Sterilität wird mitochondrial vererbt. Durch diese Eigenschaft ist es möglich den mütterlichen Ursprung zu beweisen. Dieser Beweis kann durch molekularbiologische Methoden erbracht werden.

## III Material und Methoden

### 3.1 Untersuchungsgebiet

Das für diese Arbeit im Mittelpunkt stehende Gebiet, in dem bedeutende genetische Ressourcen von Wildrübenpopulationen zu finden sind, liegt im Po-Delta der norditalienischen Adriaküste (Abb.3.1) und hat eine Größe von ca. 1000 km<sup>2</sup>. Im Norden wird das Gebiet durch die Städte Padua und Venedig und im Süden durch die Städte Rovigo und Adria begrenzt. Das vorherrschende Klima, mit einer Jahresdurchschnittstemperatur (*Instituto Sperimentale per le Culture Industriale und Rovigo*) von 13°C in der Po-Ebene und 14°C in den Küstenebenen ist für die Pflanzenproduktion nahezu optimal. Die höchsten Niederschlagsmengen fallen in den Herbst- und Wintermonaten und die Hauptwindrichtung ist primär Ost und sekundär West. Aufgrund der günstigen klimatischen Verhältnisse findet hier nicht nur der Anbau von Zuckerrüben statt, sondern auch die Saatgutproduktion der Züchtungsfirmen. Neben den dort angebauten Kulturrüben (*B. vulg. ssp. vulgaris*) kommen an der Adriaküste auch deren wildverwandte Arten (*B. vulg. ssp. maritima*) vor. Das gleichzeitige Vorkommen von Wildrübenpopulationen, und die Produktion von Saatgutvermehrung, machten diesen Standort für Untersuchungen zum Genfluss sehr interessant. Hier stehen die blühenden Kulturrüben und die blühenden Wildrüben in direkter Nachbarschaft zueinander. Aus diesem Grund wurden seit 1994 in dieser Region Wildrübenstandorte mit ihren vorkommenden Populationen kartiert (Schmidt 1996).



**Abb.3.1:** Übersicht über die Fundorte von *B. vulg. ssp. maritima* an der norditalienischen Adriaküste. Die angegebenen Markierungen stellen die Fundorte der Populationen dar und sind in Tab.3.1. erläutert.

### 3.2 Pflanzenmaterial

Von 1994 bis 2001 wurden Ende Juli jeden Jahres, an der italienischen Adriaküste, Sammelreisen durchgeführt. Es wurden hauptsächlich reife Samen der Wildrüben gesammelt, die für spätere Untersuchungen an der RWTH-Aachen zur Verfügung standen.

Die Anzucht der Pflanzen aus den gesammelten Samen, erfolgte im Gewächshaus. Die jeweilig benötigten Fruchtknäuel wurden zufällig ausgewählt und in Pikierschalen ausgelegt. Die darin angezogenen Pflanzen dienten zur Untersuchung der Befallsempfindlichkeit gegenüber Nematoden und zur Gewinnung von Zellmaterial zur Untersuchung der genetischen Struktur.

Das Auftreten von Pflanzenkrankheiten und Schädlingen im Gewächshaus, wurde je nach Befallsstärke biologisch oder chemisch behandelt. Blattlausbefall wurde in der Regel mit den Larven der Florfliege (*Chrysoperla* ssp.; Neuroptera: Chrysopidae) und der Blattlausschlupfwespe (*Aphidius colemani*; Hymenoptera: Braconidae) biologisch bekämpft. Ein aufkommender Mehltaubefall wurde mit 0,1%iger Sapro<sup>®</sup>-Lösung behandelt.

Im Rahmen der jährlichen Kartierung, des Untersuchungsgebietes wurde auch nach neuen Populationen gesucht. Die Folge war ein kontinuierlicher Anstieg unterschiedlicher Wildrübenstandorte. Aufgrund begrenzter finanzieller und apparativer Ressourcen konnten nicht alle Standorte in die nachfolgenden Untersuchungen mit einbezogen werden.

Die zu untersuchenden Populationen wurden anhand zweier Kriterien ausgewählt: 1. regionale Repräsentativität und 2. Nähe zu den Saatgut-zuchtfeldern. Die Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht darüber, welche Populationen für die einzelnen Untersuchungen berücksichtigt wurden. Weitere Informationen zu diesen Standorten finden sich bei Bartsch et al. (2003a), Brand (1997) und Lehnen (2000). Zu den untersuchten Populationen wurden noch weitere Wildrübenexemplare als Vergleichpopulationen mit in die Analyse einbezogen. Als so genannte „Outgroups“ wurden die Kulturrübe LENORA und die Wildrübe *B. procumbens*, mit in die laufenden Untersuchungen einbezogen. Als Vergleichspopulationen dienten Wildrüben von der deutschen Ostseeküste und von der Nordseeküste. Dabei war besonders der Vergleich von unterschiedlich

alten Wildrübenstandorten interessant. Während es sich bei den italienischen Standorten schon um ältere etabliertere Populationen handelt, so handelt es sich bei den Wildrüben der deutschen Ostseeküste im Verhältnis dazu, um sehr junge Populationen (Driessen 2003).

**Tab.3.1:** Liste der in den Untersuchungen berücksichtigten Wildrübenpopulationen. Angegeben sind Standort/Herkunft, verwendete Abkürzungen (Abk.), Ursprungs-Region, Jahr der Probenahme und die Art der Untersuchungen (Nematoden-Suszeptibilitätstest zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Nematoden, Bestimmung der genetischen Diversität mit Hilfe der Amplified Fragment Length Polymorphism-Methode (AFLP), Untersuchung der mütterlichen Herkunft des Untersuchungsmaterials (CMS) [Wild- oder Kulturherkunft]).

|    | Standort/Herkunft   | Abk. | Herkunft   | Jahr | Nematoden | AFLP | CMS |
|----|---------------------|------|------------|------|-----------|------|-----|
| 1  | Albarella Club      | Al   | Italien    | 1994 | X         | X    | X   |
| 2  | Albarella Club      | Al   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 3  | Albarella Hafen     | AH   | Italien    | 1994 |           | X    | X   |
| 4  | Albarella Hafen     | AH   | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 5  | Ausa Corno          | AC   | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 6  | Bibione             | Bi   | Italien    | 2001 |           |      | X   |
| 7  | Boccassette         | Bo   | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 8  | Cervia              | Ce   | Italien    | 1998 |           | X    | X   |
| 9  | Cervia              | Ce   | Italien    | 1999 |           |      | X   |
| 10 | Cervia              | Ce   | Italien    | 2001 |           |      | X   |
| 11 | Chioggia            | CH   | Italien    | 1994 |           | X    | X   |
| 12 | Chioggia            | CH   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 13 | Fusina              | Fu   | Italien    | 1994 | X         | X    | X   |
| 14 | Fusina              | Fu   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 15 | Grado               | Gr   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 16 | Malamocco           | Ma   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 17 | Numana              | N    | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 18 | Pellestrina         | Pe   | Italien    | 1994 | X         | X    | X   |
| 19 | Pellestrina         | Pe   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 20 | Porto Levante       | PL   | Italien    | 1994 |           | X    | X   |
| 21 | Porto Levante       | PL   | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 22 | Punta Sabiona       | PS   | Italien    | 2001 | X         |      |     |
| 23 | San Erasmo          | SE   | Italien    | 1996 |           |      | X   |
| 24 | San Michele         | SM   | Italien    | 1994 |           | X    | X   |
| 25 | San Michele         | SM   | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 26 | San Pietro          | SP   | Italien    | 2001 | X         | X    |     |
| 27 | San Pietro in Volta | PV   | Italien    | 2001 |           | X    |     |
| 28 | Scanarello          | Sc   | Italien    | 2001 |           | X    | X   |
| 29 | Torcello            | T    | Italien    | 2001 | X         | X    | X   |
| 30 | Burg Tiefe          | BT   | Ostsee/De  | 1999 |           |      | X   |
| 31 | Burger Binnensee    | BB   | Ostsee/De  | 1999 | X         | X    | X   |
| 32 | Dazendorf           | DZD  | Ostsee/De  | 1999 | X         | X    | X   |
| 33 | Großenbroder Fähre  | GF   | Ostsee/De  | 1999 | X         | X    |     |
| 34 | Steinwarder Ufer    | SWU  | Ostsee/De  | 1999 |           | X    | X   |
| 35 | Puttgarden          | Pt   | Ostsee/De  | 1999 |           | X    | X   |
| 36 | Wulfener Hals       | WH   | Ostsee/De  | 1999 |           | X    | X   |
| 37 | Fastensee           | Fa   | Ostsee/De  | 1999 |           | X    | X   |
| 38 | Fehmarnsund Fehmarn | FSF  | Ostsee/De  | 1999 | X         | X    | X   |
| 39 | Helgoland           | H    | Nordsee/De |      | X         | X    | X   |
| 40 | Lenora              | L    | Kulturrübe |      | X         | X    | X   |
| 41 | Procumbens          | Pr   | Wildrübe   |      | x         | X    | X   |

### 3.3 Wildrüben/Kontrollen

Für alle Untersuchungen wurden als Kontrollen unterschiedliche Wildrüben aus Italien, von der deutschen Ostsee, Nordsee, *B. procumbens* und eine Kulturrübensorte in jeden Versuch integriert. Die Kulturrübensorte LENORA ist eine Nematoden sensitive Kulturrübe und wird in den Versuchen der Nematoden-Suszeptibilitätstests als Positivkontrolle eingesetzt. Das Saatgut der Kulturrübe wurde von der Firma KWS zur Verfügung gestellt, es handelt sich dabei um nicht pilliertes Saatgut. Weiter wurde die Kulturrübe bei den genetischen Untersuchungen als so genannte „Outgroup“ mit einbezogen. Die Wildrüben der Ostseeküste wurden aus Sammelfahrten von Driessen (1999) und Wehres (2001) mit einbezogen. Als Negativ-Kontrolle bei den Versuchen mit *H. schachtii* wurde die nematodenresistente Wildrübe *B. procumbens* (Jung & Wricke 1987) von der Biologischen Bundesanstalt (Dr. Frese) aus Braunschweig zur Verfügung gestellt. Die Wildrübe der Nordsee kam von der biologischen Station Helgoland.

### 3.4 Untersuchungen zur ökologischen Wechselwirkung Nematoden/Wildrüben

#### 3.4.1 Anzucht der Pflanzen

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus. Die jeweils benötigten Fruchtknäuel wurden zufällig ausgewählt und in Pikierkisten ausgelegt. Für ein repräsentatives Ergebnis wurden von jedem Standort mindestens 20 Pflanzen angezogen.

Für die Anzucht der Pflanzen betrug die Temperatur im Gewächshaus nachts 15°C und tagsüber mindestens 20°C. Die Beleuchtung folgte einem Tag/Nachtrhythmus (16/8h) und einer Beleuchtungsstärke von 12.000 Lux.

Es wurden für die beiden Hauptuntersuchungen möglichst dieselben Pflanzen verwendet. Für den molekularbiologischen Teil wurden die Blätter der Pflanzen beprobt, die dann weiter zur Extraktion der DNA verwendet wurden (Kapitel 3.5.1). Für den Suszeptibilitätstest mit dem Rübenzystennematoden *H. schachtii* wurden die Pflanzen in Pflanztöpfe umgesetzt.

#### **3.4.2 Untersuchungen von Bodenproben auf *H. schachtii***

Diese Untersuchungen bezogen sich auf die mögliche Anwesenheit der Rübenzystennematoden in den Wildrübenstandorten an der italienischen Adriaküste. Dazu wurden Bodenproben in unmittelbarer Nähe der Wildrübenstandorte genommen. Es wurden ca. 20-30 cm Boden ausgehoben und in Gefrierboxen zwischengelagert. An manchen Stellen war diese Probennahme problematisch, da es sich bei den Wildrübenhabitaten meist um Meersaum oder ein Hafenbecken handelt, und dort der Boden sandig oder/und steinig ist. Es wurden daher an manchen Stellen mehrere Proben genommen und als a-d Probe bezeichnet. Der Boden wurde auf optische Merkmale und auf seine Leitfähigkeit hin untersucht. Falls der Nematode sich im Boden an den Wildrübenstandorten befindet, wäre eine charakteristische Studie der Bodeneigenschaften von Vorteil. Von diesem Boden wurden je 150g in Pflanztöpfe gefüllt. Pro Bodenprobe wurden zwei Töpfe befüllt, in die sowohl eine Senfpflanze (*Sinapis alba*) als Nematodenfangpflanze und eine sensitive Kulturrübe LENORA gepflanzt wurden. Es wurden pro Bodenprobe 5 Wiederholungen getestet (Tab.3.2). Nach ca. 8-9 Wochen wurden die Pflanzen von der Erde befreit und auf mögliche Infektionen hin untersucht. Als Negativkontrolle wurden die Pflanzen in normale Anzuchterde gepflanzt, bei der Positivkontrolle wurde die Erde mit Zysten der Rübenzystennematoden inokuliert.

**Tab.3.2:** Anzahl der untersuchten Senf- und Kulturrübenpflanzen zur Bestimmung des Nematodengehaltes in Bodenproben von verschiedenen Wildrübenstandorten. Die Bezeichnungen a/b/c/d, stehen für die Anzahl an Proben, die genommen wurden. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden der Senf (*Sinapis alba*) und die Kulturrübe einmal in infizierter Erde und nicht infizierter Erde angezogen. Die infizierte Erde wurde mit jeweils 15 Zysten von *H. schachtii* inokuliert.

| Wildrüben-Standort | Probennahme-Wiederholung | Senf | Kulturrübe |
|--------------------|--------------------------|------|------------|
| Albarella Club     | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Albarella Hafen    | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Ausa corno         | a/b                      | 5    | 5          |
| Bibione            | a/b/c/d                  | 5    | 5          |
| Bocassette         | a/b                      | 5    | 5          |
| Cervia             | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Chioggia           | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Fusina             | a/b                      | 5    | 5          |
| Grado              | a/b                      | 5    | 5          |
| Numana             | a/b/c/d                  | 5    | 5          |
| Pellestrina        | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Pietro in Volta    | a/b/c/d                  | 5    | 5          |
| Porto Lavante      | a/b                      | 5    | 5          |
| San Erasmo         | a/b/c                    | 5    | 5          |
| San Michele        | a/b                      | 5    | 5          |
| Scanarello         | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Torcello           | a/b/c                    | 5    | 5          |
| Valle Ballione     | a/b                      | 5    | 5          |
| Negativkontrolle   | -                        | 5    | 5          |
| Positivkontrolle   | -                        | 5    | 5          |

#### 3.4.3 Infektionsversuch

Als Pflanzsubstrat, für die Versuche mit *H. schachtii*, wurde Untergrundlöss aus dem Tagebau Garzweiler II verwendet. Dieser wurde aus der wurzelfreien Zone direkt aus einem Aufbruch des Tagebaugeländes entnommen und trocken gelagert.

Die Verwendung des Löss geschah auf Empfehlung durch Dr. Schlang (BBA, Elsdorf) und bietet mehrere Vorteile. Aufgrund der Korngrößenverteilung ließ sich der Löss nach Versuchsende gut aussieben, so dass das Auffinden und Zählen der Zysten enorm erleichtert wurde. Auch die hellbraune bis beige Färbung, des Materials erleichterte das Auffinden der meist dunkelbraunen bis schwarz gefärbten Zysten.

Der getrocknete Löss wurde über ein Küchensieb vorgesiebt und in Portionen zu je 250g in Pflanztöpfe der Größe 8x7x7cm (ca. 400ccm) eingewogen. Die Versuchspflanzen wurden mit Pikierstößchen aus den Anzuchtschalen vorsichtig herausgelöst ohne das Wurzelmaterial zu beschädigen. Die Wurzeln wurden mit



Wasser gewaschen, um Reste der Einheitserde zu entfernen. Dann wurden sie in den eingewogenen Löss umgesetzt und sofort gegossen.

Nach zwei Tagen wurden die Pflanzen mit je 24ml Steiner-Nährlösung<sup>7</sup>, gedüngt. Alle 14 Tage wurden die Pflanzen erneut mit der Nährlösung nachgedüngt.

Die Pflanzen wurden ausschließlich mit Überdauerungszyten infiziert. Dies erleichterte die genaue Dosierung der Infektion. Die Zysten wurden aus einer Probe stark mit Zysten durchsetzten Untergrundlösses isoliert, die von Dr. Schlang (BBA) zur Verfügung gestellt wurde. Das infizierte Material wurde bei 4°C in einem Kühlraum gelagert. Zur Isolation der Zysten wurde der Löss portionsweise in ein Sieb mit der Maschenweite 100µm gegeben und so lange gewaschen, bis nur noch die minimalen Reste von Wurzelfasern zurückblieben. Diese Reste wurden mit etwas Wasser in eine Petrischale überführt und konnten anschließend mit einer Lupe oder einem Binokular quantifiziert werden.

Die Zysten wurden mittels einer Federstahlpinzette aus den Proben herausgesucht, gezählt und bis zur Infektion der Pflanzen in Leitungswasser bei 4°C gelagert. Es wurden nur vollständig intakte und gleichgroße Zysten isoliert.

Die Infektion der Versuchspflanzen erfolgte mit je 15 Zysten von *H. schachtii* pro Pflanze. Zur Infektion wurde unmittelbar neben dem Pflanzstängel mit einem Pikierstockchen ein ca. 2cm tiefes Loch in den Löss gebohrt. Die Zysten wurden über eine Pasteurpipette mit etwas Leitungswasser in dieses Loch überführt. Das Loch wurde anschließend wieder geschlossen und die Pflanze je nach Behandlung isoliert.

Die Salzbehandlung erfolgte in Anlehnung an Brand (1997, Bartsch & Brand 1998). In diesem Versuch wurden die Pflanzen mit drei verschiedenen Salzwasser-Konzentrationen gegossen. Eine Gruppe von Pflanzen wurde während der gesamten Versuchsdauer (ca. 9 Wochen) mit reinem Leitungswasser, die zweite Gruppe mit einer 0,5%-NaCl-Lösung und die dritte Gruppe mit 1%iger NaCl-Lösung gegossen. Unter Einwaage von jeweils 50g (für 1%-Lösung) bzw. 25g Meersalz (für 0,5%-Lösung) wurde die Salzlösung hergestellt.

---

<sup>7</sup> Zusammensetzung der Steiner-Nährlösung siehe Anhang

Es wurden neben den in Tab.3.1 aufgeführten Wildrüben unterschiedlicher Standorte, die infektionsresistente Wildrübe *B. procumbens* und eine sensitive Kulturrübe (LENORA) dieser Gießtechnik unterzogen. Es wurden jeweils 3 mal 10 Pflanzen der verschiedenen Standorte pro Versuch eingesetzt. Jedem Versuch wurden 10 Kulturrüben als Kontrolle zugefügt (Tab.3.3).

**Tab.3.3:** Versuchspflanzenzahl zur Bestimmung der Infektiösität von Rübennematoden in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Gießwassers.

| Konz. des Wassers | Wildrübe | Kontrolle |
|-------------------|----------|-----------|
| 0%                | 10       | 10        |
| 0,5%              | 10       | 10        |
| 1%                | 10       | 10        |

#### 3.4.4 Versuchsauswertung

Nach Versuchsende wurde der gesamte Inhalt eines Pflanztopfes in eine Siebkaskade aus einem gröberen (500µm Maschenweite) und einem feinerem Sieb (100µm) überführt. Die Wurzeln wurden vorsichtig über dem Sieb mit fließendem Wasser abgewaschen und das Wasser weitestgehend abgeschüttelt. Der restliche Topfinhalt wurde durch beide Siebe gewaschen und die verbleibenden Reste von Sand und Wurzelfasern wurden wie bei der Isolation der Infektionszysten mit Wasser in eine Petrischale gespült. Die oberirdischen Teile der Rübenpflanzen wurden verworfen, das Wurzelwerk abgetrennt und mit in die Petrischale zur Untersuchung gegeben. Der gesamte Inhalt der Schale wurde anschließend mit dem Binokular untersucht.

Die Zysten wurden stets bei 4°C zunächst in Leitungswasser und dann zur längeren Lagerung in leicht feuchtem Löss im Kühlraum aufbewahrt.

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wurden den Populationen mit den dazugehörigen Konzentrationen den Abkürzungen zugeordnet (Tab.3.4).

**Tab.3.4:** Codierung der Populationen mit der zugehörigen Salzkonzentration, zur besseren Darstellung der Ergebnisse im Säulendiagramm.

| Population      | Sorte      | Region      | Konzentration | Abkürzung |
|-----------------|------------|-------------|---------------|-----------|
| Lenora          | Kulturrübe |             | 0%            | 1a        |
| Lenora          | Kulturrübe |             | 0,5%          | 1b        |
| Lenora          | Kulturrübe |             | 1%            | 1c        |
| Helgoland       | Wildrübe   | Deutschland | 0%            | 2a        |
| Helgoland       | Wildrübe   | Deutschland | 0,5%          | 2b        |
| Helgoland       | Wildrübe   | Deutschland | 1%            | 2c        |
| Fastensee       | Wildrübe   | Deutschland | 0%            | 3a        |
| Fastensee       | Wildrübe   | Deutschland | 0,5%          | 3b        |
| Fastensee       | Wildrübe   | Deutschland | 1%            | 3c        |
| Fehmarnsund     | Wildrübe   | Deutschland | 0%            | 4a        |
| Fehmarnsund     | Wildrübe   | Deutschland | 0,5%          | 4b        |
| Fehmarnsund     | Wildrübe   | Deutschland | 1%            | 4c        |
| Dazendorf       | Wildrübe   | Deutschland | 0%            | 5a        |
| Dazendorf       | Wildrübe   | Deutschland | 0,5%          | 5b        |
| Dazendorf       | Wildrübe   | Deutschland | 1%            | 5c        |
| BurgerBinnensee | Wildrübe   | Deutschland | 0%            | 6a        |
| BurgerBinnensee | Wildrübe   | Deutschland | 0,5%          | 6b        |
| BurgerBinnensee | Wildrübe   | Deutschland | 1%            | 6c        |
| Albarella Club  | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 7a        |
| Albarella Club  | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 7b        |
| Albarella Club  | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 7c        |
| Ausa Corno      | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 8a        |
| Ausa Corno      | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 8b        |
| Ausa Corno      | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 8c        |
| Punta Sabiona   | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 9a        |
| Punta Sabiona   | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 9b        |
| Punta Sabiona   | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 9c        |
| Torcello        | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 10a       |
| Torcello        | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 10b       |
| Torcello        | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 10c       |
| Bocassette      | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 11a       |
| Bocassette      | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 11b       |
| Bocassette      | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 11c       |
| Pellestrina     | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 12a       |
| Pellestrina     | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 12b       |
| Pellestrina     | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 12c       |
| Fusina          | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 13a       |
| Fusina          | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 13b       |
| Fusina          | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 13c       |
| Numana          | Wildrübe   | Italien     | 0%            | 14a       |
| Numana          | Wildrübe   | Italien     | 0,5%          | 14b       |
| Numana          | Wildrübe   | Italien     | 1%            | 14c       |
| Procumbens      | Wildrübe   |             | 0%            | 15a       |
| Procumbens      | Wildrübe   |             | 0,5%          | 15b       |
| Procumbens      | Wildrübe   |             | 1%            | 15c       |

### 3.4.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden nach Versuchsende auf ihre Normalverteilung getestet und anschließend einer Varianzanalyse unterzogen, um signifikante Unterschiede in der Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber dem Nematoden je nach Standort, Sorte und Salzbehandlung aufzeigen zu können.

Die Varianzanalyse (ANOVA, **AN**alysis **Of VA**riance) stellt eine Möglichkeit dar, den Einfluss eines Faktors auf die Varianz (Streubereich einer Häufigkeitsverteilung) der Daten zu bestimmen und damit die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu analysieren. Mit einem anschließenden so genannten posthoc-Test<sup>8</sup> ist es möglich, zu definieren um welche Gruppen es sich dabei handelt, die sich in ihren Mittelwertunterschieden signifikant verhalten.

Die Voraussetzungen einer ANOVA sind, dass die Varianz einer Zufallsvariablen von einer oder mehrerer Gruppenvariablen erklärt werden kann. Dazu müssen die Rohdaten der ANOVA normalverteilt sein, es muss eine Homogenität in den Varianzen vorliegen und die Messwerte und Faktoren müssen unabhängig sein und auf einer zufälligen Stichprobe basieren. Bei der F-Statistik wird mit einer **Konfidenz**<sup>9</sup> Das Ergebnis der Varianzanalyse wird in der ANOVA Tabelle dargestellt (s. Anhang). Dabei ist die wesentliche Information der **p-Wert**<sup>10</sup>. Er besagt ob die **Nullhypothese**<sup>11</sup> bestätigt oder verworfen wird und der Faktor einen signifikanten Einfluss auf die untersuchte Variabel hat.

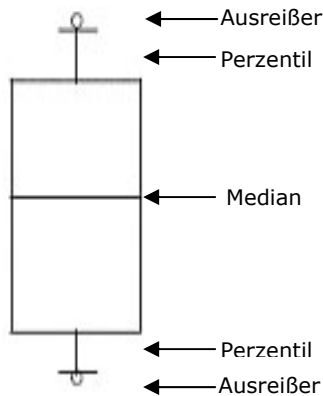
---

<sup>8</sup> posthoc Test wird durchgeführt wenn der p-Wert  $< 0.05$  ergeben hat

<sup>9</sup> Konfidenzbereich ist der Bereich für eine Schätzung im Rahmen eines statistischen Modells.

<sup>10</sup> p-Wert gibt an ob ein Resultat signifikant oder nicht signifikant ist. p ist kleinstes  $\alpha$  das noch signifikant ist. Falls p kleiner oder gleich  $\alpha$  wäre, wird die Null Hypothese abgelehnt, falls p größer als  $\alpha$  wäre, wird die Nullhypothese nicht abgelehnt.

<sup>11</sup> Nullhypothese ist die Annahme über die Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Zufallsvariablen.



**Abb. 3.2:** Darstellung eines einfachen Box-Plots. Mit Ausreißern, Median und Perzentilen

Zur graphischen Darstellung der Daten bieten sich gruppierte Box-Plots (Box- and Whiskers) an (Abb.3.2). Dadurch erhält man den Eindruck, wie die Daten verteilt sind. Als Box wird das durch die **Perzentile**<sup>12</sup> bestimmte Rechteck bezeichnet. Es umfasst 50 Prozent der Daten. Durch die Länge der Box ist die Streuung der Daten um den Median über dem Median und die andere Hälfte darunter zu erkennen. Diese Streuung ist durch die Differenz des oberen und unteren Perzentils bestimmt. Der Median in der Box gibt durch seine Lage einen Eindruck über die „schiefe“ Verteilung

der Daten an. Die unteren und oberen Querlinien (Whiskers) geben die 10 Prozent und 90 Prozent Perzentile an, die darüber liegende Punkte sind die Ausreißer. Eine Asymmetrie des Box-Plots deutet auf eine schiefe Verteilung hin. Damit stellt der Median das 50 Prozent Perzentil. Bei einer 25 Prozent zu 75 Prozent Streuung spricht man von einem Quartil, dabei sind 50 Prozent der zentralen Daten vorhanden.

Das Verfahren der Regressionsanalyse beschreibt die statistischen Abhängigkeiten (wie z.B. die Ursache-Wirkungs-Beziehung) durch so genannte Regressionskurven. Hierbei wird eine Variable betrachtet, die von einer oder mehreren unabhängigen Variablen beeinflusst wird. Werden mehrere unabhängige Variablen betrachtet, spricht man von einer multiplen linearen Regression. Die Regressionsanalysen ermittelt das Bestimmtheitsmaß<sup>13</sup>  $r^2$  den Regressionskoeffizienten. Er ist ein Maß für die Qualität des berechneten Regressionsmodells und beschreibt zu welchem Anteil ein Faktor die Variabilität der Daten erklärt).

Für die Varianzanalyse wurden die Daten zunächst tabellarisch erfasst (Originaldaten siehe Anhang). Dabei wurden die Parameter wie die Salzkonzentration, die Region, die Population, die Anzuchtammer sowie die

<sup>12</sup> Perzentile sind Hilfsmittel zur Beschreibung der Verteilung von ordinalen und stetigen Daten ohne irgendwelche Verteilungsmaßnahmen (wie z.B. Normalverteilung)

<sup>13</sup> Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  gibt das Verhältnis des Anteils der Streuung der Punkte um ein Regressionsgeraden zur Gesamtstreuung an und stellt somit ein Maß für die Schärfe, mit der die Gerade bestimmt wird zur Verfügung (Sachs 2002).

Summe der gezählten Zysten aufgenommen und für die statistische Auswertung codiert (Codetabelle s. Anhang).

Mit Hilfe des Programms GENSTAT und R<sub>GUI</sub> (Venables & Ripley 1999, Krause & Olson 2000) wurde auf Normalverteilung und Varianzhomogenität als Voraussetzung für eine ANOVA geprüft.

Es wurde der Einfluss folgender 5 Parameter auf die Anzahl der Zysten pro Pflanze mittels einer ANOVA analysiert:

- Sorten (Kultur- und Wildrüben)
- Region (Nordsee, Ostsee, Italien und der Kulturrübe)
- Populationen
- Gewächshauskammern
- Salzkonzentration

## **3.5 Methoden zur Bestimmung der genetischen Diversität**

### **3.5.1 DNA-Gewinnung**

Bei der Probenahme zur anschließenden DNA-Extraktion wurden die frischen Primärblätter beprobt, die nach 4-5 Wochen vollständig ausgebildet sind. Bei den Primärblättern erfolgt Wachstum vor allem durch Zellstreckung und nicht durch Zellteilung, d.h. die Menge an genomischer DNA ist bei allen Proben miteinander vergleichbar. Das mit einer Pinzette entnommene Blattmaterial wird in ein Reaktionsgefäß (2ml) gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Probe kann entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -50°C aufbewahrt werden.

### **Methoden der DNA-Extraktion**

Für die molekularen Untersuchungen wurde DNA mit Hilfe eines Plant Mini Kit der Firma Qiagen isoliert. Für angewandte Methoden, wie AFLP und PCR-RFLP-Analyse sollte eine saubere DNA ohne störende Inhaltsstoffe vorliegen. Um das Ergebnis zu erhalten, wurde nach einigen unterschiedlichen DNA-Extraktionen die Methode mit Hilfe des Kits von Qiagen als optimal empfunden.

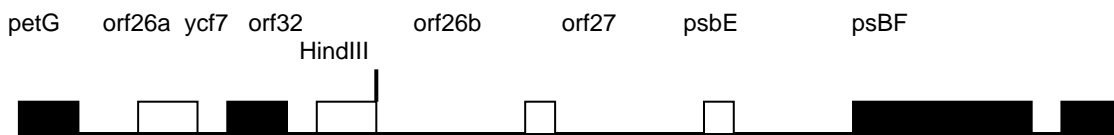
Das Pflanzenmaterial wurde unter Einsatz von flüssigem Stickstoff gemörsert und sofort mit 500µl Lysispuffer und 4µl Rnase (100mg/ml) überschichtet. Die Mischung wurde homogenisiert. Diese Suspension wurde nach dem Mischen für

ca. 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Während der Inkubation sollten die Proben 2-3-mal vorsichtig invertiert werden. Das Lysat wurde nun mit 130µl Puffer überschichtet, der als Detergenz fungiert und die Proteine und Polysaccharide ausfällt. Dazu wurden die Proben 5 Minuten auf Eis gestellt. Um die ausgefallenen Stoffe aus der Lösung zu entfernen, wurden die Proben 5 Minuten bei höchster Stufe (ca. 13.000rpm) zentrifugiert. Es ist möglich, dass bei einigem Pflanzenmaterial das Lysat sehr viskos ist und viel Material ausfällt, daher wurde die Suspension im nächsten Schritt mit Hilfe einer Silicagel-Membran geschert. Dazu musste der Überstand in eine so genannte QIAshredder Säule überführt werden. Durch zweiminütige Zentrifugation wurde die Suspension durch die Säule gedrückt. Die Säule hält die möglichen Ausfälle und Zellbestandteile zurück, aber ein bisschen kann durchdringen und es kann sich ein Pellet bilden. Das Pellet darf nicht zerstört werden, sonst müsste der vorangegangene Schritt wiederholt werden. Nun wurde die flüssige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei einer Menge von 450µl Lysat wurde ein 1,5faches Volumen von einem Puffer zugegeben, der die DNA ausfällt. Daher wurde die Suspension vorsichtig und gut gemischt. Von der Suspension wurden 650µl abgenommen und auf eine minispin Säule überführt. Diese Säule hält die ausgefallene DNA aus der Suspension bei der einminütigen Zentrifugation von 8.000rpm zurück. Die Suspension wurde dann verworfen und die Säule wurde mit der restlichen DNA Suspension überschichtet. Zum Waschen der DNA, die sich auf der Membran befindet, wurden 500µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Um die Membran vom Ethanol zu befreien, muss die Membran ca. 20 Minuten abdampfen. Danach wurden die Membranen mit Elutionspuffer überschichtet und eine Minute zentrifugiert. Dieser Puffer löst die DNA von der Membran.

Die so gewonnene DNA wurde zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert oder für einen längeren Zeitraum bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

### 3.6 PCR-RFLP zur Bestimmung von CMS Markern

Das Owen Cytoplasma männlich steriler Zuckerrüben ist verknüpft mit verschiedenen Änderungen mitochondrialer DNA und einer *HindIII*-Schnittstelle der cpDNA (Saumitou-Laprade et al. 1993). Desplanque et al. (2000) konnte zudem ein strenges Kopplungsgleichgewicht zwischen verschiedenen Chloro- und Mitotypen bei Wildrüben nachweisen. Ran und Michaelis (1995) klonierten und sequenzierten die *HindIII*-Schnittstelle der cpDNA männlich steriler Zuckerrüben und fanden heraus, dass durch den Austausch von Thymin gegen Cytosin an Nukleotid 519 in der Genregion von *petG*, *ycf7*, *psbE* und *psbF* eine neue *HindIII*-Schnittstelle entstanden ist (Abb.3.3).



**Abb.3.3:** Karte der sequenzierten cpDNA-Region. Schwarze Kästchen zeigen kodierende Regionen an. Die Lage der polymorphen *HindIII*-Schnittstelle ist eingezeichnet (Ran und Michaelis 1995).

Der gefundene Chlorotyp ist verbunden mit dem Mitotyp *Svulg* bzw. CMS (Cytoplasmatic Male Sterility). Mit Hilfe der bekannten Sequenz konnten Primer Tab.3.5 entwickelt werden, um die Region spezifisch zu amplifizieren. Ein anschließender Verdau mit *HindIII* erbringt den Nachweis, ob die CMS in Verbindung stehende Schnittstelle vorhanden ist oder nicht (PCR-RFLP). Ist die Schnittstelle vorhanden, können zwei Fragmente in einem Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Für diese Untersuchung wurden 24 Populationen von *B. vulg. ssp. maritima* untersucht. 19 Populationen waren italienischer Herkunft, 4 Populationen kamen von der deutschen Ostseeküste, eine von der Nordseeinsel Helgoland und die Wildrübe *B. procumbens* wurde in die Untersuchungen mit einbezogen. Als Kontrolle diente eine Kulturrübe (Tab.3.1). Im Hinblick auf mögliche Veränderung innerhalb der Populationen wurde Material unterschiedlicher Jahre verwendet. Dazu wurden die Proben aus den Jahren 1994 (falls Material vorhanden war) und aus 2001 analysiert.

Für die PCR-RFLP wurde ein modifiziertes Protokoll Tab.3.7 von Ran und Michaelis (1995) angewendet. Es wurde die Menge an vorgelegter DNA, an die PCR-Komponenten, die in diesem Protokoll beschrieben wurden, angepasst (Tab.3.6).



**Tab.3.5:** Sequenz der eingesetzten Primer

|          |                         |
|----------|-------------------------|
| Primer 1 | CAG TTA CAA ATA ATC CAG |
| Primer 2 | CAC GAT ATG TGT A GA TG |

**Tab.3.6:** PCR-Komponenten, die für die Amplifikation verwendet wurden.

|                          | Endkonzentration | Volumen pro Probe |
|--------------------------|------------------|-------------------|
| 10xTaq Puffer            | 1 x              | 1,5µl             |
| dNTP`s (2mM)             | 200 µM           | 1,2µl             |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM) | 3,5 mM           | 2,1µl             |
| Primer 1                 | 0,2 µM           | 0,4µl             |
| Primer 2                 | 0,2µM            | 0,4µl             |
| Taq-Polymerase 5u/µl)    | 0,5 u/µl         | 0,1µl             |
| H <sub>2</sub> O         |                  | add. 5,31µl       |
| DNA                      |                  | 11µl              |
| Summe                    |                  | 10µl              |

Zu 11µl PCR-Mix werden 4µl template DNA zugegeben

**Tab.3.7:** PCR-Bedingungen der selektiven Amplifikation

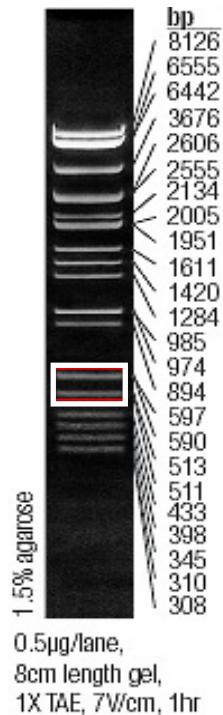
| step | Dauer         | Temperatur | Vorgang         |
|------|---------------|------------|-----------------|
| 1    | 3'            | 94°C       | Taq Aktivierung |
| 2    | 45''          | 92°C       | Denaturierung   |
| 3    | 45''          | 43°C       | Annealing       |
| 4    | 2'            | 72°C       | Synthese        |
| 5    | 35 x step 2-4 |            |                 |
| 6    | 10'           | 72°C       | Auffüllsystem   |

Die Amplifikation erfolgte nach dem in Tab.3.7 beschriebenen Protokoll. Nach der Amplifikation wurden 5µl des Ansatzes auf einem 1,2%igem Agarose-Minigel (gepuffert mit 1x TBE) aufgetragen, um die PCR zu überprüfen. Anschließend wurden weitere 5µl des PCR-Ansatzes mit einem Restriktionsenzym verdaut.

**Tab.3.8:** Restriktionsvolumen für die Restriktion

|                         | Endkonzentration | Volumen |
|-------------------------|------------------|---------|
| 10 x Restriktionspuffer | 1x               | 1µl     |
| Enzym <i>Hind</i> III   | 3U               | 0,5µl   |
| H <sub>2</sub> O        |                  | add 5µl |

**Abb. 3.4:**  
 Längenstandard  $\lambda$ DNA/  
 Eco47 I \*  
 Markiert sind die  
 Banden zwischen 511  
 und 597 Basenpaar-  
 länge. Liegt die nach  
 der Gelelektrophorese  
 sichtbare Bande zwi-  
 schen den beiden mar-  
 kierten Banden, so  
 handelt es sich um DNA  
 einer Wildrübe. Liegt  
 die gefundene Bande  
 unterhalb der Mar-  
 kierung, so handelt es  
 sich um DNA einer  
 Kulturrübe.



Die Reaktion (Tab.3.8) wurde für zwei Stunden in einem Thermoblock bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Verdau auf ein 2%iges Agarosegel (gepuffert mit 1x TBE) aufgetragen und fotografiert. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe von Ethidiumbromid. Als Größenmarker wurde eine 100kb Ladder verwendet (Abb.3.4).

### 3.7 Methode der AFLP

Die AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)-Technik (Vos et al. 1995) stellt eine Methode dar, die sich zur Erfassung genetischer Diversität eignet. Vergleicht man die AFLPs mit Techniken, wie den RFLPs oder RAPDs, so erweist sich diese als weniger arbeitsaufwendig und besser reproduzierbar. Bei einem Vergleich der verschiedenen Methoden zeigte die AFLP Technik einen höheren Polymorphiegrad als die beiden anderen Methoden (Powell et al. 1996, Milbourne et al. 1997). Polymorphismen treten durch unterschiedlich lange amplifizierte Fragmente auf, die mit Hilfe einer **P**olyacrylamid-**G**el- **E**lektrophorese (PAGE) aufgetrennt werden können. Aus diesen Gründen stellte die AFLP-Analyse die beste Methode im Bereich der innerartlichen Diversität und verwandtschaftlicher Beziehungen von *B. vulg. ssp. maritima* dar. Die AFLP-Technik basiert auf dem Prinzip einer selektiven PCR von Restriktionsfragmenten, die nach dem Verdau genomischer DNA mit Restriktions-Endonukleasen entstanden sind. Der Ablauf der AFLP-Analyse ist folgender: Die genomische DNA wird mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen komplett verdaut: Einem häufig schneidenden Enzym MseI mit einer 4-bp-Erkennungssequenz und einem selten schneidenden Enzym EcoRI mit einer 6-bp-Erkennungssequenz. An den entstandenen Fragmenten werden Oligonukleotid-Adapter ligiert, die eine Erkennungssequenz für weitere Amplifikationen der Fragmente mit speziellen

Primern liefern. Um die Häufigkeit der aufgetretenen Fragmente zu verringern, werden in der Präamplifikation nur diejenigen mit Adaptern ligierte Fragmente amplifiziert, deren Sequenz auf einen um eine Base verlängerten Primer passt. In einer zweiten selektiven Amplifikation, wird die Anzahl der amplifizierten Fragmente erneut verringert, indem Primer eingesetzt werden, die noch um zwei weitere Basen verlängert wurden. Hinzu kommt, dass die EcoRI-Primer mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden, so dass nur Fragmente unter Beteiligung dieses Primers bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Es können auf diese Weise mit der AFLP Technik in der Regel bis zu 100 auswertbare Fragmente erzeugt werden. Damit steht auch eine hohe Anzahl an nutzbaren Polymorphismen zur Verfügung.

### 3.7.1 Durchführung der AFLP

#### Restriktion

In einem Doppelverdau wurde die zuvor isolierte genomische DNA mit den beiden Restriktionsenzymen MseI und EcoRI geschnitten. Um eine optimale Restriktion zu erreichen sollte die eingesetzte DNA-Menge nicht unter 100ng liegen (Vos et al. 1995).

In Vorversuchen wurden durch verschiedene Ansätze mit variierenden Enzymkonzentrationen, unterschiedlicher Inkubationsdauer und Temperatur die Bedingungen für die Restriktion von Rüben-DNA optimiert.

Die einzelnen Bestandteile des Restriktionsansatzes in der Pipetierreihenfolge, sowie ihre Endkonzentration sind in Tab.3.9 aufgeführt. Um einen partiellen Verdau der DNA zu vermeiden, wurden beide Restriktionsenzyme im Überschuss zugegeben.

**Tab.3.9:** Auflistung der einzelnen Komponenten der Restriktion

|                         | Endkonzentration | pro Probe |
|-------------------------|------------------|-----------|
| DNA                     | 0,5µg            | 10-43     |
| EcoRI                   | 5 units          | 0,5µl     |
| MseI                    | 2 units          | 0,3µl     |
| 10xRL-Puffer (y+/Tango) | 5µl              | 5µl       |
| H <sub>2</sub> O steril |                  | add. 50µl |

Die Reaktion für die Restriktion erfolgt in einem 1,5ml Reaktionsgefäß. Der Reaktionsmix, mit einem Endvolumen von 50µl, wurde in der in Tab.3.9 genannten Reihenfolge der Komponenten vermischt und zur optimalen DNA-

Menge zugegeben. Der Ansatz wurde in einem Thermoblock bei 37°C 2 Stunden inkubiert. Um den Verdau zu beenden, wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

#### Ligation

Durch die Ligation der Adaptoren an die Schnittstellen der beiden Enzyme wurden Anlagerungsstellen bekannter Sequenz für die Primer der nachfolgenden PCR-Schritte gebildet. Durch die Ligation der Adaptoren wurde eine Wiederherstellung der Restriktionsschnittstellen verhindert. Die genaue Basensequenz der einzelnen Adaptoren ist in Tab.3.10 aufgelistet. Die einzelnen synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden in äquimolaren Mengen vermischt, um doppelsträngige Adaptoren zu bilden.

**Tab.3.10:** Oligonukleotidsequenz der Adaptoren

| Bezeichnung | Sequenz                      | Adaptor                        |
|-------------|------------------------------|--------------------------------|
| A Eco a     | 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' | 5'-CTC GTA TAG ACT GCG TAT ACC |
| A Eco b     | 5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3'    | CTG ACG CAT GGT TAA-5'         |
| A Mse a     | 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'  | 5'-GAC GAT GAG TAA TGA G       |
| A Mse b     | 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'     | TAC TCA GGA CTC AT-5'          |

Aufgrund der erhöhten Anzahl an Fragmenten durch das Restriktionsenzym MseI, wurde die Konzentration an Mse-Adaptoren, die zur restringierten DNA gegeben wurden, angepasst. Zu den 50µl Restriktionsansatz wurden 10µl des Ligationsansatzes zugegeben. Die einzelnen Bestandteile des Ligationsansatzes sind der Tab.3.10 zu entnehmen. Die Proben wurden über Nacht in einem Thermokonstantraum bei 14°C inkubiert. Nach Beendigung der Ligation wurde die Reaktion für 1h bei -20°C gestoppt. Zur Kontrolle der Restriktion wurden 10µl des Restriktions/Ligationsansatzes mit 8µl Längenstandard (Lambda DNA/Eco47I) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und für etwa 90min bei 110V mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt.

**Tab.3.11:** Übersicht der Bestandteile für die Ligation

|                         | Endkonzentration | pro Probe |
|-------------------------|------------------|-----------|
| EcoRI-Adapter           | 5 pmol/µl        | 1µl       |
| MseI-Adapter            | 50 pmol/µl       | 1µl       |
| 10xRL-Puffer            | 1x               | 1µl       |
| DNA-Ligase              | 1 u              | 1µl       |
| H <sub>2</sub> O steril |                  | 6µl       |

**Präamplifikation**

Um die Anzahl der vorhandenen DNA-Fragmente für eine sinnvolle Auswertung einzuschränken, wurden bei der Präamplifikation Primer mit je einer zusätzlichen Base eingesetzt. Die genauen Basensequenzen der Primer sind der Tab.3.12 zu entnehmen.

**Tab.3.12:** Basensequenzen der Primer für die Präamplifikation

| Primer+1 | Basensequenz                 |
|----------|------------------------------|
| E + A    | 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3' |
| M + C    | 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3' |

Vor Beginn der Präamplifikation wurde die RL-DNA 1:10 verdünnt, da ihre Konzentration für den Einsatz in der PCR zu hoch war.

Zu den in Tab.3.13 beschriebenen Komponenten für die PCR wurden zu 48,5µl Ansatz 1,5µl der verdünnten DNA (1:10) zugegeben.

**Tab.3.13:** Komponenten für die Präamplifikation

|                          | Endkonzentration | Volumen/pro Probe |
|--------------------------|------------------|-------------------|
| 10xTaq Puffer            | 1x               | 5µl               |
| dNTP's (2mM)             | 0,2 mM           | 5µl               |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM) | 2,5 mM           | 2,5µl             |
| Primer E+1 (50ng/µl)     | 1,5 ng/µl        | 1,5µl             |
| Primer M+1 (50ng/µl)     | 1,5 ng/µl        | 1,5µl             |
| Taq-Polymerase (5u/µl)   | 0,05u/µl         | 0,5µl             |
| H <sub>2</sub> O         |                  | add. 50µl         |
| RL-Mix (1:10)            |                  | 1,5µl             |
| Summe                    |                  | 50µl              |

Die PCR-Reaktion lief mit Hilfe des in Tab.3.14 beschriebenen Temperaturprogramms ab.

**Tab.3.14:** PCR-Bedingungen der Präamplifikation

| step | Dauer          | Temperatur |               |
|------|----------------|------------|---------------|
| 1    | 3'             | 94°C       | Denaturierung |
| 2    | 30''           | 94°C       | Denaturierung |
| 3    | 60''           | 56°C       | Annealing     |
| 4    | 1'             | 72°C       | Synthese      |
| 5    | 19 x Stepp 2-4 |            |               |
| 6    | 5'             | 72°C       | Synthese      |

Die Gesamtdauer des Programms betrug 1h 17min. Nach Ablauf des Programms wurde die erfolgte Amplifikation mit jeweils 10µl auf einem 1%igem Agarosegel bei 110V (ca.90min) überprüft.

### Selektive Amplifikation

Durch eine weitere Amplifikation wurden die spezifischen Fragmente verringert und andere angereichert. Dazu wurden hier Primer eingesetzt, die jeweils drei zusätzliche ausgewählte Basen besitzen (+3 Primer). Die nachfolgende Tabelle 3.15 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer.

**Tab.3.15:** Basensequenzen der Primer für die Präamplifikation

|     | Mse                       | Eco                         |
|-----|---------------------------|-----------------------------|
| P4  | GAT GAG TCC TGA GTA ACA T | GAC TGC GTA CCA ATT CAC T   |
| P5  | GAT GAG TCC TGA GTA ACA T | GAC TGC GTA CCA ATT CAC ATG |
| P7  | GAT GAG TCC TGA GTA AAC T | GAC TGC GTA CCA ATT CAC CTT |
| P12 | GAT GAG TCC TGA GTA AAA C | GAC TGC GTA CCA ATT CAC CGT |
| PU  | GAT GAG TCC TGA GTA AAT   | GAC TGC GTA CCA ATT CAC CGC |

Da die DNA nach der Präamplifikation in einer hohen Konzentration vorlag, wurde sie für die selektive PCR 1:20 verdünnt. Die einzelnen Bestandteile der selektiven Amplifikation und ihre Konzentration sind in Tab.3.16 aufgeführt.

**Tab.3.16:** PCR-Komponenten der selektiven +3-Amplifikation

|                          | Endkonzentration | Volumen   |
|--------------------------|------------------|-----------|
| 10xTaq Puffer            | 1 x              | 1µl       |
| dNTP's (2mM)             | 0,2 mM           | 1µl       |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM) | 2,5 µl           | 0,5µl     |
| Primer E+3 (10ng/µl)     | 0,25 ng/µl       | 0,25µl    |
| Primer M+3 (50ng/µl)     | 0,3 ng/µl        | 0,3µl     |
| Taq-Polymerase (5u/µl)   | 0,02 u/µl        | 0,04µl    |
| H <sub>2</sub> O         |                  | add. 10µl |
| DNA (1:20)               |                  | 2,5µl     |
| Summe                    |                  | 10µl      |

Zu den 7,5µl des PCR-Ansatzes wurden jeweils 2,5 µl der verdünnten DNA (1:20) aus der Präamplifikation als template DNA zugegeben. Die selektive +3 Amplifikation wurde mit dem in Tab.3.17 aufgelisteten PCR-Programm durchgeführt.

**Tab.3.17:** PCR-Bedingungen der selektiven Amplifikation

| step | Dauer  | Temperatur | Vorgang       |
|------|--|------------|---------------|
| 1    | 3'   | 94°C       | Denaturierung |
| 2    | 30''   | 94°C       | Denaturierung |
| 3    | 30''   | 65°C       | Annealing     |
| 4    | 1'   | 72°C       | Synthese      |
| 5    | 30''   | 94°C       | Denaturierung |
| 6    | 30''   | 65°C       | Annealing     |
| 7    | 1'   | 72°C       | Synthese      |
| 8    | 10 x step 5-7 mit einer Temperatur Erniedrigung von 0,7°C pro step |            |               |
| 9    | 30''   | 94°C       | Denaturierung |
| 10   | 30''   | 58°C       | Annealing     |
| 11   | 1'   | 72°C       | Synthese      |
| 12   | 23 x step 9-11   |            |               |
| 13   | 5'   | 72°C       | Auffüllsystem |

Um eine optimale Primerselektivität zu garantieren, wurde zu Beginn der PCR eine höhere Temperatur für die Anlagerung der Primer gewählt. Diese Annealingtemperatur wurde in den folgenden Schritten in Stufen von 0,7°C von 65°C auf 58°C herabgesetzt. Durch die niedrige Annealingtemperatur konnte eine bessere Hybridisierung der Primer gewährleistet werden. Das Programm hatte eine Gesamtdauer von 1h und 55min.

### 3.7.2 Auswertung der DNA-Fingerprint Techniken

Bei den AFLP-Daten wurden nur solche Polyacrylamid-Gele (PAGE) ausgewertet die in ihrem Fragmentmuster reproduzierbar waren. Dafür wurden sämtliche Reaktionen mit derselben Ausgangs-DNA mindestens zweimal wiederholt und die Bandenmuster visuell miteinander verglichen.

#### Bestimmung des Polymorphiegrades

Zur Erfassung der genetischen Variabilität wurde der Polymorphiegrad der Bandenmuster ermittelt. Durch den Vergleich der Übereinstimmung von Bandenmuster einzelner Individuen können verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Populationen und Individuen bestimmt werden.

Zuerst wurde der Monomorphiegrad (MG) berechnet (**Formel 1**). Dazu teilt man die Anzahl monomorpher Banden durch die Anzahl der insgesamt in der jeweiligen Population gefundenen Banden. Als monomorph werden die Banden bezeichnet, die bei jedem Individuum einer Population auftreten.

**Formel 1** zur Berechnung des Monomorphiegrades (MG)

|    |  |
|----|--|
| MG | $(m/n)$  |
| m  | Anzahl monomorpher Banden  |
| n  | Gesamtzahl aller Banden innerhalb der Individuen aller Standorte |

Durch den Monomorphiegrad lässt sich der Polymorphiegrad (PG) berechnen (**Formel 2**). Er wird in Prozent angegeben.

**Formel 2** zur Berechnung des Polymorphiegrades (PG):

|    |                     |
|----|---------------------|
| PG | $(1-MG) \times 100$ |
|----|---------------------|

#### Numerische Verfahren

Die Auswertung der Banden wurde mit Hilfe des Computerprogramms Treecon; Version 1.2 (van de Peer & de Wachter 1994) berechnet. Die Werte, die für das Programm notwendig waren, wurden als 0/1er Matrix dargestellt. Danach wurde

die Anzahl aller auftretenden Banden je nach ausgewerteter Bande eine 1 und jeder fehlenden Bande eine 0 zugeordnet. Aus diesen Berechnungen wurden Clusteranalysen durchgeführt, die in Dendogrammen graphisch dargestellt wurden.

Die Umrechnung der Datenmatrix in eine Distanzmatrix erfolgt durch eine **Formel 3** nach Nei und Li (1979), mit der die genetischen Distanz (GD) aller möglichen Paarbildungen erreicht wurde.

**Formel 3** zur Berechnung der genetischen Distanz:

|            |   |
|------------|---|
| $GD_{xy}$  | $(1 - (2 n_{xy} / (n_x + n_y))) \times 100$                 |
| $n_x; n_y$ | Anzahl der ausgeprägten Merkmale des jeweiligen Individuums |
| $n_{xy}$   | Anzahl der gemeinsamen Merkmale beider Individuen           |

Die Distanzmatrix beschreibt die genetische Distanz eines Individuums zu allen anderen Individuen. Dadurch ist es möglich, die durchschnittliche Distanz eines Individuums innerhalb eines Fundortes als auch die der anderen Populationen aufzuzeigen. Zu den genetischen Distanzen werden auch mögliche Standardabweichungen ermittelt. Aus der Distanzmatrix lassen sich verschiedene numerische Clusterverfahren herleiten. Als Ergebnis entsteht ein Dendogramm, in dem die verwandtschaftlichen Verhältnisse der untersuchten Populationen graphisch dargestellt wurden. Es können drei unterschiedliche Dendogramme erstellt werden, die auf unterschiedlichen Clusterverfahren beruhen:

#### **UPGMA** (Sneath & Socal 1973)

(unweighted pair-group method using arithmetic averages)

Diese Methode verbindet die OUT's (operational taxonomic units) durch arithmetische Mittel der Distanzen der Mitglieder der OUT's.

Um die Daten nach populationsbiologischen Aspekten auszuwerten, wurde zusätzlich mit dem Computerprogramm POPGENE gearbeitet. Dabei wurden für jede Population die Allelfrequenzen der Fragmente als Maß für die genetische Diversität bestimmt (Nei 1978).



## IV Ergebnisse

### 4.1 Populationsdaten

Die natürlich vorkommenden Wildrübenpopulationen der italienischen Po-Ebene sind überwiegend standorttreu, variieren aber hinsichtlich ihrer Populationsgröße im Vergleich einzelner Jahre (1994-2001) erheblich (Tab.4.1). Da die Populationen an Standorten zu finden waren, die teils auch wirtschaftlich genutzt wurden (Tab.4.2), fielen sie in manchen Jahren Pflegemaßnahmen zum Opfer (Abb.4.1). Es war zu beobachten, dass nach solchen Pflegemaßnahmen sich die Bestände wieder regenerieren konnten. Dies kann durch die dort im Boden verbliebenen Samen geschehen sein oder es handelte sich um eine Neubesiedlung. In der Tabelle 4.4 werden die Populationen ihrer Lage nach beschrieben

**Tab.4.1:** Übersicht über die untersuchten Populationen in der Po-Ebene (Italien) im Zeitraum zwischen 1994 und 2001. Populationen mit mehr als 100 Individuen wurden geschätzt. Bei der Abkürzung n.d. wurden die Populationen für dieses Jahr nicht detektiert.

| Nr. | Standort              | 1994 | 1995 | 1996  | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 |
|-----|-----------------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
| 1   | Cervia Saline         | 0    | n.d. | n.d.  | 200  | 400  | 30   | 8    | 6    |
| 2   | Ancona (Portonovo)    | n.d. | n.d. | n.d.  | 3    | 25   | n.d. | n.d. | n.d. |
| 3   | Numana                | n.d. | n.d. | n.d.  | 23   | 23   | 20   | n.d. | 24   |
| 4   | Sirola                | n.d. | n.d. | n.d.  | n.d. | 200  | n.d. | n.d. | n.d. |
| 5   | Bocassette            | 70   | 87   | >50   | 20   | 21   | 5    | 14   | 100  |
| 6   | Scanarello            | 8    | 74   | 1     | 7    | 3    | 4    | 36   | 60   |
| 7   | Porto Levante (Hafen) | 3    | 3    | 6     | 13   | 32   | 23   | 25   | 21   |
| 8   | Albarella (Hafen)     | 2    | 27   | 6     | 6    | 1    | 6    | 8    | 2    |
| 9   | Albarella (Club)      | >100 | >100 | 28    | 61   | 83   | 5    | 55   | 107  |
| 10  | Rosolina Mare         | 1    | 0    | n.d.  | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 11  | Chioggia              | >100 | 30   | >100  | 17   | 200  | n.d. | n.d. | 46   |
| 12  | Pellestrina           | 23   | 30   | 12    | 12   | 0    | n.d. | 0    | 88   |
| 13  | Porto di Malamocco    | 70   | n.d. | 8     | 18   | 20   | n.d. | 20   | 54   |
| 14  | San Pietro in Volta   | n.d. | n.d. | n.d.  | 3    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 15  | Alberoni Leuchtturm   | 35   | 30   | 12    | 37   | 70   | n.d. | n.d. |      |
| 16  | Fusina                | 60   | 89   | 10    | 124  | 203  | n.d. | 11   | 123  |
| 17  | Venedig Park          | n.d. | n.d. | n.d.  | n.d. | 500  | n.d. | n.d. | n.d. |
| 18  | Cimitero San Michele  | 5    | n.d. | >600  | 46   | 200  | n.d. | 90   | 170  |
| 19  | San Erasmo (Schleuse) | n.d. | n.d. | 20    | 38   | 12   | n.d. | n.d. | 200  |
| 20  | Murano                | 5    | n.d. | n.d.  | n.d. | 220  | n.d. | n.d. | 30   |
| 21  | Torcello (Weg)        | n.d. | n.d. | >70   | 180  | 200  | n.d. | >100 | 800  |
| 22  | Punta Sabbione        | 10   | 1    | 1     | 0    | 0    | n.d. | n.d. | 0    |
| 23  | Bibione (Valpelina)   | n.d. | n.d. | >1200 | >500 | 60   | n.d. | n.d. | 27   |
| 24  | Ausa Corno            | 18   | 4    | 20    | 12   | 0    | 2    | n.d. | 66   |
| 25  | Grado Damm            | 50   | >200 | >100  | 51   | 65   | n.d. | 5    | 49   |



**Abb.4.1:** Standort Fusina, nahe eines Gewerbegebietes und Campingplatzes.

**Tab.4.2:** Kurzbeschreibung der Standorte

| Standort        | Lage                          | Beschreibung der Standorte im Hinblick auf Veränderungen   |
|-----------------|-------------------------------|--|
| Grado           | geschützter Steindeich        | Einfluss durch Pflegemaßnahmen, liegt in Meeresnähe  |
| Ausa Corno      | Steindeich, mit Schilfbewuchs | Einfluss durch Pflegemaßnahmen, liegt in Meeresnähe  |
| Bibione         | Erdreich                      | Einfluss durch Pflegemaßnahmen, kaum Einfluss durch den Meeressaum                               |
| Torcello        | Feldwegrand                   | Lage im Meeressaum, kein Einfluss durch den Mensch   |
| San Erasmo      | Kanalböschung                 | kaum Einfluss durch Mensch und Meeressaum  |
| San Michele     | Bauplatz                      | direkter Kontakt mit dem Meer, bis dahin kein Einfluss durch den Menschen                        |
| Fusina          | Campingplatz                  | Einfluss durch den Meeressaum, menschlicher Einfluss durch Pflegemaßnahmen                       |
| Alberoni        | Meerdeich                     | ständiger Einfluss durch Pflegemaßnahmen   |
| Malamocco       | Lagunen Ufer                  | Nähe zum Meeressaum, kein Einfluss durch Pflegemaßnahmen   |
| Pellestrina     | Steindeich                    | geringe Einflüsse durch Mensch und Meeressaum  |
| Chioggia        | Garten                        | kein Einfluss durch Pflegemaßnahmen, indirekte Nähe zum Meeressaum                               |
| Albarella Hafen | Steindeich                    | geringer Einfluss durch Mensch und Meeressaum+   |
| Albarella Club  | Deichwiese                    | kein Einfluss durch Pflegemaßnahmen, Nähe zum Meeressaum   |
| Porto Levante   | Deichwiese                    | kaum Pflegemaßnahmen, direkter Meereskontakt   |
| Boccassette     | Meerdeich                     | Pflegemaßnahmen durch den Mensch, indirekter Kontakt zum Meeressaum                              |
| Cervia          | Sallinendeich                 | starke Pflegemaßnahmen (Nähe zu Saatgutproduktionsfeldern, ständiger Kontakt mit dem Meeressaum) |
| Numana          | erodierte Steilküste          | kaum Kontakt durch den Mensch und Meeressaum   |

## 4.2 Auswertung der Bodenproben

Zur Charakterisierung des Bodens einzelner Standorte, wurde zunächst der pH-Wert gemessen, die Bodenart visuell bestimmt und die Bindigkeit anhand einer Fingerprobe geprüft (Tab.4.3). Durchweg zeigt der Boden eine sandige bis steinige Struktur, wie er meist in der Nähe von Meeressäumen zu finden ist. Der pH-Wert lag im Durchschnitt von 7,8 im basischen Bereich. Dies lässt sich auch durch die Nähe des salzhaltigen Meerwassers erklären (pH-Wert 7,8-8,2).

**Tab.4.3:** Charakterisierung der Bodenproben einzelner Wildrübenstandorte an der italienischen Adriaküste. a bis d gibt die Parallelen an, die von dem Boden als Proben gezogen wurden.

| Standort             |   | Bodenart  | Fingerprobe  | pH-Wert |
|----------------------|---|---|--------------|---------|
| Albarella Club       | a | Meeressand, Muschelreste, kleine Kiesel             | nicht bindig | 7,15    |
| Albarella Club       | b | Streu, viele Schwebstoffe, kleine Kiesel, graubraun | nicht bindig | 8,15    |
| Albarella Club       | c | grobkörnig, viele Steinchen, grau, Schwebstoffe     | nicht bindig | 7,86    |
| Albarella Hafen      | a | braun/schwarz, steinig, Schwebstoffe, Muschelreste  | nicht bindig | 8,42    |
| Albarella Hafen      | b | helle Färbung, viele Steine, keine Schwebstoffe     | nicht bindig | 9,63    |
| Albarella Hafen      | c | feiner Sand, keine Schwebstoffe                     | nicht bindig | 8,27    |
| Ausa corno           | a | hell kieselig, grob, kein Meeressand, grau          | nicht bindig | 7,40    |
| Ausa corno           | b | hell grau, kein Meeressand                          | nicht bindig | 8,06    |
| Bibione              | a | grob körnig, grau                                   | nicht bindig | 8,10    |
| Bibione              | b | fein, dunkelgrau, org. Rückstände, Schwebstoffe     | nicht bindig | 8,13    |
| Bibione              | c | grober Sand, keine org. Bestandteile, grau, schäumt | nicht bindig | 8,15    |
| Bibione              | d | hellgrau, fein, ein paar Kiesel                     | nicht bindig | 8,28    |
| Boccasette           | a | Streu, Meeressand, Muschelreste, grau, Schwebstoffe | nicht bindig | 7,96    |
| Boccasette           | b | Meeressand, wenige org. Bestandteile, grau          | nicht bindig | 7,85    |
| Cervia               | a | hellgrau, Kiesel, Steine, Streu, Schwebstoffe       | nicht bindig | 7,38    |
| Cervia               | b | Steine, lösen sich auf, Kalksteine, grau,           | nicht bindig | 8,45    |
| Cervia               | c | Sand, grob, Schwebstoffe                            | nicht bindig | 7,76    |
| Chioggia             | a | Meeressand mit Kiesel                               | nicht bindig | 7,73    |
| Chioggia             | b | hellbraun, Sand, Muschelreste                       | nicht bindig | 7,82    |
| Chioggia             | c | feiner Sand, grau, Schwebstoffe                     | nicht bindig | 7,82    |
| Fusina               | a | Sand, grau färbt Wasser bräunlich                   | nicht bindig | 7,83    |
| Grado                | a | Sand, grau, färbt Wasser                            | nicht bindig | 7,86    |
| Numana               | a | Kiesel, keine Schwebstoffe, klares Wasser           | nicht bindig | 6,87    |
| Numana               | b | kalkig, Kiesel                                      | nicht bindig | 6,70    |
| Numana               | c | kalkig  | nicht bindig | 6,81    |
| Numana               | d | kalkig, weißlich, färbt Wasser                      | nicht bindig | 7,14    |
| Pellestrina          | a | staubig, grau, fein, färbt Wasser                   | nicht bindig | 7,55    |
| Pellestrina          | b | hellgrau, färbt Wasser                              | nicht bindig | 7,66    |
| Pellestrina          | c | grau, Schwebstoffe                                  | nicht bindig | 7,63    |
| Pietro in Volta      | a | grau, feiner Sand, Streu                            | nicht bindig | 8,46    |
| Pietro in Volta      | b | Streu, Meeresreste, feiner Sand, grau, Schwebstoffe | nicht bindig | 8,49    |
| Pietro in Volta      | c | feiner Sand, keine Meeresreste, färbt Wasser        | nicht bindig | 8,33    |
| Pietro in Volta      | d | Strandreste, kleine Kiesel, Schwebstoffe            | nicht bindig | 7,56    |
| Porto Levante        | a | grauer Sand, klumpig, klares Wasser, Schwebstoffe   | nicht bindig | 7,52    |
| Porto Levante        | b | grauer Sand, färbt Wasser                           | nicht bindig | 7,61    |
| San Erasmo           | a | Streu, klares Wasser, Schwebstoffe                  | nicht bindig | 7,72    |
| San Erasmo           | b | Streu, feiner Sand, Schwebstoffe                    | nicht bindig | 7,69    |
| San Erasmo           | c | feiner Sand, staubig                                | nicht bindig | 7,87    |
| Cimitero San Michele | a | staubig, grau                                       | nicht bindig | 7,95    |
| Cimitero San Michele | b | staubig, klumpig, grau braun                        | nicht bindig | 8,07    |
| Scanarello           | a | Meeresreste, Hülsen, Streu                          | nicht bindig | 8,02    |
| Scanarello           | b | staubig, keine Reste von Streu                      | nicht bindig | 8,13    |
| Scanarello           | c | staubig, keine Reste von Streu                      | nicht bindig | 8,39    |
| Torcello             | a | staubig, klumpig                                    | nicht bindig | 8,44    |
| Torcello             | b | staubig, klumpig                                    | nicht bindig | 7,68    |
| Torcello             | c | staubig, klumpig                                    | nicht bindig | 7,45    |
| Valle Ballione       | a | feiner Sand Streu Schwebstoffe                      | nicht bindig | 7,38    |
| Valle Ballione       | b | feiner Sand, grau braun                             | nicht bindig | 7,40    |

### 4.3 Überprüfung von *H. schachtii* in den italienischen Bodenproben

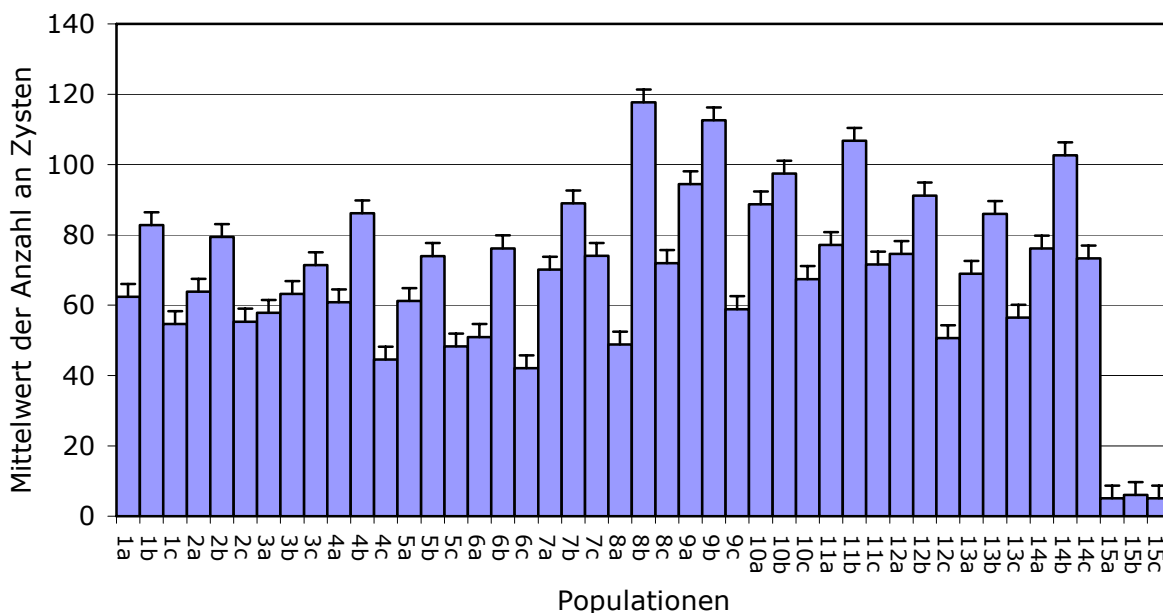
Bei der Überprüfung der Anwesenheit von *H. schachtii* in diesen Bodenproben, wurde der Gewächshausversuch ausgewertet (Tab.4.4). Dabei wurden bis zu vier Parallelen a bis d der Bodenproben, der verschiedenen Standorte, auf die Anwesenheit der Rübenzystennematoden überprüft. Weder der Senf, als Nematodenfangpflanze (es kommt zwar zum Schlupfreiz der Larven, aber ohne dass diese ihren Entwicklungszyklus beenden können und ohne sich verwehrt zu haben, sie sterben ab (Schlang 2001; Rose 2001)), noch die sensitive Kulturrübe zeigen einen Befall durch den Nematoden *H. schachtii* an ihren Wurzeln (Tab.4.4). Lediglich bei den Positivkontrollen, die in Nematoden inokulierter Erde standen, wurden bis zu 80 Zysten gezählt.

**Tab.4.4:** Nach ca. 8-9 Wochen wurden die Pflanzen von der Erde befreit und auf Zysten des Nematoden *H. schachtii* untersucht.

| Standort             | Probe   | Senf | Kulturrübe | Anzahl an Zysten |
|----------------------|---------|------|------------|------------------|
| Albarella Club       | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| Ausa Corno           | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| Bibione              | a/b/c/d | 5    | 5          | 0                |
| Boccasette           | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| Cervia               | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| Chioggia             | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| Fusina               | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| Grado                | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| Numana               | a/b/c/d | 5    | 5          | 0                |
| Pellestrina          | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| San Pietro in Volta  | a/b/c/d | 5    | 5          | 0                |
| Porto Levante        | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| San Erasmo           | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| Cimitero San Michele | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| Scanarello           | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| Torcello             | a/b/c   | 5    | 5          | 0                |
| Valle Ballione       | a/b     | 5    | 5          | 0                |
| Negativkontrolle     |         | 5    | 5          | 0                |
| Positivkontrolle     |         | 5    |            | 60               |
| Positivkontrolle     |         |      | 5          | 80               |

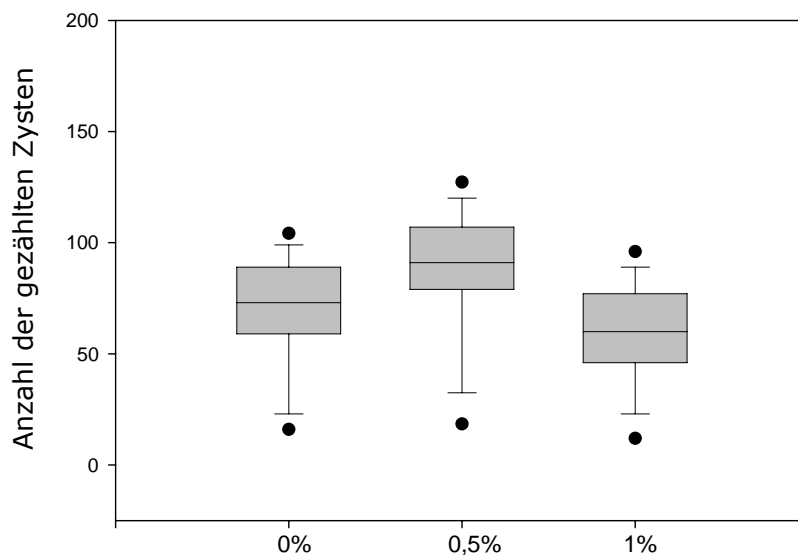
#### 4.4 Auswertung des Infektionsversuches mit *H. schachtii*

Einen Überblick über die Infektiosität gibt die mittlere Anzahl der Nematoden-Zysten pro Pflanze (zusammengefasst sind hier alle Salzkonzentrationen) in der Abbildung 4.2. Die Säulen zeigen, dass die Wildrüben *B. vulg.* ssp. *maritima* von dem Rübenzystennematoden *H. schachtii* befallen wurde, d.h. dass natürlicherweise keine Resistenz in dieser Wildrübenart vorhanden ist. Dies zeigt deutlich der Vergleich mit der resistenten Wildrübe *B. procumbens*. Diese Wildrübenart besitzt bekanntlich die genetischen Voraussetzungen für eine Resistenz gegenüber *H. schachtii*. Der Vergleich zwischen den Wildrüben und der sensitiven Kulturrübe zeigte, dass es teilweise einen signifikant höheren Befall durch den Nematoden gab. Aber es zeigte sich auch ein signifikant niedrigerer Befall, durch *Heterodera*. Die Verteilung zwischen dem niedrigsten Befall und der Anzahl des höchsten Befalls lag bei den Populationen der Wildrüben. Es wurde teilweise ein signifikant höherer Befall durch die Nematoden bei den Wildrüben festgestellt. Der Vergleich innerhalb der Populationen wies auf eine Reduzierung des Befalls in Abhängigkeit von der Salzkonzentration (0,5 % zu 1 %) hin. Eine Zunahme der Zystenanzahl war von 0%iger Salzkonzentration auf 0,5% zu verzeichnen.



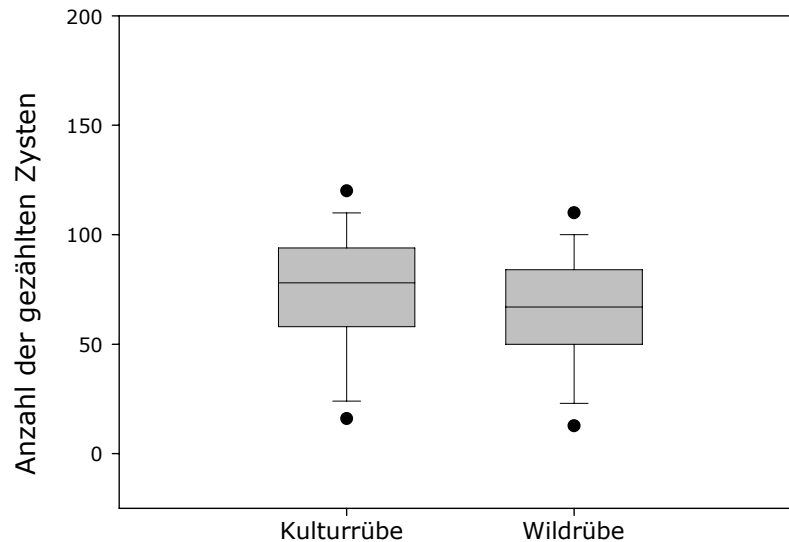
**Abb. 4.2:** Vergleich der Summe der Mittelwerte der Zysten pro Pflanze aller Populationen bei den verschiedenen Salzkonzentrationen. Die Abkürzungen sind in Tab.3.4 im Kapitel 3.4.3 erläutert.

Durch eine anschließende Varianzanalyse wurden die im Säulendiagramm (Abb.4.2) anschaulich gemachten Ergebnisse bestätigt. Die ANOVA (Kapitel 3.4.5) zeigte, dass die fünf Parameter: Sorten (Kultur- und Wildrüben); Region (Nordsee, Ostsee, Italien und der Kulturrübe); Populationen; Gewächshauskammern und Salzkonzentration (0%; 0,5%; 1%) die Anzahl der Nematodenzysten pro Pflanze hoch signifikant beeinflussen ( $p < 0.001$ ). Abbildung 4.3 bestätigt das Ergebnis, das im Säulendiagramm verdeutlicht wurde. Durch die ANOVA (Darstellung als Box Plots) wurde bei einem Vergleich der einzelnen Konzentration gezeigt, dass es eine Zunahme im Befall gibt, bei der eingesetzten Salzkonzentration von 0,5%.



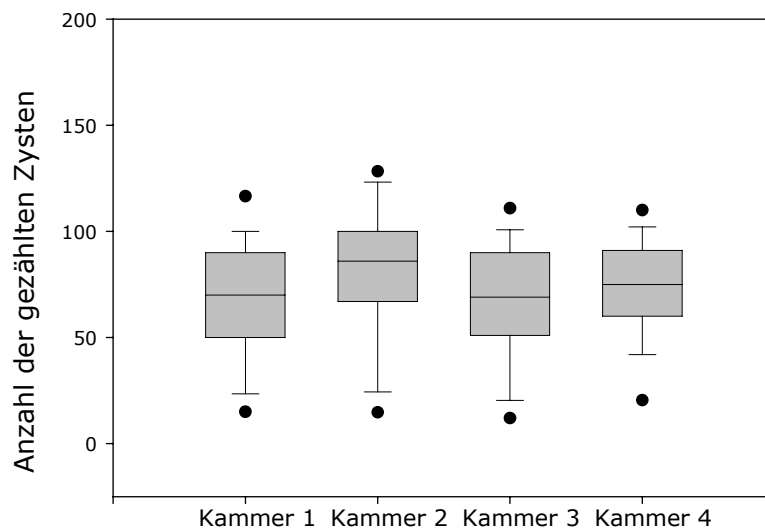
**Abb.4.3:** Einfluss der drei verschiedenen Salzkonzentrationen 0%; 0,5% und 1% auf den Infektionsgrad. Die Konzentrationen haben einen unterschiedlichen signifikanten Einfluss auf den Befall der Nematoden. Bei der Konzentration 0,5% zeigte sich ein deutlich stärkerer Befall als bei 0% oder 1% (hier war der Befall am geringsten). Das Perzentil der beiden Boxes der Konzentrationen 0% und 1% zeigt eine gleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben (normalverteilt).

Der Vergleich zwischen den Wildrüben und der Kulturrübe zeigte (Abb.4.4), einen geringfügig signifikanten Unterschied in der Befallsstärke. Die Kulturrüben hatten pro Pflanze einen höheren Befall, als die Pflanzen der Wildrüben.

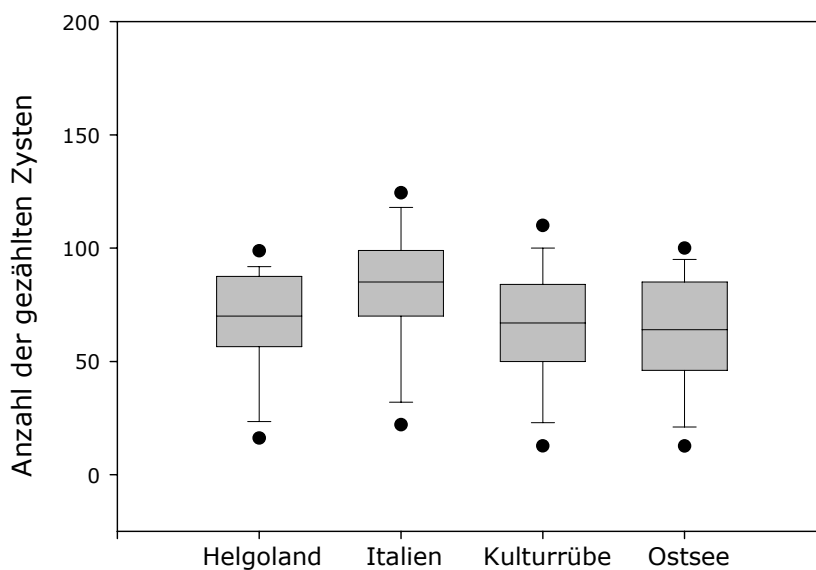


**Abb.4.4:** Vergleich des Einflusses der beiden Sorten Wildrübe und Kulturrübe auf den Infektionsgrad. Die Kulturrübe zeigte einen geringfügig signifikanten Unterschied in der Anzahl an Zysten der Nematoden, als die Wildrübe. Das Perzentil der beiden Boxes zeigt eine gleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben (normalverteilt).

Da während der Versuchsreihe die Tests in verschiedenen Gewächshauskammern stattfanden, werden die Ergebnisse im Hinblick auf mögliche experimentelle Randeffekte, wie z.B. die Lage der Kammern oder klimatische Schwankungen in den Kammern, als Einflussparameter untersucht. Es zeigte sich, dass die Rüben die während der Versuchsdauer in der Gewächshauskammer 2 standen, im Vergleich zu den übrigen Kammern (1;3 und 4) einen signifikant höheren Befall durch den Nematoden hatten (Abb.4.5).



**Abb.4.5:** Einfluss der vier verschiedenen Anzuchtkammern, auf den Infektionsgrad des Nematoden, auf die Pflanzen. Bei der Kammer 2 ist der Befall von Nematoden signifikant höher als bei den Kammern 1;3 und 4. Das Perzentil der vier Boxes zeigt eine gleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben (normalverteilt).

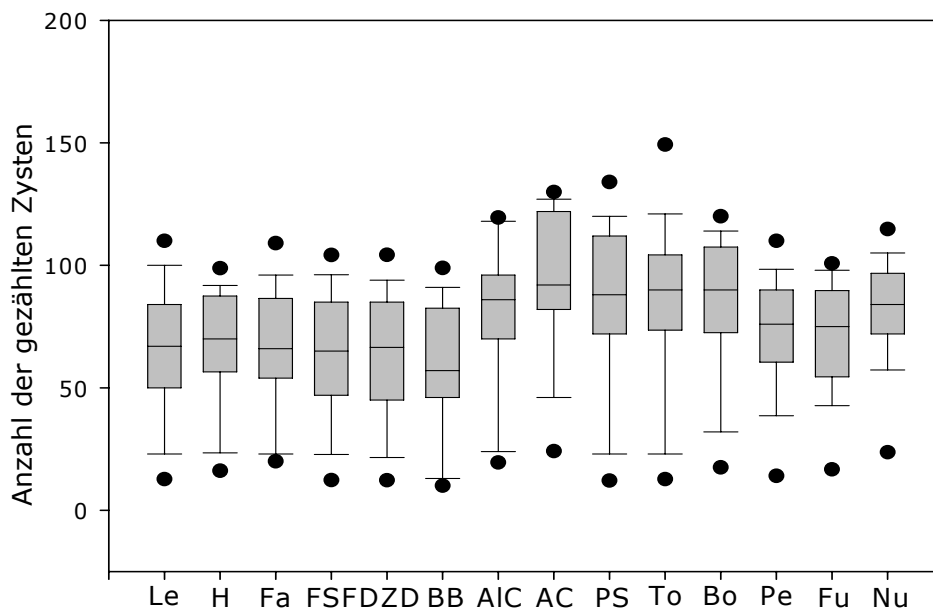


**Abb.4.6:** Vergleich der verschiedenen Regionen miteinander, wobei die Kulturrübe auch als Region gezählt wurde. Der Vergleich zeigte bei den Wildrüben aus Helgoland und der Ostsee und der Kulturrübe einen signifikanten Unterschied im Befall der Nematoden zu den Wildrüben der Adriaküste (Italien). Das Perzentil der vier Boxes zeigt bei allen Regionen eine Normalverteilung.



Die Herkunft der Rüben beeinflusste die Infektion durch die Nematoden. Wildrüben der italienischen Adriaküste wiesen einen größeren Befall auf (Abb.4.6). Die Wildrüben der Ostseeküste und der Insel Helgoland, so wie die Kulturrüben, waren vergleichsweise weniger stark infiziert.

Der Vergleich der einzelnen Populationen miteinander bestätigt das Ergebnis der Abbildung 4.6 Hier zeigten die Populationen: Fastensee, Fehmarn Sund Fehmarn, Dazendorf und Burger Binnensee (die Wildrübenpopulationen aus Deutschland) einen geringeren Befall, als die italienischen Populationen (Abb.4.7).

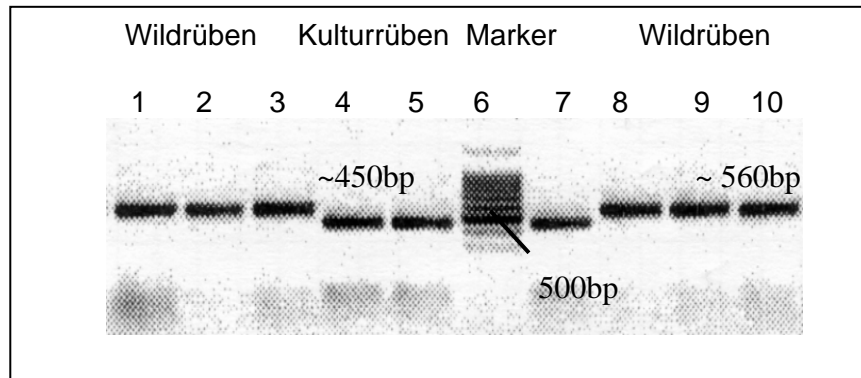


**Abb.4.7:** Vergleich des Einflusses des Infektionsgrades der verschiedenen Populationen miteinander 1=Kulturrübe 2-6=deutsche Wildrübe, 7-14=Wildrüben der italienischen Adriaküste. Die signifikanten Unterschiede der einzelnen Populationen zeigte sich im Unterschied der Populationen 1-6 zu den Populationen 7-14. Wie schon die Abbildung 4.5 zeigte, sind die Wildrüben der italienischen Adriaküste stärker Befallen als die Wildrüben der Ostseeküste und der Kulturrübe. Aber auch innerhalb der Populationen zeigten sich signifikante Unterschiede. So war die italienische Wildrübe aus der Population Ausa Corno am stärksten Befallen und die Wildrübe der Ostsee aus der Population am geringsten Befallen. Das Perzentil der Boxes zeigt bei sieben (H, Fa, BB, AIC, AC, PS, und Fu) eine ungleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben an, die restlichen Populationen zeigen eine Normalverteilung an.

## 4.5 Genetische Charakterisierung der Wildrüben *B. vulg. ssp. maritima*

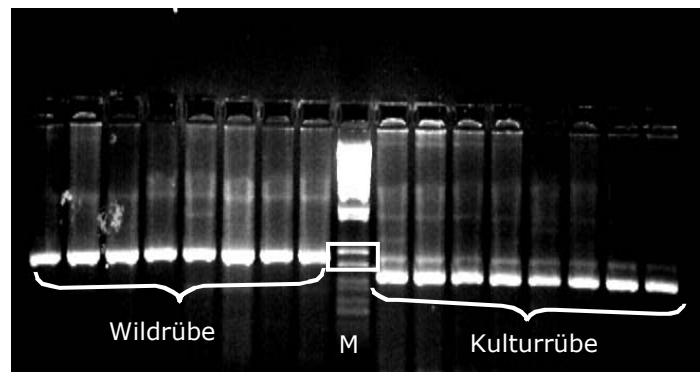
### 4.5.1 PCR-RFLP zur Bestimmung von CMS-Markern

Anhand von *Hind*III-Restriktionsmustern mit Fragmenten unterschiedlicher Länge konnten auf molekularer Ebene Wildrübenpopulationen von Kulturrübenpopulationen unterschieden werden. Ist eine Bande zwischen 513bp und 590bp im Gel sichtbar, so handelt es sich um eine Wildrübe. Liegt die Bande unterhalb von 511bp handelt es sich um eine Kulturrübe (Abb.4.8).

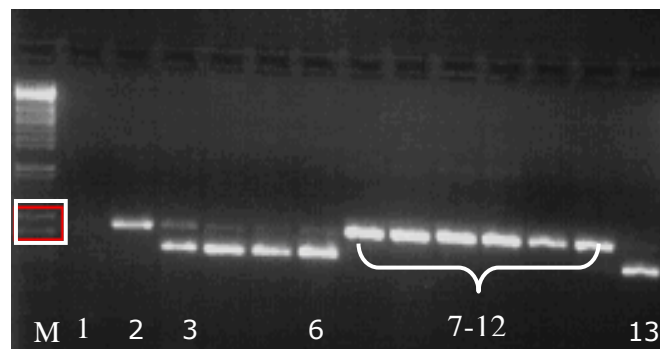


**Abb.4.8:** Bild eines Agarosegels nach der Restriktion mit *Hind*III. In Spur 1-3 und 8-10 ist das unverdaute Fragment zu sehen, wie es bei Rüben vorkommt, die das Merkmal für CMS nicht tragen. Bei den Kulturrüben dagegen (Spur 4;5 und 7) ist eines der beiden kleineren Fragmente zu sehen, das nach der Restriktion aufgrund der entsprechenden Schnittstelle entsteht.

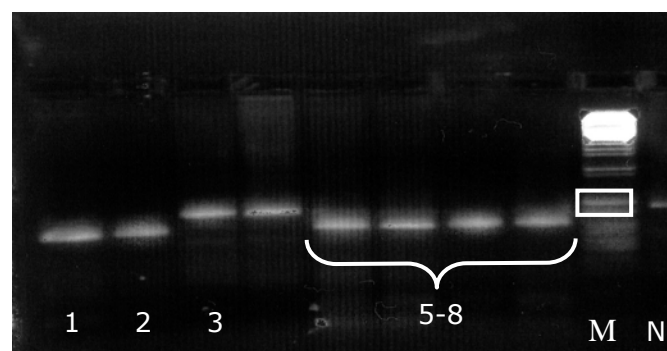
Die überwiegende Anzahl der untersuchten Individuen der Wildrübenstandorte stammen mütterlicherseits nicht von Zuckerrüben ab, d.h. es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um echte Wildrüben. In keiner der untersuchten Wildrübenpopulation konnte ein Hinweis auf CMS gefunden werden, d.h. nach der Restriktion mit *Hind*III entstand kein eindeutiges Fragmentmuster. CMS liegt folglich bei diesen Individuen nicht vor. Bei den italienischen Populationen zeigte sich bis auf einzelne Individuen des Standortes Cervia, ebenfalls kein Hinweis auf CMS. Von der Population Cervia zeigten während des Jahres 1998 (Abb.4.9) kein Hinweis auf CMS, aber in den Jahren 1999 und 2001 deuten Fragmente die auf die Anwesenheit von CMS hin (Abb.4.10 und 4.11). Cervia ist ein Standort, an dem Wildrüben in unmittelbarer Nähe zu Saatgutproduktionsfeldern wachsen.



**Abb.4.9:** M=Markerlinie Bei den Proben die 1998 am Standort Cervia gesammelt wurden waren alle Proben negativ (links Wildrübe). Es handelt sich um eine vollständige Wildrübenpopulation. Als Kontrolle wurde rechts Kulturrüben geprüft, in allen Proben war die Bande für das CMS zu erkennen



**Abb.4.10:** M=Markerlinie, 1=Blindprobe, 2=negativ Kontrolle (Wildrübe). Bei den Proben die 1999 in Cervia gesammelt wurden, handelte es sich um eine Mischpopulation von CMS positiven (3-6;13) und CMS negativen (7-12) Proben. Probe 1 Blindprobe, Probe 2 Kontrolle einer Wildrübe, Probe 3 Kontrolle einer Kulturrübe mit einer CMS-Bande.



**Abb.4.11:** M=Markerlinie, P=negativ Kontrolle. Bei den Proben die 2001 vom Standort Cervia gesammelt wurden, handelt es sich um eine Hybridpopulation. Die Proben 1;2;5-8 besitzen das CMS. Bei den Proben 3 und 4 ist kein CMS vorhanden.

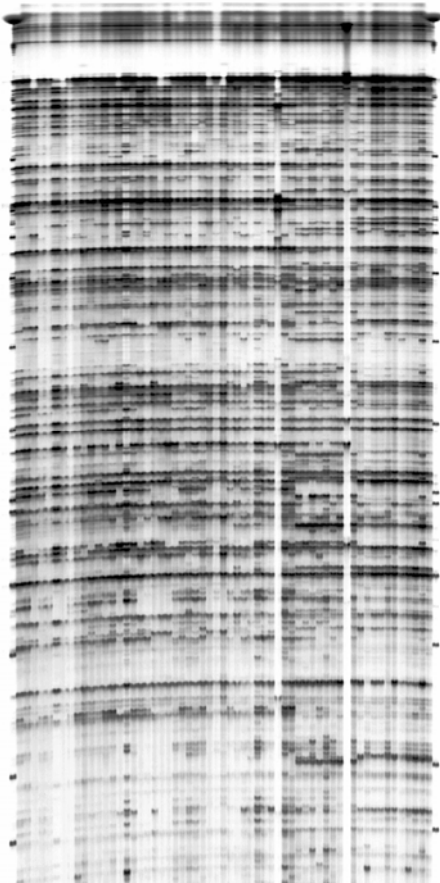
Die Ergebnisse der Abbildungen 4.9-4.11 zeigten, dass hier ein Austausch zwischen einer Kulturrübenpopulation und einer Wildrübenpopulation stattgefunden haben muss. Über die Jahre 1998-2001 scheint sich das CMS in der Wildrübenpopulation teilweise etabliert zu haben. Es ist durch Einkreuzung der Kulturrübe in die Wildrübenpopulation, eine Hybridpopulation entstanden. Die restlichen Ergebnisse des CMS Nachweises sind in der Tabelle 4-5 zusammengefasst.

**Tab.4.5:** Ergebnisse der PCR-RFLP zur Bestimmung von CMS. Angegeben sind die Populationen und die Jahre in denen das Samenmaterial gesammelt wurde. Als negativ sind die Proben bezeichnet die kein CMS besitzen. Als positiv wurden die Proben bezeichnet, bei denen CMS nachgewiesen werden konnte.

| Standort                         | Jahr | 10 Individuen |
|----------------------------------|------|---------------|
| Albarella Club                   | 1994 | neg.          |
| Albarella Club                   | 2001 | neg.          |
| Albarella Hafen                  | 1994 | neg.          |
| Albarella Hafen                  | 2001 | neg.          |
| Ausa Corno                       | 2001 | neg.          |
| Bibione                          | 2001 | neg.          |
| Boccasette                       | 2001 | neg.          |
| Cervia                           | 1998 | alle neg.     |
| Cervia                           | 1999 | 6 pos.        |
| Cervia                           | 2001 | 4 pos.        |
| Chioggia                         | 1994 | neg.          |
| Chioggia                         | 2001 | neg.          |
| Fusina                           | 2001 | neg.          |
| Fusina                           | 2001 | neg.          |
| Grado                            | 2001 | neg.          |
| Malamocco                        | 2001 | neg.          |
| Numana                           | 2001 | neg.          |
| Pellestrina                      | 2001 | neg.          |
| Pellestrina                      | 2001 | neg.          |
| Porto Levante                    | 1994 | neg.          |
| Porto Levante                    | 2001 | neg.          |
| Punta Sabiona                    | 2001 | neg.          |
| Cimitero San Michele             | 1994 | neg.          |
| Cimitero San Michele             | 2001 | neg.          |
| San Pietro                       | 2001 | neg.          |
| San Pietro in Volta              | 2001 | neg.          |
| Scanarello                       | 2001 | neg.          |
| Torcello                         | 2001 | neg.          |
| Burg Tiefe                       | 1999 | neg.          |
| Dazendorf                        | 1999 | neg.          |
| Burger Binnensee                 | 1999 | neg.          |
| Fehmarnsund Fehmarn              | 1999 | neg.          |
| Helgoland                        |      | neg.          |
| Kontrolle Zuckerrübe: Lenora     |      | pos.          |
| Kontrolle <i>Beta procumbens</i> |      | neg.          |

#### 4.5.2 Genetische Charakterisierung mit Hilfe der AFLP-Analyse

Nach der Extraktion der DNA, wurde diese für die AFLP-Analyse präpariert. Nach den in Kapitel 3.7 beschriebenen, technischen Schritten wurde das PCR Produkt auf ein 8%iges PA-Gel aufgetragen und mittels eines LICOR gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Laser-Technik sichtbar gemacht. Zur Auswertung der einzelnen Gele, wurde eine spezielle Software (SAGA) verwendet. Diese Software erlaubt dem Benutzer, die einzelnen Individuen mit den dazugehörigen



**Abb.4.12:** Ausschnitt aus einem PA-Gel der italienischen Populationen N, To; Bo, SM, Pe, Fu mit der Primerkombination P5. Es wurden jeweils die DNA von 10 Individuen pro Population verwendet. An erster und an letzter Stelle befindet sich der Längensstandard M (50-350bp)

charakteristischen Banden zu vergleichen und zu analysieren. Die zuvor ausgewählten Primer (Tab.3.15) wurden für alle Populationen eingesetzt und erstellten nach der Auswertung, ein Gesamtbild der genetischen Diversität der Proben. Es wurden bei 5 eingesetzten Primerpaaren insgesamt 226 Banden pro Individuum ausgewertet. Bei der Auswertung, wurden Banden bis zu einer Größe von 450bp einbezogen. Bei allen größeren Fragmenten wurde die Detektion auf dem Gel qualitativ schlechter und waren stellenweise zur Auswertung nicht mehr distinkt genug.

Die Abbildung 4.12 zeigt beispielhaft ein Polyacrylamid Gel mit der Primerkombination P4 (Tab.3.15). Die genaue Anzahl der für jede Primerkombination ausgewerteten Bande wurde in Tab.4.6 aufgelistet. Es wurden dabei nur solche Banden berücksichtigt, die für jede Primerkombination mindestens einmal reproduziert werden konnte.

**Tab.4.6:** Anzahl der ausgewerteten Banden für jede der fünf unterschiedlichen Primerkombinationen

| AFLP-Primerkombination | Abkürzungen der Primerkombinationen | Anzahl der ausgewerteten Banden/Primerkombination |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| EACT/MCAT              | P4                                  | 66  |
| EATG/MCAT              | P5                                  | 44  |
| EACT/MCTT              | P7                                  | 37  |
| EAAC/MCGT              | P12                                 | 35  |
| EAT/MCGC               | PU                                  | 22  |

#### 4.5.3 Bestimmung des Polymorphiegrades

Das Maß, das die genetische Diversität angibt kann sowohl über den Grad der vorkommenden polymorphen Banden, als auch über den Shannon Index ermittelt werden. Zur Berechnung des Shannon Index wurde die 0/1 Matrix in das Software Programm POPGENE eingegeben. Die einzelnen Werte der verschiedenen Standorte sind der Tab.4.7 zu entnehmen. n gibt dabei die Anzahl der Individuen pro untersuchte Population an.

**Tab.4.7:** Überblick über die Anzahl polymorpher Banden, den Polymorphiegrad [in %] und den Shannon Index bei den untersuchten Populationen. n gibt die Anzahl der Individuen pro untersuchter Populationen an. Grau unterlegt sind die Populationen aus denen Samenmaterial aus verschiedenen Jahrgängen vorhanden war.

| Population | n  | polymorphe Banden | PG(%) | Shannon Index |
|------------|----|-------------------|-------|---------------|
| AC         | 10 | 14                | 6,19  | 0,0693        |
| AH         | 10 | 20                | 8,85  | 0,0358        |
| AH1        | 10 | 10                | 4,42  | 0,0189        |
| Alc        | 10 | 15                | 6,64  | 0,0252        |
| Alc1       | 10 | 27                | 11,95 | 0,0272        |
| Ce         | 10 | 27                | 11,95 | 0,0523        |
| Bo         | 10 | 25                | 11,06 | 0,0604        |
| Bi         | 10 | 22                | 9,73  | 0,0565        |
| Ch         | 10 | 16                | 7,08  | 0,0397        |
| Fu         | 10 | 23                | 10,18 | 0,0585        |
| Fu1        | 10 | 15                | 6,64  | 0,0392        |
| Gr         | 10 | 16                | 7,08  | 0,0382        |
| Pe         | 10 | 24                | 10,62 | 0,0609        |
| Pe1        | 10 | 43                | 19,03 | 0,0901        |
| M          | 10 | 13                | 5,75  | 0,0330        |
| N          | 10 | 36                | 15,93 | 0,0752        |
| Pl         | 10 | 13                | 5,75  | 0,0298        |
| Pl1        | 10 | 17                | 7,52  | 0,0434        |
| Sc         | 10 | 18                | 7,96  | 0,0427        |
| SM         | 10 | 39                | 17,26 | 0,0880        |
| SM1        | 10 | 21                | 9,29  | 0,0439        |
| SP         | 10 | 25                | 11,06 | 0,0621        |
| SPV        | 10 | 23                | 10,18 | 0,0529        |
| To         | 10 | 19                | 8,41  | 0,0514        |
| Pg         | 10 | 19                | 8,41  | 0,0444        |
| SWU        | 10 | 18                | 7,96  | 0,0289        |
| WH         | 10 | 13                | 5,75  | 0,0294        |
| BB         | 10 | 19                | 8,41  | 0,0414        |
| GF         | 10 | 72                | 31,86 | 0,1452        |
| Bt         | 10 | 7                 | 3,10  | 0,0199        |
| DZD        | 10 | 12                | 5,31  | 0,0283        |
| H          | 10 | 11                | 4,87  | 0,0199        |
| Fa         | 10 | 5                 | 2,21  | 0,0124        |
| FSF        | 10 | 9                 | 3,98  | 0,0195        |
| Pr         | 10 | 33                | 14,60 | 0,0605        |
| Le         | 10 | 3                 | 1,33  | 0,0084        |

Im Mittel liegt der Polymorphiegrad bei 9,12 Prozent, der Shannon-Weaver-Index<sup>14</sup> liegt im Mittel bei 0,046 (Rohdaten siehe Anhang). Durch den Shannon Index wurde bestätigt, dass die Kulturrübe die geringste Diversität im Vergleich zu den Wildrübenpopulationen besitzt (PG 1,3%). Von den Wildrübenpopulationen zeigen die italienischen Wildrüben eine höhere Diversität (im Mittel 9,61 Prozent), als die Wildrübenpopulationen der Ostsee (im Mittel 8,2 Prozent). Dies wird auch durch die Mittelwerte des Shannon Index, der beiden verschiedenen Regionen bestätigt. Der Mittelwert der italienischen Population liegt bei 0,045 und der Shannon Index der deutschen Populationen beträgt 0,04 im Mittelwert. Der Polymorphiegrad innerhalb der gesamten Wildrübenpopulationen variiert zwischen 31,86 für den deutschen Ostseestandort Großenbroder Fähre und den Standort Fastensee mit 2,21 Prozent.

Vergleicht man die Werte der Populationen, die aus den verschiedenen Jahren stammen, so kann man bei diesen Populationen (Albarella Hafen, Albarella Club, Fusina, Pellestrina und Cimitero San Michele, Unterschiede innerhalb ihrer genetischen Diversität erkennen. Besonders bei der Population Cimitero San Michele, zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Jahre 1994 (17,26%) und 2001 (9,29%) im Polymorphiegrad.

#### **4.5.4 Genetische Distanzen und genetische Ähnlichkeit**

Nach Nei und Li (1979) wurden die genetischen Distanzen und die genetische Ähnlichkeit anhand der Distanzmatrix ermittelt. Dabei wurden Gruppenpaare gebildet und die genetische Distanz aller möglichen Gruppenpaare zueinander bestimmt. Aufgrund ihres Umfangs wurde die Tabelle in zwei Vergleichstabellen aufgeteilt und analysiert. Die Tabellen 4.8 und Tabelle 4.9, zeigen die Werte der genetischen Distanzen zwischen den Populationen. Bei den Angaben der genetischen Distanzen handelt es sich um relative Einheiten. Je kleiner ihr Wert wird, umso geringer ist auch die Distanz zwischen den einzelnen Gruppen, also Populationen, oder Individuen unterschiedlicher Standorte.

---

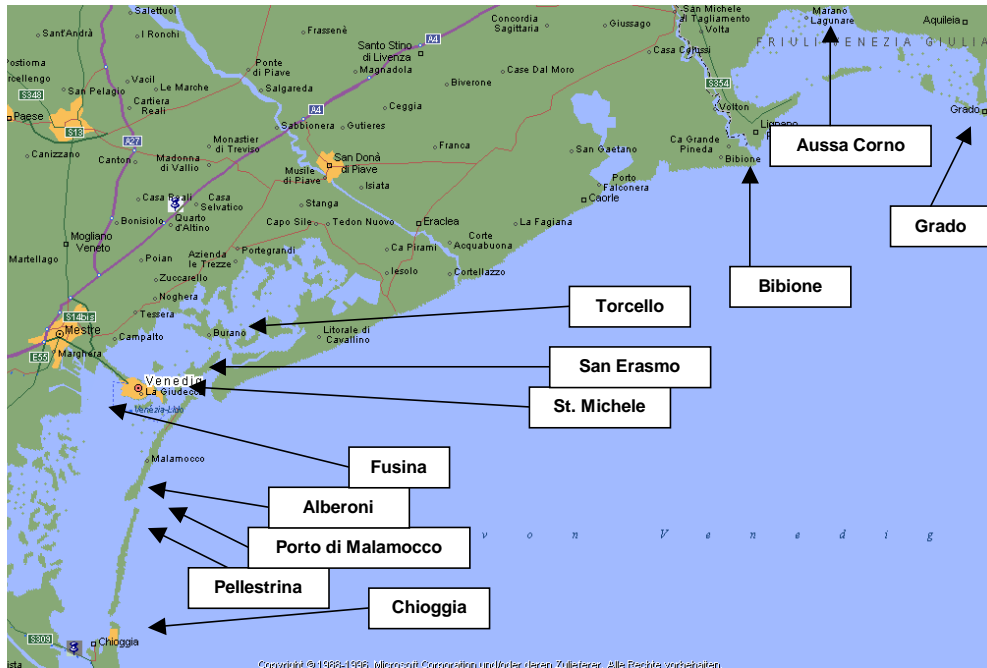
<sup>14</sup> Shannon-Weaver-Index ist eine mathematische Größe, die in der Biometrie für die Beschreibung der Biodiversität eingesetzt wird.

**Tab.4.8:** Genetische Distanzen innerhalb der italienischen Populationen. Grau markiert wurden jeweils die höchsten und die niedrigsten Werte im Vergleich zu den jeweiligen Populationen

|     | ACI    | AH     | IAH    | AI     | Bo     | Ce     | AC     | Bi     | Gr     | M      | Sc     | To     | Fu     | IFu    | Pe     | IPe    | SM     | ISM    | PI     | IPI    | N      | Cu     | SP     | SPV    |     |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| ACI | ***    | 0.9271 | 0.9098 | 0.9685 | 0.7976 | 0.8397 | 0.7484 | 0.7570 | 0.9536 | 0.9490 | 0.9110 | 0.8044 | 0.8213 | 0.8149 | 0.8313 | 0.8239 | 0.8280 | 0.8437 | 0.7889 | 0.7621 | 0.7613 | 0.7808 | 0.7968 | 0.7740 |     |
| AH  | 0.0757 | ***    | 0.9250 | 0.9125 | 0.8145 | 0.8174 | 0.7431 | 0.7767 | 0.8928 | 0.8815 | 0.8681 | 0.7821 | 0.8164 | 0.8088 | 0.8158 | 0.8349 | 0.8141 | 0.8653 | 0.8388 | 0.7814 | 0.7544 | 0.7926 | 0.8026 | 0.7815 |     |
| IAH | 0.0945 | 0.0780 | ***    | 0.9186 | 0.7916 | 0.8217 | 0.7454 | 0.7445 | 0.8787 | 0.8673 | 0.8256 | 0.7659 | 0.8104 | 0.8117 | 0.8209 | 0.8060 | 0.7915 | 0.8201 | 0.7939 | 0.7643 | 0.7400 | 0.7843 | 0.8011 | 0.7695 |     |
| AI  | 0.0320 | 0.0916 | 0.0849 | ***    | 0.8048 | 0.8266 | 0.7551 | 0.7582 | 0.9428 | 0.9228 | 0.8940 | 0.7950 | 0.8055 | 0.8040 | 0.8202 | 0.8020 | 0.8087 | 0.8176 | 0.7821 | 0.7728 | 0.7477 | 0.7805 | 0.8019 | 0.7695 |     |
| Bo  | 0.2261 | 0.2052 | 0.2335 | 0.2171 | ***    | 0.7341 | 0.7555 | 0.7221 | 0.7740 | 0.7660 | 0.7724 | 0.7744 | 0.7574 | 0.7911 | 0.8137 | 0.7739 | 0.7822 | 0.7753 | 0.7549 | 0.7516 | 0.7647 | 0.7317 | 0.7494 | 0.7172 |     |
| Ce  | 0.1747 | 0.2017 | 0.1964 | 0.1905 | 0.3090 | ***    | 0.7206 | 0.7408 | 0.8105 | 0.8014 | 0.8123 | 0.7528 | 0.7817 | 0.7521 | 0.7596 | 0.7803 | 0.7460 | 0.7690 | 0.7472 | 0.7314 | 0.7739 | 0.7627 | 0.7603 | 0.7402 |     |
| AC  | 0.2898 | 0.2970 | 0.2938 | 0.2809 | 0.2804 | 0.3273 | ***    | 0.7617 | 0.7626 | 0.7409 | 0.7111 | 0.7144 | 0.7679 | 0.7652 | 0.8035 | 0.7701 | 0.7734 | 0.7423 | 0.7749 | 0.7746 | 0.7708 | 0.7582 | 0.7724 | 0.7816 |     |
| Bi  | 0.2784 | 0.2526 | 0.2950 | 0.2768 | 0.3255 | 0.3000 | 0.2722 | ***    | 0.7595 | 0.7519 | 0.7668 | 0.8151 | 0.7412 | 0.7533 | 0.7618 | 0.7493 | 0.7554 | 0.7631 | 0.7991 | 0.7987 | 0.7547 | 0.8104 | 0.7905 | 0.8103 |     |
| Gr  | 0.0479 | 0.1134 | 0.1293 | 0.0589 | 0.2562 | 0.2101 | 0.2711 | 0.2751 | ***    | 0.9378 | 0.8991 | 0.7857 | 0.7952 | 0.7756 | 0.8236 | 0.8081 | 0.8119 | 0.8199 | 0.7931 | 0.7587 | 0.7529 | 0.7573 | 0.7931 | 0.7720 |     |
| M   | 0.0524 | 0.1261 | 0.1424 | 0.0804 | 0.2666 | 0.2214 | 0.2998 | 0.2853 | 0.0642 | ***    | 0.9037 | 0.8003 | 0.7913 | 0.7856 | 0.8373 | 0.8106 | 0.8208 | 0.8348 | 0.7813 | 0.7506 | 0.7639 | 0.7798 | 0.8069 | 0.7837 |     |
| Sc  | 0.0932 | 0.1414 | 0.1916 | 0.1121 | 0.2582 | 0.2079 | 0.3409 | 0.2655 | 0.1176 | 0.1013 | ***    | 0.7882 | 0.8172 | 0.7977 | 0.8222 | 0.8208 | 0.8157 | 0.8405 | 0.7597 | 0.7217 | 0.7813 | 0.7164 | 0.7640 | 0.7441 |     |
| To  | 0.2177 | 0.2457 | 0.2667 | 0.2294 | 0.2557 | 0.2839 | 0.3363 | 0.2044 | 0.2412 | 0.2227 | 0.2380 | ***    | 0.7482 | 0.7657 | 0.7790 | 0.7718 | 0.7801 | 0.7787 | 0.7971 | 0.8317 | 0.7503 | 0.8346 | 0.8308 | 0.8330 |     |
| Fu  | 0.1968 | 0.2028 | 0.2102 | 0.2163 | 0.2778 | 0.2463 | 0.2641 | 0.2994 | 0.2292 | 0.2341 | 0.2018 | 0.2900 | ***    | 0.9285 | 0.8387 | 0.8829 | 0.8174 | 0.8425 | 0.7883 | 0.7620 | 0.7801 | 0.7330 | 0.7271 | 0.7204 |     |
| IFu | 0.2047 | 0.2122 | 0.2086 | 0.2181 | 0.2343 | 0.2849 | 0.2676 | 0.2833 | 0.2541 | 0.2413 | 0.2261 | 0.2669 | 0.0742 | ***    | 0.8816 | 0.8479 | 0.8583 | 0.8332 | 0.7656 | 0.7635 | 0.8049 | 0.7371 | 0.7474 | 0.7381 |     |
| Pe  | 0.1848 | 0.2035 | 0.1974 | 0.1982 | 0.2062 | 0.2750 | 0.2190 | 0.2720 | 0.1941 | 0.1778 | 0.1957 | 0.2497 | 0.1760 | 0.1258 | ***    | 0.8758 | 0.9098 | 0.8507 | 0.7709 | 0.7691 | 0.8401 | 0.7639 | 0.8251 | 0.7882 |     |
| IPe | 0.1937 | 0.1805 | 0.2157 | 0.2198 | 0.2568 | 0.2480 | 0.2612 | 0.2886 | 0.2131 | 0.2099 | 0.1975 | 0.2590 | 0.1250 | 0.1655 | 0.1326 | ***    | 0.8311 | 0.8810 | 0.8288 | 0.7761 | 0.7884 | 0.7586 | 0.7716 | 0.7550 |     |
| SM  | 0.1887 | 0.2056 | 0.2338 | 0.2123 | 0.2456 | 0.2930 | 0.2570 | 0.2806 | 0.2083 | 0.1970 | 0.2037 | 0.2483 | 0.2016 | 0.1528 | 0.0945 | 0.1850 | ***    | 0.9197 | 0.7557 | 0.7465 | 0.8100 | 0.7580 | 0.7984 | 0.7701 |     |
| ISM | 0.1700 | 0.1447 | 0.1983 | 0.2014 | 0.2549 | 0.2626 | 0.2980 | 0.2704 | 0.1986 | 0.1805 | 0.1738 | 0.2502 | 0.1714 | 0.1829 | 0.1617 | 0.1267 | 0.0837 | ***    | 0.8073 | 0.7629 | 0.7757 | 0.7754 | 0.7899 | 0.7679 |     |
| PI  | 0.2376 | 0.1758 | 0.2308 | 0.2458 | 0.2810 | 0.2914 | 0.2555 | 0.2243 | 0.2318 | 0.2466 | 0.2748 | 0.2268 | 0.2378 | 0.2671 | 0.2607 | 0.1878 | 0.2801 | 0.2141 | ***    | 0.9299 | 0.7472 | 0.8452 | 0.8367 | 0.8345 |     |
| IPI | 0.2717 | 0.2466 | 0.2688 | 0.2577 | 0.2856 | 0.3128 | 0.2555 | 0.2248 | 0.2762 | 0.2860 | 0.3262 | 0.1843 | 0.2718 | 0.2698 | 0.2629 | 0.2534 | 0.2924 | 0.2711 | 0.0731 | ***    | 0.7606 | 0.8588 | 0.8434 | 0.8535 |     |
| N   | 0.2727 | 0.2818 | 0.3012 | 0.2908 | 0.2682 | 0.2564 | 0.2603 | 0.2814 | 0.2844 | 0.2698 | 0.2467 | 0.2873 | 0.2483 | 0.2171 | 0.1743 | 0.2377 | 0.2108 | 0.2540 | 0.2914 | 0.2737 | ***    | 0.7445 | 0.7716 | 0.7648 |     |
| Cu  | 0.2474 | 0.2325 | 0.2429 | 0.2478 | 0.3123 | 0.2709 | 0.2769 | 0.2102 | 0.2780 | 0.2488 | 0.3335 | 0.1808 | 0.3106 | 0.3050 | 0.2694 | 0.2762 | 0.2770 | 0.2543 | 0.1682 | 0.1522 | 0.2951 | ***    | 0.8969 | 0.9012 |     |
| SP  | 0.2272 | 0.2199 | 0.2270 | 0.2208 | 0.2889 | 0.2741 | 0.2582 | 0.2351 | 0.2319 | 0.2140 | 0.2692 | 0.1854 | 0.3187 | 0.2911 | 0.1923 | 0.2593 | 0.2251 | 0.2358 | 0.1782 | 0.1703 | 0.2593 | 0.1089 | ***    | 0.9399 |     |
| SPV | 0.2562 | 0.2465 | 0.2620 | 0.2620 | 0.3324 | 0.3008 | 0.2463 | 0.2104 | 0.2588 | 0.2438 | 0.2956 | 0.1828 | 0.3279 | 0.3036 | 0.2381 | 0.2811 | 0.2612 | 0.2641 | 0.1809 | 0.1580 | 0.1580 | 0.2681 | 0.1040 | 0.0620 | *** |



Die Distanzen der Wildrübenpopulationen der italienischen Standorte hatten mit einem Wert von 0,0320 zwischen Albarella und Albarella Club den geringsten Wert. Die größte genetische Distanz mit einem Wert von 0,3279, lag zwischen San Pietro in Volta und Fusina. Beide Distanzen lassen sich durch die Entfernung der Standorte erklären (Abb.4.13). Die Werte der Populationen, die aus den verschiedenen Jahren zeigten eine Änderung in ihrer genetischen Distanz.



**Abb.4.13:** Die italienische Adriaküste mit den ausgewählten Standorten der Wildrübenpopulationen.

**Tab.4.9:** Genetische Distanzen der deutschen Populationen und der Referenz Populationen zueinander.

|     | GF     | SWU    | Fa     | DZD    | Pg     | FSF    | BB     | Bt     | Pr     | H      | WH     |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| GF  | ****   | 0.7071 | 0.7040 | 0.7134 | 0.5942 | 0.6493 | 0.6057 | 0.6475 | 0.5854 | 0.5758 | 0.6456 |
| SWU | 0.3466 | ****   | 0.9426 | 0.9663 | 0.6743 | 0.6808 | 0.6681 | 0.6899 | 0.6033 | 0.6221 | 0.6797 |
| Fa  | 0.3510 | 0.0591 | ****   | 0.9527 | 0.6943 | 0.7198 | 0.6877 | 0.7308 | 0.5984 | 0.6276 | 0.7209 |
| DZD | 0.3377 | 0.0342 | 0.0484 | ****   | 0.6552 | 0.6777 | 0.6470 | 0.6885 | 0.6006 | 0.6205 | 0.6803 |
| Pg  | 0.5206 | 0.3941 | 0.3649 | 0.4228 | ****   | 0.8471 | 0.7526 | 0.8321 | 0.6085 | 0.7824 | 0.8305 |
| FSF | 0.4319 | 0.3845 | 0.3288 | 0.3891 | 0.1659 | ****   | 0.8380 | 0.9669 | 0.5984 | 0.7317 | 0.9818 |
| BB  | 0.5013 | 0.4033 | 0.3744 | 0.4354 | 0.2842 | 0.1768 | ****   | 0.8382 | 0.5448 | 0.6591 | 0.8436 |
| Bt  | 0.4346 | 0.3712 | 0.3136 | 0.3732 | 0.1838 | 0.0337 | 0.1765 | ****   | 0.6076 | 0.7139 | 0.9820 |
| Pr  | 0.5354 | 0.5053 | 0.5135 | 0.5098 | 0.4967 | 0.5135 | 0.6074 | 0.4983 | ****   | 0.5227 | 0.6069 |
| H   | 0.5520 | 0.4746 | 0.4658 | 0.4772 | 0.2454 | 0.3124 | 0.4168 | 0.3370 | 0.6487 | ****   | 0.7283 |
| WH  | 0.4375 | 0.3861 | 0.3272 | 0.3852 | 0.1857 | 0.0184 | 0.1701 | 0.0181 | 0.4994 | 0.3171 | ****   |

Die Populationen der deutschen Ostseeküste besitzen innerhalb der Standorte eine größere Distanz, als die Populationen innerhalb der italienischen Standorte. Die Werte der italienischen Populationen liegen zwischen 0.0320 und 0.3279, die genetischen Distanzen der deutschen Standorte liegen zwischen 0.0181 und

0.6487. Die größte Distanz innerhalb der deutschen Populationen, liegt mit einem Wert von 0.5206, zwischen Großenbroder Fähre und Puttgarden. Die geringste genetische Distanz lag mit einem Wert von 0.0181 zwischen Wulfener Hals und Burg Tiefe. Die größte Distanz lag zwischen der Population von der Nordsee Insel Helgoland zu der Wildrübe *Beta procumbens*.

### **4.5.5 Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen**

Das in der Abbildung 4.14 dargestellte Dendrogramm zeigt die verwandtschaftlichen Beziehungen der analysierten Populationen zueinander. Dieses Dendrogramm wurde mit Hilfe des Computerprogramms TREECON erstellt. In diesem Dendrogramm sind deutlich verschiedene Gruppierungen der untersuchten Populationen zu erkennen. Im oberen Teil des Baumes, sind die Populationen der italienischen Standorte zu finden. Darunter in einer Gruppe befinden sich die Standorte der deutschen Ostseeküste. In die Gruppe der Wildrübenpopulationen der deutschen Ostseeküste clustert die Wildrübe der deutschen Nordsee Insel Helgoland mit hinein. Die Kulturrübe LENORA wird zwar außerhalb der Wildrübenpopulationen (*B. vulg. ssp. maritima*) eingeordnet, gehört aber ihrem Zweig zufolge mehr zu dieser Wildrübengruppe, als zur Wildrübe *B. procumbens*. *B. procumbens* ist hier deutlich als eine „Outgroup“ einzuordnen.

Die Ergebnisse der untersuchten Populationen der unterschiedlichen Sammeljahre, zeigen in diesem Dendrogramm, dass zwischen den Jahren 1994 und 2001 keine genetische Veränderung innerhalb dieser Populationen stattgefunden hat. Alle analysierten Populationen clustern als Nachbarn zusammen.

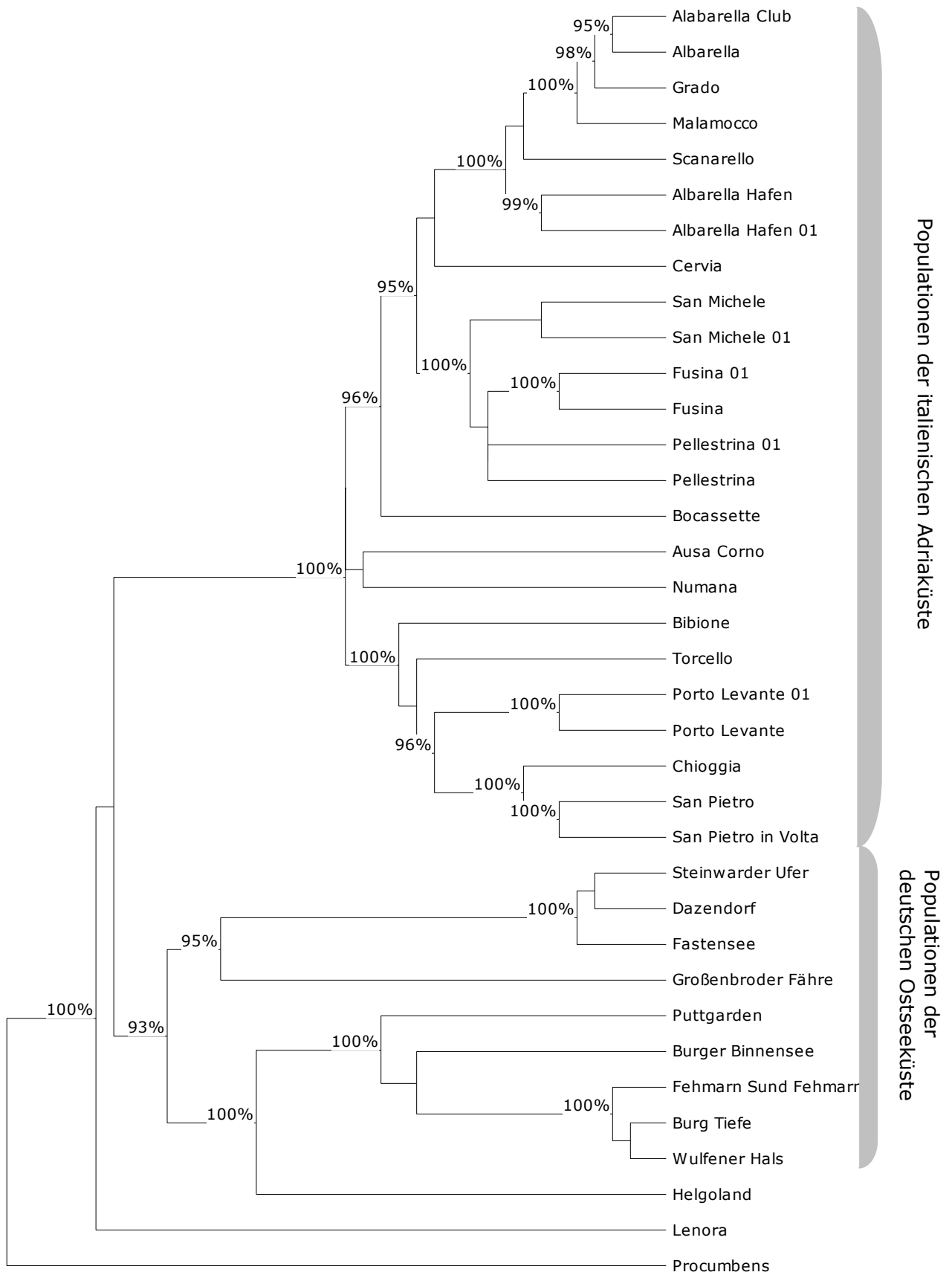


Abb.4.14: AFLP-Dendrogramm der UPGMA-Analyse mit Bootstrap-Werten.

## V Diskussion

### 5.1 Suszeptibilität der Wildformen von *Beta*, speziell *B. vulg. ssp. maritima* gegenüber dem Befall des Rübenzystennematoden *H. schachtii*

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind Wildrüben von der deutschen Ostseeküste weniger empfindlich gegenüber dem Rübenzystennematoden, *H. schachtii*, als die Wildrüben italienischer Herkunft. Dennoch war keine der getesteten Pflanzen resistent gegenüber dem Befall der Nematoden. Weder bei der als Kontrolle eingesetzten Kulturrübe, noch bei den Wildrüben *B. maritima* wurden so wenige Zysten gezählt, dass diese Pflanzen als resistent eingestuft werden könnten. Insgesamt waren die Wildrüben als Gruppe signifikant geringer befallen, als die (suszeptiblen) Zuckerrüben.

Der Unterschied im Befallsgrad und die Schwankungen innerhalb der Anzahl der Zysten zeigen, dass die Suszeptibilität bei den Wildrüben nicht gleichmäßig stark ausgeprägt ist. Es wäre möglich dabei eher von einer Toleranz gegenüber dem Rübenzystennematoden zu sprechen, als von einer Suszeptibilität. Die Toleranz wird definiert als die Eigenschaft einer Pflanzenart oder -sorte auf Nematodenbefall nicht oder deutlich geringer mit Krankheitssymptomen zu reagieren, im Vergleich zu empfindlichen Pflanzenarten- oder sorten (Heijbroek et al. 1977, Müller 1989, Evans & Haydock 1990, Trudgill 1991). Die Ergebnisse dieser Arbeit würden denen von Heijbroek (1977) entsprechen.

An der Ausprägung der Toleranz sind vermutlich mehrere Gene beteiligt (Müller 1998, Cook & Evans 1987, Wallace 1987). Die Toleranz wird unabhängig von der Resistenz vererbt. Mesken und Lekkerker (1982) fanden in Kreuzungsversuchen heraus, dass die Resistenz der Wildrüben *B. maritima* nicht vollständig ist, wie bei der resistenten Sorte *B. procumbens*. Toleranz und Resistenz von Kulturpflanzen gegenüber Nematoden beschreiben zwei unterschiedliche Phänomene, die nicht gekoppelt sein müssen (Lauenstein 1977). Aus Kreuzungen zwischen *B. vulgaris* und *B. vulg. ssp. maritima* konnten tolerante Genotypen selektiert werden (Heijbroek et al. 1977). Aus den Rückkreuzungen wurde geschlossen, dass die Toleranz dominant vererbt wird. Die toleranten *B. vulgaris* Linien hatten schmalere Blätter, dickere Blattadern und kleinere Stomata (Morphologie von *B. vulg. ssp. maritima*). Bei höherer Strahlungsintensität der Sonne und hohen Temperaturen schlossen sich die Stomata schneller, damit

blieb das typische Symptom, bei Befall durch die Nematoden, die so genannte Rübenmüdigkeit, aus. Bei mittlerem Nematodenbefall übertrafen diese toleranten Linien empfindliche *B. vulgaris*-Sorten im Ertrag. Unter befallsfreien Bedingungen fielen ihr Wurzelgewicht und der Ertrag aber geringer aus, es sei denn, die Wasserverfügbarkeit wurde zum limitierenden Faktor (Heijbroek et al. 1977).

Während Sorten mit monogen vererbter Resistenz zur Selektion von Pathotypen führen können, ist dies bei der Toleranz nicht der Fall. Tolerantere Pflanzen reagieren selbst auf den Befall mit verschiedenen Nematoden der Gattung *Heterodera* tolerant (Boerma & Hussey 1984). Zu beachten bleibt, dass das leistungsfähigere Wurzelsystem der toleranten Wirtspflanze den Nematoden besser vermehrt, so dass die Toleranz nur in Kombination mit einer wirksamen Bekämpfung sinnvoll einzusetzen wäre (Koenning et al. 1992). Das Ziel in der Züchtung sind daher resistente Sorten mit einer hohen Toleranz. Die Bemühungen resistente Sorten zu züchten erweist sich allerdings als schwierig (Ross & Brim 1966, Hartwig & Epps 1978, Anand et al. 1985). Gezüchtete resistente Sorten führen beim Anbau nur zu mäßigem Erfolg, da es durch einen starken Selektionsdruck auf die Nematodenpopulationen schnell zur Überwindung der Resistenz kommen kann (Young & Hartwig 1988). Seit 1998 kann in Deutschland die erste nematodenresistente Zuckerrübe angebaut werden („Nematop“ Hilleshög). Hier wurde durch klassische Züchtung die natürlich vorkommende Resistenz der Wildrübe *B. procumbens* in die Kulturrübe eingekreuzt. Es konnte die Vermehrung der Nematoden unterdrückt werden und gleichzeitig wurden die naturgemäß unerwünschten Eigenschaften weitestgehend eliminiert (z.B. zu kleiner Rübenkörper). Da die Resistenz genetisch nicht mit einer Toleranz gekoppelt ist, trat dennoch eine Schädigung der Wirtspflanzen auf. Im konkreten Fall kam es zu einer Bildung von Nährzellen, die aber nicht die geeignete Größe für die Ausbildung von Weibchen hatten, so dass sich eine erhöhte Anzahl von Männchen bildete. Da das Saatgut relativ teuer ist lohnt sich der Anbau nur bei extremen Befall. Erschwerend kommt das vergesellschaftete Auftreten von Nematoden mit der virösen Wurzelbärtigkeit (Rhizomania) hinzu: Zurzeit sind die nematodenresistenten Sorten nicht gegen Rhizomania tolerant und umgekehrt (Jung 1998, Tralle & Blumenberg 1998, Müller 1998).

Bislang wurde eine genetische Resistenz in den drei Arten der Sektion Procumbentes gefunden: *B. procumbens*, *B. patellaris* und *B. webbiana* (Jung & Wricke 1987). In der Züchtung wurde mit Hilfe der Hybridisierung das Nematodenresistenzgen in die Zuckerrübe übertragen (Savitsky 1975). Durch diese Übertragung wurde ein diploider Hybrid erzeugt, der zusätzlich zum Kulturrübengenom den Chromosomenabschnitt aus der Wildrübe *B. procumbens* enthielt, auf dem der resistenztragende Abschnitt liegt (Savitsky 1978). Diese Resistenz ist monogen und wird dominant vererbt (Kleine et al. 1995). Zurzeit sind zwei qualitativ verschiedene Resistenzgene aus *B. procumbens* bekannt. Das Hs1<sup>pro-1</sup> bzw. das Hs2<sup>pro-7</sup> (Lange et al. 1990). Auf das Hs2<sup>pro-7</sup> Gen stieß man, durch eine nähere Charakterisierung von vier Pathotypen. Dieses Ergebnis ließ die Annahme zu, dass auf dem Chromosom mit dem Hs1<sup>pro-1</sup> Gen noch das Hs2<sup>pro-7</sup> liegen muss, das einen anderen Virulenzbereich abdeckt (Müller 1992). Mit Hilfe der Gentechnik könnten diese Gene gezielt in das Genom der Zuckerrüben eingebracht werden. Über züchterische Aktivitäten auf diesem Gebiet ist bislang allerdings nichts bekannt

### **5.2 Toleranz in der Wirt-Parasit-Interaktion *B. vulg. ssp. maritima* zu *H. schachtii* unter Einfluss von abiotischem Stress**

Eine Salzbehandlung im Boden beeinflusst signifikant den Befall mit Nematoden. Grundsätzlich ist bei allen Rübensorten eine Abnahme der Zystenanzahl bei höchster getesteter Salzkonzentration zu beobachten. Die Abnahme der Zystenanzahl bei hohem Salzanteil im Boden könnte mehrere Gründe haben: 1. Verminderte Anzahl der Zysten durch reduzierte Fitness und Aktivität der Nematoden und 2. Bessere physiologische Anpassung der Wildrübe an Salzstress.

Eine Pflanze, die aufgrund günstiger Umweltbedingungen eine hohe Fitness und damit potentiell auch höhere Abwehrkräfte besitzt, könnte in der Lage sein, einen Schädling oder eine Krankheit abzuwehren. Koch (1980), konnte nachweisen, dass der Befall mit *Rhizomania* bei Pflanzen mit überreichlicher Nährstoffversorgung zurückgeht. Dies führte er einerseits auf die eventuelle Hemmung der Zoosporen des virusübertragenden Vektors (*Polymyxa betae*) durch ein großes Angebot an Nährsalzen im Substrat zurück, zum anderen aber auch auf die verbesserten Abwehrmechanismen der Pflanze. Ähnliches ist auch bei

Nematoden denkbar. Resistenzmechanismen gegen *H. schachtii* basieren unter anderem auf einer reduzierten Bildung des Nährzellensystems, wodurch sich kaum Weibchen der Nematoden bilden können (Rose 2001). Da sich resistente von anfälligen Pflanzen grundsätzlich bei Krankheitsbefall nur in der Geschwindigkeit und der Ausprägung ihrer Reaktion unterscheiden (Schlösser 1997), könnte eine erhöhte Fitness der Pflanzen auch eine verminderte Anfälligkeit gegen den Nematoden zur Folge haben. Im Umkehrschluss müssten dann unter Stress stehende Pflanzen anfälliger sein, wenn die Salzbehandlung das Schlüpfen und die Entwicklung der Nematoden nicht beeinflusst.

Für die relative Zunahme des Befalls von 0 zu 0,5 Prozent Salz im Gießwasser sind zweierlei Gründe denkbar. *B. vulg. ssp. maritima* ist ein moderater Halophyt und besitzt eine gewisse Salztoleranz. 0,5 Prozent Salzgehalt im Boden scheint keinen Stress bei der Pflanze auszulösen und es kommt somit auch nicht zu einem erhöhten Abwehrmechanismus der zusätzlich zu dem Befall von *Heterodera* ausgelöst werden könnte. Als Halophyten werden gewöhnlich solche Pflanzenarten eingeordnet, die einen Salzgehalt von 0,5 Prozent und mehr in der Bodenlösung vertragen (Lerch 1991). Sie können ihren Salzhaushalt in bestimmtem Maße durch Sekretion oder Sukkulenzbildung selber regeln. *B. vulg. ssp. maritima* bzw. *B. vulgaris* schützen sich durch die so genannte Halosukkulenzbildung. Die osmotische Wirkung der eindringenden Salzionen wird durch die gleichzeitige Wasseraufnahme in den Zellen kompensiert. Die Salzkonzentration im Protoplasma bleibt dadurch im Verhältnis zum Wassergehalt ausgeglichen, aber das Volumen wird vergrößert. Dies ist wegen der quellenfördernden Wirkung der großen Ionen-Wasserhülle von  $\text{Na}^+$ , besonders bei Chlorid-Halophyten zu beobachten. Halosukkulenten unterscheiden sich von den vorwiegend nur wasserspeichernden, echten Sukkulenten durch ihren wesentlich höheren Salzgehalt und dem entsprechenden, echten niedrigen osmotischen Potential.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Salzbehandlungen entsprechen der Realität an den natürlichen Standorten von *B. vulg. ssp. maritima*. Die Untersuchungen von Brand (1997) zur Leitfähigkeit des Bodens an der italienischen Adriaküste ergaben, dass die Leitfähigkeit allerdings stark schwankt. Sie entsprachen im Durchschnitt 3,0 mS/cm. Dieser recht niedrige Wert ergab

sich dadurch, dass es sich hauptsächlich um steinigen Boden handelte. Wie in Abbildung 5.1 zu sehen ist, handelt es sich bei den typischen Standorten der *B. vulg. ssp. maritima* meist um Habitats im Meeressaum und/oder in direktem Kontakt zum Meer. Dabei handelt es sich häufig um Böden, die von sandigem Untergrund, Kiesel oder dicken Gesteinsbrocken geprägt sind. Trotzdem können die Wurzeln der *B. vulg. ssp. maritima* bis zu zwei Meter tief in den Boden hineinwachsen. Der tatsächliche Salzgehalt des Bodens im Wurzelbereich entspricht also eher dem des Zeigerwertes für die Salzzahl (Ellenberg 1992). Diese Zahl zeigt mit 3,4 eine mesohaline Umgebung an, die mit einem Chloridgehalt von 0,5 bis 0,7 Prozent festgelegt ist. Die gewählten Salzkonzentrationen für den Resistenzversuch lagen ebenfalls in diesem Bereich.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass abiotische Stressfaktoren nur in begrenztem Umfang die Empfindlichkeit gegenüber Nematoden beeinflussen. Vergleicht man das Verhalten der Schaderreger *H. schachtii* mit der Viruskrankheit Rhizomania unter mesohalinen Bedingungen, so zeigt sich ein gegensätzlicher Unterschied. Schmidt und Bartsch (1996) zeigten, dass unter den natürlichen Standortfaktoren die Salzkonzentration im Boden, zu einer deutlich biologischen Reduzierung des Krankheitsbefalls der Rhizomania führen kann. So zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit vom Verhalten des Nematoden *H. schachtii* unter mesohalinen Bedingungen, dass dieser auch in den natürlichen Habitats von *B. vulg. ssp. maritima* die Fitness ihrer Salztoleranten Wirte beeinträchtigen könnten. Würde es zu einer Auskreuzung und/oder Introgression einer gentechnisch veränderten nematodenresistenten Zuckerrübe kommen, so wäre dies für *Beta vulg. ssp. maritima* Populationen ein ökologischer Vorteil, sofern der Nematode *Heterodera schachtii* in diesen Habitats natürlicherweise vorkäme (siehe 5.3.).

Die Gewächshausversuche sind auf vergleichbarem qualitativen Niveau durchgeführt worden. Eine Qualitätskontrolle wurde mit Hilfe statistischer Untersuchungen durchgeführt, um z.B. unerwünschte Randeffekte durch Klimaschwankungen in einzelnen Anzuchtkammern (z.B. Trockenstress) auszuschließen. Nur in einem Fall zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Befallsstärke der Nematoden hinsichtlich des Ortes im Gewächshaus, an dem der Versuch durchgeführt wurde. Es ist theoretisch möglich, dass in dieser Kammer



die Pflanzen zeitweise unter Trockenstress litten, da diese Kammer aufgrund ihrer Randlage einer direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt war. Für die Gesamtauswertung war dieses Phänomen aber unerheblich.

### 5.3 Nachweis von *H. schachtii* in den Bodenproben der italienischen Standorte

Generell sind Nematoden im Boden vorhanden, so auch *H. schachtii*. Der Rübenzystennematode ist in Italien ein weit verbreiteter Schädling. Er ist hauptsächlich auf den Zuckerrübenanbauflächen (Greco et al. 1993) Italiens zu finden. Auch in der in dieser Arbeit untersuchten Wildrüben-Standorte bei Venedig und Rovigo kommt er als Schädling auf den Zuckerrübenanbauflächen



**Abb.5.1:** Charakteristischer Standort der *B. vulg. ssp. maritima* für die italienische Adriaküste (hier Standort Albarella Club)

vor. Bei den Bodenuntersuchungen in den Wildrübenpopulationen wurden keine Zysten von *H. schachtii* an den Wurzeln der eingesetzten suzeptiblen Zuckerrüben gefunden. Das ließe den Schluss zu, dass Nematoden der Gattung *H. schachtii* nicht in den Habitaten der Wildrüben in Italien zu finden sind. Ein Grund könnte die Beschaffenheit des dortigen Bodens sein, der für die Nematoden ungünstige Lebensräume bietet. Besonders die Standorte, die im direktem Kontakt zum Meer liegen, bieten möglicherweise keine Nischen für die Nematoden. Allerdings sind die Nematoden ubiquitär verbreitet und besitzen ein großes Wirtsspektrum, so dass weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden sollten, um diese ersten Befunde zu unterstützen.

Neben der ungünstigen Beschaffenheit des Bodens, spielt auch die Salzbelastung für das Überleben der Nematoden eine Rolle. Um bei *H. schachtii* einen Schlupfreiz auszulösen benötigt man eine 5-10mM  $ZnCl_2$ -Lösung (Balke 2001), dies entspricht ungefähr einer 0,07 bis 0,14%igen Salzlösung. Bei einer Erhöhung der Konzentration nimmt die Anzahl der geschlüpften Larven ab (Baermann 1917, Balke 2001). Daher könnte man annehmen, dass nicht nur die Beschaffenheit des Bodens ungünstige Lebensumstände für die Nematoden

darstellen, sondern auch die Salzbelastung die Lebensweise der Nematoden im Boden beeinträchtigt.

#### **5.4 Biodiversität der Wildrübenpopulationen *B. vulg. ssp. maritima* und deren Erhalt als pflanzengenetische Ressource**

##### **5.4.1 Erfassung und Etablierung der Wildrübenpopulationen an der italienischen Adriaküste, im Hinblick als pflanzengenetische Ressource**

In der vorliegenden Arbeit, wurden die Ergebnisse vorheriger Untersuchungen mit einbezogen, um die Populationen der italienischen Adriaküste als pflanzengenetische Ressource zu beschreiben. In einem Langzeitmonitoring sollte die Populationen von *B. vulg. ssp. maritima* in der italienischen Po-Ebene erfasst werden, mögliche unerwünschte Folgen einer möglichen Auskreuzung zwischen transgenen Zuckerrüben und deren wildverwandten Arten frühzeitig erkennen zu können. Dazu wurden über mehrere Jahre die Standorte der Wildrüben an der italienischen Adriaküste aufgesucht und Daten über die Größe der Populationen ermittelt (Lehnen 2000). Da die meisten Standorte unter ständigen menschlichen Einfluss standen (wie z.B. Rodung, Umbaumaßnahmen, Sandaufschüttungen), lassen sich teilweise solche extreme Schwankungen in der Populationsgröße erklären. Trotz dieser Schwankungen scheinen die Wildpopulationen erstaunlich konstant an der Adriaküste vertreten zu sein.

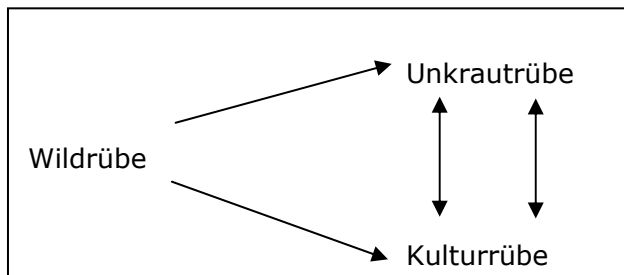
Diese Daten werden in einem Langzeitmonitoring festgehalten und dienen als Basisdaten für das Vorkommen von pflanzengenetischen Ressourcen, damit ihre Erhaltung für die Zuckerrübenzüchtung gesichert ist. Die dabei im Fokus stehende biologische Vielfalt (Biodiversität) wird in drei verschiedene Ebenen unterteilt (McNeely et al. 1990, Primack 1995): Artenvielfalt, genetische Vielfalt und Ökosystemvielfalt. Damit stellt die biologische Vielfalt ein grundlegendes Phänomen innerhalb der belebten Natur dar. Bis heute sind von den ca. 20 Millionen weltweitvorkommenden Arten ca. 1,75 Millionen wissenschaftlich erforscht worden. Wesentlich geringer ist die Kenntnis über deren genetische Vielfalt innerhalb dieser Arten bzw. Populationen. 1992 wurde in der Rio Konvention die Erhaltung der biologischen Vielfalt und die nachhaltige Nutzung zum „Schutz der Biodiversität“ international festgelegt. Unter diesen Schutz fallen auch die agrarisch genutzten Pflanzen und deren wildverwandten Arten. Als Folge der Intensivierung der Agrarproduktion ist – nach einem Höhepunkt agrarischer Vielfalt um die Mitte des 19. Jahrhunderts – ein erheblicher Teil der so genannten pflanzengenetischen Ressourcen verloren gegangen. Diese

pflanzengenetischen Ressourcen (PGR) sind meist unzureichend erfasst, charakterisiert und evaluiert, insbesondere fehlen Kenntnisse über die genetische Vielfalt und die nötige Mindestgröße von den vorhandenen Populationen (Hawkes 1997, Hammer et. al. 1992-1994). Die Pflanzenzüchtung ist auf die Nutzung der pflanzengenetischen Ressourcen angewiesen, denn neue Pflanzensorten werden durch Neukombination von Eigenschaften aus bereits vorhandenem Material gewonnen. In der heutigen Zeit können die angewandten Methoden in der Pflanzenzüchtung und im landwirtschaftlichen Anbau im weitesten Sinne zur Biotechnologie gezählt werden. Diese Methoden stellen eine gezielte Nutzung und die Beeinflussung biologischer Prozesse für die menschlichen Zwecke dar. Mit dem Fortschritt in der Molekularbiologie und der Genetik hat sich eine moderne Technologie entwickelt, die einen bedeutenden Einfluss auf die Pflanzenzüchtung und auch auf den Erhalt der pflanzengenetischen Ressourcen hat. Die Auswirkungen neuer Sorten auf die biologische Vielfalt ist ein Thema mit dem sich sowohl die konventionelle, als auch die biotechnologische Pflanzenzüchtung befassen muss. Ein wichtiger Aspekt ist das Auswilderungspotential von Nutzpflanzen. Bis heute sind nur wenige Fälle bekannt, in denen sich Kulturpflanzen sich außerhalb von agrarisch genutzten Flächen etablieren konnten (z.B. Topinambur, Artischocken). Grundsätzlich ist allerdings das Auswilderungspotential der Kulturpflanze gegenüber wildverwandten Arten umso geringer, je höher ihr Domestikationsgrad ist. Dennoch können einzelne genetische Eigenschaften durch das Auskreuzen auf Dauer in Wildpopulationen gelangen (vertikaler Gentransfer).

Eine Verwilderung hat stattgefunden, wenn eine Kulturpflanze alle Merkmale einer wilden einheimischen Art besitzt. Das heißt, sie wächst und vermehrt sich über ihre natürlichen Fortpflanzungsorgane ohne direkte menschliche Einflüsse und kommt mehr oder weniger häufig und regelmäßig an den bevorzugten Habitaten vor und kann über mehrere Jahre an diesen Standorten wieder gefunden werden (Sukopp & Sukopp 1993b). Wichtig ist, dass jeder potentielle Gentransfer fallspezifisch zu betrachten ist, z.B. ob damit die übertragenen Merkmalseigenschaften eventuelle Auswirkungen auf die Umwelt hätten.

#### 5.4.2 Veränderungen der genetischen Diversität der erfassten Wildrübenpopulationen an der italienischen Adriaküste

In der norditalienischen Po-Ebene wird in bedeutendem Umfang Saatgut für den Zuckerrübenanbau produziert. Die geographische Nähe der Saatgutvermehrungsflächen zu den an der Küste vorkommenden Wildrüben-



**Abb.5.2.:** Kultur-Unkrautrübenkomplexe (Harlan, 1965)

populationen, erhöht die Möglichkeit, dass es zu einem Genfluss zwischen beiden Seiten kommt (Abb.5.2). Hybride, die durch zufälligen Pollenaustausch entstehen, stellen eine Möglichkeit für die Entstehung von Unkrautrüben dar. Diese Verbreitung kann sowohl in den Saatgut-

vermehrungsgebiete, als auch in den Wildrübenpopulationen vorkommen (Evans & Weier 1981, Santoni & Berville 1992, Horsney & Arnold 1979). Bei der Unkrautrübenentstehung handelt es sich um einen evolutionären Prozess, der sich auch heute noch in der Kulturlandschaft vollzieht (DeWet & Harlan 1975). Es soll hier diskutiert werden, ob sich langfristig Wildrübenpopulationen an der italienischen Adriaküste durch möglichen Einfluss von Kulturrüben die genetischen Diversität verändert haben.

Das Dendrogramm (Abb.4.13) zeigt die verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Gattung *Beta*. Die Wildrübe *B. procumbens* differenziert sich deutlich von der Arten *B. vulgaris* und *B. vulg. ssp. maritima*. Damit wird auch die genetischen Beziehungen der Kulturrübe zur *B. vulg. ssp. maritima* verdeutlicht. Der Vergleich der Wildrübenpopulationen zueinander zeigt, dass sie zwar miteinander genetisch verwandt sind, aber aufgrund ihrer geographischen Herkunft deutlich voneinander auf genetischer Ebene differenzieren lassen. Die genetische Diversität innerhalb der Wildrübenpopulationen (deutsche Ostseeküste und italienische Adriaküste) wird durch den Polymorphiegrad unterschieden. Die italienischen Wildrüben besitzen einen höheren Polymorphiegrad, als die Wildrüben der deutschen Küsten. Dieses Ergebnis kann durch die Klassifizierung des Alters der beiden Populationen erklärt werden. Die Wildrübenpopulationen wurden 1996 erstmals als etablierte Populationen detektiert (Christensen 1996) und daher ist es nicht möglich, eine hohe

Diversität wie sie von Wilmans (1993) für Extremhabitats beschrieben wurde, zu beobachten.

Bestätigt wird diese Vermutung allerdings bei Vergleich der genetischen Distanzen der beiden geographisch getrennten Gruppen von Wildrübenpopulationen. Die genetischen Distanzen innerhalb der italienischen Wildrübenpopulation waren geringer, als innerhalb der deutschen Ostseeküste. Dieses Ergebnis liefert konkrete Hinweise darauf, dass ein Genfluss zwischen den italienischen Wildrübenpopulationen über mehrere Generationen hinweg stattgefunden haben könnte. Bei den Ostseerüben handelt es sich um so genannte Metapopulationen, deren Genpool innerhalb der Populationen gering ist, aber zwischen den Populationen größer wird, das heißt ein genetischer Austausch findet erst innerhalb der Populationen statt, bevor er zwischen etablierten Populationen stattfinden kann. Damit kann man bei den Wildrüben der deutschen Ostseeküste auch von einem so genannten Gründereffekt (Der so genannte *founder effect* beschreibt die genetische Abweichung einer isolierten Populationen oder Gründerpopulation von der Stammpopulation. Die Abweichung entsteht aufgrund der Beschränkung des Allelbesitzes der an ihrer Gründung beteiligten Individuen und nicht infolge unterschiedlicher Selektionsbedingungen) sprechen. Es handelt sich hierbei um eine geringe Anzahl an Populationen mit häufig wenigen Individuen, die in jüngerer Zeit mit Hilfe Meeresströmungen in das Gebiet gelangt sein dürften. Die genetische Diversität solcher Populationen kann weiterhin dadurch eingeschränkt werden, wenn unter bestimmten Bedingungen der so genannte Flaschenhalseffekt hinzukommt (Sperlich 1998). Bei ungünstigen Umweltbedingungen überleben, nur die am besten angepassten Individuen. Individuen mit geringer individueller Anpassungsfähigkeit sterben ab. Für die nachfolgende Generation wäre dadurch der Genpool weiter eingeschränkt.

Bei der Untersuchung der genetischen Variabilität einzelner Populationen über verschiedene Jahre zeigten sich Schwankungen, die sich sowohl im Shannon Index, als auch im Polymorphiegrad auftraten. Allerdings zeigte das Dendrogramm, das diese Populationen eng nebeneinander clustern. Es ist aufgrund der Ergebnisse allerdings kein Trend zu beschreiben, ob die genetische Diversität abnimmt oder zunimmt. Während bei den Populationen von Albarella

Club Pellestrina Porto Levante eine Zunahme des Polymorphiegrades zu verzeichnen ist, nimmt dieser bei den Populationen Albarella Hafen, Fusina und San Michele ab. Allgemeine Trends außer einer großen Populationsdynamik sind nicht zu beobachten.

Bei der Auswertung der AFLP-Daten konnten zwar eine Reihe von wildrübenspezifischen Banden in den Kulturrüben gefunden werden. Diese Banden sind aber aufgrund der genetischen Herkunft der Kulturrüben zu erklären. Es wurden aber keine spezifischen Banden der Kulturrüben in den Wildrübenpopulationen gefunden. Die geografische Streuung zwischen den deutschen und den italienische Wildrüben ist selbsterklärend und die Heterogenität innerhalb der Art *B. vulgaris* ist hinreichend oft beschrieben (Brand 1997, Jung et al. 1993, Frese 1991) und zeigt sich insbesondere durch den unterschiedlichen Generationszyklus der Subspezies *maritima* (van Dijk et al. 1997, vanDijk & Boudry 1989). Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass es zwar zu einem erkennbaren Genfluss von Kulturformen zu Wildrübenformen gekommen ist, der aber statistisch nicht nachweisbar war (Bartsch & Schmidt 1997, Bartsch et al. 1993; 1999). So auch in dieser Arbeit. Durch die Nähe zu den Saatgutfeldern wurden mehrfach Unkrautpopulationen gefunden, bei denen sowohl wildrüben- bzw. kulturrübenspezifische Banden zu beobachten waren (Pohl-Orf 1999b). Durch die hier angewandte AFLP Methode wurden aber keine Formen ermittelt die zwischen den Wildrüben und der Kulturformen genetisch einzuordnen waren.

### **5.4.3 Bestätigung der AFLP-Analyse durch CMS Nachweis in Wildformen**

Durch den Einsatz des Owen-CMS in der Pflanzenzüchtung, ist dies ein zuverlässiger genetischer Marker, zum Nachweis von Kulturrüben einfluss in Wildtypen. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass bei den untersuchten Wildrübenpopulationen der deutschen Ostsee und Nordseeküste kein CMS vorhanden war, dies bestätigen auch die Ergebnisse von Driessen 2002. Bei den untersuchten 19 italienischen Populationen, zeigte nur eine Population die Anwesenheit von CMS. Bei dieser Population handelt es sich um den Standort Cervia. Cervia liegt in der Nähe zu einem großen Saatgutproduktionsareal. Demnach besteht hier die potentielle Möglichkeit zwischen einem direkten Genfluss von Kulturrübenmerkmalen zu Wildrüben. 1998 lag hier eine Mischpopulation zwischen Hybridrüben und Wildrüben vor. Das Merkmal der

Kulturrüben hat sich bis 2001 ausgebreitet und sich als Hybridpopulation etabliert. Dieses Ergebnis wurde, allerdings nicht in der AFLP-Analyse bestätigt. Die Erklärung wäre die Lage des CMS im Genom der Rüben. Das Probenmaterial von 2001 war zu gering um einen differenzierten Vergleich machen zu können. Und das Ergebnis der AFLP Analyse lässt keinen differenzierten Schluss zu, ob sich einzelne Individuen 1998 als Hybride verhalten haben. Eine mögliche Erklärung der Verschiebung, der vorherigen Wildrübenpopulation von Cervia in eine Hybridpopulation, liegt an der Tatsache das die Nähe der Wildrüben zu den Saatgutfeldern. Diese Population wurde aufgrund von menschlichen Einflüssen dezimiert, um auch eine Einkreuzung der Wildrübenmerkmale in Kulturrüben zu vermeiden. Da das Owen Plasmid mütterlicherseits vererbt wird, ist es aber klar, dass es sich bei diesen Hybriden nicht um ausgewilderte Kulturrüben handelt, sondern hier eine Auskreuzung von Merkmalen in Wildrüben gegeben hat.

### **5.5 Folgen einer Auskreuzung und Introgression von gentechnisch erzeugter Nematodenresistenz**

Auch auf politischer Ebene ist der Verlust an biologischer Vielfalt als dringliches Problem erkannt worden. Inzwischen, sind zahlreiche internationale Initiativen<sup>15</sup> auf den Weg zu ihrem Schutz gebracht worden. Eine grundlegende Basis zum Verständnis des Ursprungs agrarbiologischer Vielfalt lieferte der russische Wissenschaftler Vavilov (1928) mit seiner Theorie der Ursprungs- und Vielfaltzentren. Auf seinen Forschungsreisen in den 20iger Jahren des letzten Jahrhunderts, identifizierte er acht große Genzentren<sup>16</sup> (Hammer et al. 1997). Er nahm an, dass diese Zentren mit den Ursprungszentren unserer Kulturpflanzen gleichzusetzen sind. Im Laufe der Jahre wurde die so genannte „Vavilovsche Theorie“ verschiedentlich korrigiert, differenziert bzw. erweitert (Harlan 1951, Ekingen 1986). Es wird heute davon ausgegangen, dass „Zentren genetischer Diversität“ sich nicht nur einmal herausgebildet haben, sondern dass sie sich auf Grund des ihnen zu Grunde liegenden dynamischen Entwicklungsprinzips fortlaufend weiterentwickeln können (Nevers 1991). Es lassen sich die Gebiete

---

<sup>15</sup> IUCN (World Conservation Union); WWF (World Wildlife Fund); WRI (World Resource Institute); die FAO und die UNESCO engagieren sich in erheblichem Masse im Bereich des Biodiversität Schutzes, der mit einer nachhaltigen Nutzung der biologischen Vielfalt verbunden wird. Die Verabschiedung der Biodiversität-Konvention auf dem Erdgipfel der Vereinten Nationen zu Umwelt und Entwicklung (UNCED) im Juni 1992 in Rio de Janeiro (UNEP, 1992), schlossen die politischen Bemühungen ab.

<sup>16</sup> Zu den Genzentren zählte er Mittelamerika, Teile Perus und Chile, der Mittelmeerraum, Teile des Nahen Ostens, Indien, das ehemalige Indochina sowie Südchina

mit großer genetischer Variabilität zwar erfassen, aber dabei handelt es sich nicht um große Genzentren, sondern eher um kleinere Entstehungszentren, die man in Primär- und Sekundärzentren<sup>17</sup> differenzieren kann. Auch die Pflanzenzüchtung ist auf die genetische Formenmannigfaltigkeit der Wildpopulationen angewiesen. Damit sind solche Zentren, auch für Züchter von besonderem Interesse, und es werden daher in solchen Zentren Programme zur Sammlung, Konservierung, Evaluierung, Dokumentation und Nutzbarmachung pflanzengenetischer Ressourcen durchgeführt. Durch die Heterogenität des Genpools der *B. vulg. ssp. maritima* Populationen an der italienischen Adriaküste befindet sich ein Genpool der von pflanzenzüchterischem Interesse ist. Da die Zuckerrübe von den Wildrüben der Art *B. vulgaris ssp. maritima* züchterisch selektiert wurde, kann dieser Genpool als ein primäres Entstehungszentrum bezeichnet werden (vonBroock et al. 2002). Daher sind die Wildrübenpopulationen an der norditalienischen Adriaküste als pflanzengenetische Ressource (PGR) schützenswert.

Durch die Kultivierung von Wildpflanzen, veränderte der Mensch (bewusst oder unbewusst) bestimmte Merkmale, die heute die Kulturpflanze von ihrer ursprünglichen Wildform<sup>18</sup> unterscheidet. Im Gegensatz zur Vavilovschen Theorie beschreibt Graner (2003), dass im Laufe der Domestikation nur ein kleiner Teil der in den Wildarten vorhandene Allele in die Kulturpflanzen übernommen wurden, da die meisten Entstehungsgebiete unserer Kulturpflanzen geographisch eng umgrenzte Gebiete gewesen sein dürften. Hieraus schlussfolgert Graner, dass Kulturformen gegenüber ihren wilden Verwandten in ihrer genetischen Diversität erheblich eingeschränkt sind. Diese Erkenntnis unterstreicht lediglich die Bedeutung des Schutzes wildlebender Pflanzenarten in ihren natürlichen Ursprungsgebieten zur Sicherung von pflanzengenetischen Ressourcen. Die Diversität der *Beta*-Arten ist sehr heterogen, daher ist die Erhaltung der wildlebenden *Beta* Populationen mit ihrer genetische Diversität von besonderem Interesse. Weltweit werden *Beta* Arten gesammelt und in *Beta*-Genbanken (ex-situ-Erhaltung) aufgenommen, da die wildlebenden genetischen Ressourcen

---

<sup>17</sup> Während die primären Genzentren als Ursprungsgebiete unserer Kulturzentren gelten, werden die sekundären als Mannigfaltigkeitszentren bezeichnet, in denen sich die Formenvielfalt eingewandelter Kulturpflanzen entwickeln konnte (Arche Noah 2002)

<sup>18</sup> Mechanismen die zum Beispiel der Samenverbreitung dienen wurden wegselektiert, aber auch Inhaltstoffe die zur Fraßabwehr dienen sollten wurden bei den Kulturpflanzen weggezüchtet. Lediglich die Größenzunahme von Früchten bzw. der vegetativen Pflanzenteilen sind ein wichtiges Auslesemerkmal.



durch Störung, Belastung, Zerschneidung und Verlust von Habitaten stark gefährdet sind. Damit stellen die Wildpopulationen von *B. vulg. ssp. maritima*, bei einem Monitoring von gentechnisch veränderten Zuckerrüben sowohl ein Zielorganismus der Auskreuzung, als auch ein Zielhabitat für die genetische Veränderung (Krankheitsresistenz) einen wichtigen Aspekt.

Aus umweltfachlicher Sicht sind die Wildrüben als genetische Ressource zu schützen. Daneben müssen aber, auch aus ökonomischen Interesse, Kulturhabitate, wie agrarisch genutzte Zuckerrübenanbaugelände, als Verbreitungsgebiete von Unkrautrüben berücksichtigt werden. Diese Habitattypen können sowohl für Deutschland, Italien und Frankreich (Driessen 2003, Bartsch 2003b, Boudry et al. 1993), als Möglichkeit der genetischen Interaktion via Genfluss in Betracht gezogen werden. In diesen Gebieten gibt es Kontakt zwischen Kulturrüben, Unkrautrüben und den Wildrüben der jeweiligen Küsteregionen.

Das Auswilderungspotential von Nutzpflanzen ist im Prinzip beschreibbar. In den Wildpopulationen an der italienischen Adriaküste konnten schon Hinweise auf Einstäubung von Kulturpflanzen in die dortigen Wildpopulationen beobachtet werden (Schmidt & Bartsch 1996). Auch bei den vorgelegten Untersuchungen wurden Einstäubungen der Kulturarten in die Wildpopulationen beobachtet (Kapitel 4.5.1).

Die Untersuchungen, die sich allein auf das Auskreuzungsverhalten Kulturpflanzen mit ihren möglichen Kreuzungspartnern beschäftigen, können und dürfen, als einzelnes Ergebnis nicht herangezogen werden um einen möglichen ökologischen Schaden zu beschreiben. Auf der einen Seite kann man annehmen, dass, wenn Genfluss zu wildverwandten Pflanzenarten (biologisch) möglich ist, mit dem Auftreten von Hybriden und deren Nachfolgenerationen gerechnet werden muss (Parker & Bartsch 1996). Auf der anderen Seite muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Auskreuzung nicht in allen landwirtschaftlichen Systemen möglich ist (Klinger et al. 1999). Faktoren wie landwirtschaftliche Nutzung der Flächen, Einhaltung der guten fachlichen

Praxis<sup>19</sup>, Anbau verschiedener Sorten, keine wildverwandten Arten die in der Nähe zur kultivierten Fläche wachsen, sind einige Beispiele die die mögliche Auskreuzung einschränken.

Bei der Beschreibung des ökologischen Schadens, besser Umweltschaden<sup>20</sup>, setzt die Bewertung und den verantwortungsbewussten Umgang mit der Umwelt voraus (Frese 1996, Potthast 1996, Sukopp 1996). Dazu gehören die Zerstörung natürlicher Lebensräume und der Verlust genetischer Vielfalt zu diesen Schäden. Das Schutzziel sollte ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl von Monitoringkonzepten sein.

Daher ist ein weiterer Aspekt bei dieser Art der Untersuchungen, ob die Verbreitung der transgenen Eigenschaften einen möglichen Umweltschaden hervorrufen kann. Die Verbreitung dieser transgenen Eigenschaften kann entweder im Zuge des Zuckerrübenanbaus erfolgen oder bei der Produktion von Zuckerrübensaatgut in den Saatzuchtgebieten. Vorangegangene Untersuchungen haben ergeben, dass die Zuckerrüben kältere Perioden überdauern können, und damit im darauffolgenden Jahr blühen (Lexander 1980, Smit 1982, Sadeghian & Johansson 1993), unabhängig ob sie eine gentechnische Veränderung besitzen oder nicht. In den Zuckerrübenanbaugebieten ist der Austausch von genetischem Material, transgen oder nicht transgen sehr gering. Im Normalfall werden solche so genannten Schosser, von den Bauern während der Anbauperiode entfernt. Anders bei den Saatgutproduktionsgebieten, hier werden Zuckerrüben angebaut die blühen sollen um dementsprechend Samen zu produzieren. Damit kann es zu einer Interaktion zwischen den Wildrüben und den Saatzuchtrüben kommen. Kommt es zu einem Austausch von genetischem Material so können sich sowohl auf den Saatzuchtfeldern Unkrautrüben bilden (Bartsch & Schmidt 1996; Pohl-Orf et al. 1998) und wie es in diesen vorliegenden Untersuchungen gezeigt wurde, vereinzelt Wildrüben bilden die genetisches Material aus Kulturrüben besitzen. Allerdings wurde nur gezeigt, dass es über die Jahre zu einem Austausch gekommen ist, es steht aber noch die Frage offen, wie stabil sich

---

<sup>19</sup> Empfehlung der Kommission mit Leitlinien für die Erarbeitung einzelstaatlicher Strategien und geeigneter Verfahren für die Koexistenz gentechnisch, konventioneller und ökologischer Kulturen (2003/556/EG)

<sup>20</sup> Umweltschaden ist eine Schädigung geschützter Arten und natürlicher Lebensräume, d.h. jeder Schaden der erhebliche nachteilige Auswirkungen in Bezug auf der Erreichung oder Beibehaltung des günstigen Erhaltungszustandes dieser Lebensräume oder Arten hat (Richtlinie 2003/35/EG).

diese Rüben in der Population Cervia etablieren. Allerdings ist es nicht von der Hand zu weisen, dass diese Population in direkter Nähe zu den Saatzuchtfeldern liegt, und sie sehr unter menschlichem Einfluss liegt (Rodung, Bewirtschaftung da Saline (Abb.5.3)).



**Abb.5.3:** Saline bei Cervia. Die Saline liegt in unmittelbarer Nähe zu den Zuckerrübensaatzfeldern.

Es wurde aber andererseits bewiesen, dass bei der Bildung von Hybridrüben (Unkrautrüben) die Etablierungsfähigkeit potentiell transgener Hybride zwischen Wildhybriden und Unkrautrüben unter Bezug auf die entsprechenden Experimente mit nicht gentechnisch veränderten Hybriden, bestätigen, dass für diese Pflanzen eine Etablierung unter Konkurrenz durch eine standorttypische Vegetation

auf Brachflächen nicht möglich ist (Pohl-Orf 1999a). Die Interaktion von Wild- und Kulturrüben hat weitere Konsequenzen hinsichtlich einer Verbreitung transgener Eigenschaften in den Wildrübenhabitaten, die in der Nähe der Saatgutproduktionsgebieten liegen. Auch wenn die Trennung potentiell transgener Bestäubungspflanzen in der Saatzucht und den Wildhabitaten über einige Kilometer eine relative Distanz für eine direkte Pollenübertragung darstellt (Pohl-Orf et al. 1998). Diese könnten als eine Art Verbindungsglied fungieren, um Distanz zu den Wildrüben zu überbrücken. Nach einer Einstäubung von Pollen transgener Pflanzen in die Unkrautpopulationen, könnten Nachkommen mit transgenen Eigenschaften ihrerseits durch Verbreitung von Pollen Einfluss auf andere Wildrübenbestände oder Saatgutproduktionspflanzen nehmen. Darüber hinaus könnten sie ihre Annualität in die Saatgutvermehrung einschleppen. Die Kombination von transgenen Eigenschaften und der genetisch bedingten Einjährigkeit (Boudry et al. 1993, Abe et al. 1997) könnte dazu führen, dass Saatgut, welches weltweit vertrieben wird, geringe Mengen von Hybridsamen enthält, das neben der Einjährigkeit auch transgenen Eigenschaften mit den oben beschriebenen Möglichkeiten zur Weiterverbreitung auf Kulturflächen und an Wildrübenstandorten.

Die diskutierten Ergebnisse zeigen, dass ein Genaustausch zwischen den Kultursorten und den Wildpopulationen, mehr als wahrscheinlich ist. Nun steht es zu Diskussion, ob sich durch die mögliche Einbürgerung transgener Eigenschaften in die Wildpopulationen ein eventueller Fitnessvorteil ergibt. Da der Nematode auch in den italienischen Zuckerrübenanbaugebieten ein ertragslimitierender Schädling darstellt, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass Nematodenresistente Rüben hier angebaut werden könnten. Ebenso besteht die Wahrscheinlichkeit, dass in diesen Saatgutproduktionsfeldern es zu einer Saatvermehrung von transgenem Material kommen kann. Da in dem Untersuchungsgebiet kein Rübenzystemnematode nachgewiesen werden konnte, stellt eine eventuelle vorhandene Nematodenresistenz in den Wildrübenpopulationen an der italienischen Adriaküste kein Selektionsvorteil dar. Die Bewertung auf diese vorhandene Datengrundlage sollte durch zusätzliche Untersuchungen erweitert werden, um den Aspekt einer ökologischen Risikoabschätzung insbesondere im Hinblick auf die Freisetzung transgener Zuckerrüben konkretisieren zu können.

Es ist das Fazit zu ziehen, dass es sich bei dem Untersuchungsgebiet um eine komplexe Situation handelt, in der alle Interaktionen zwischen den Kultur-, Unkraut- und Wildrüben hinsichtlich der weiteren Klärung der Hybridisierungsvorgängen zu berücksichtigen sind. Im Zuge einer weiteren ökologischen Risikoabschätzung müssen auch solche Phänomene wie pleiotrophe Effekte und horizontaler Gentransfer erforscht werden. Hier gilt nicht nur den bloßen Genaustausch zu berücksichtigen, sondern auch darum, welche Gene übertragen werden und welche Auswirkungen diese auf Zielorganismen ausüben.

## VI Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Erhebung von Daten zur Beurteilung der biologischen Sicherheit von Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) die mit Hilfe der Gentechnik resistent gegen Nematoden gezüchtet werden könnten. Im Vordergrund steht der Schutz der Verbreitung und genetischen Diversität von Wildrüben (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*), da sie als pflanzengenetische Ressource ein besonderes Schutzgut sind.

Ausgewählt für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden Wildrüben aus dem Po-Delta der norditalienischen Adriaküste. Diese Populationen sind von besonderem Interesse, da sie in unmittelbarer Nähe zu Saatgutvermehrungsfeldern von Zuckerrüben liegen und durch Genfluss beeinflusst werden könnten. Wildrüben anderer geographischer Herkünfte und Zuckerrüben wurden vergleichsweise untersucht. Es wurden Gewächshausversuche zur phänotypischen Reaktion von Rüben auf Nematodenbefall unter physiologischen Salzstress durchgeführt um das ökologische Verhalten der Pflanzen an ihren natürlichen Standorten an Meeresküsten zu simulieren. Gleichzeitig wurden von verschiedenen Samenherkünften genetische Diversitäts- und Herkunftsbestimmungen durchgeführt (AFLP, CMS-Nachweis).

Es wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Sind Wildformen von *Beta* gegenüber Nematodenbefall durch *H. schachtii* anfällig und wenn ja, haben höhere Bodensalzkonzentrationen an natürlichen Standorten von *B. vulg.* ssp. *maritima* einen Einfluss auf die Wirt-Parasit-Interaktion von Nematoden und Rübenpflanzen?

Es konnte gezeigt werden, dass die Wildrüben keine natürliche Resistenz gegenüber dem Rübenzystennematoden besitzen. Im Vergleich mit Zuckerrüben zeigte die Wildform aber eine etwas geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Nematodenbefall. Bei Salzkonzentration von 1%, die den natürlichen Standortbedingungen an Meeresküsten nahe kommen, sind Wildrüben deutlich schlechter mit Nematoden zu infizieren. Moderate Salzkonzentrationen von 0.5 % fördern dagegen den Befall. In Bodenproben von natürlichen Wildrüben-Standorten konnten keine Nematoden nachgewiesen werden. Aufgrund des fehlenden Nachweises einer Wirt-Parasit Interaktion durch offenbare

Abwesenheit des Parasiten sind ökologische Effekte durch gentechnisch erzeugte Nematodenresistenz unwahrscheinlich.

2. Wie hoch ist die genetische Diversität innerhalb der lokalen Population von *B. vulg. ssp. maritima* und gibt es Anzeichen für Genfluss in Wild-populationen? Erwartungsgemäß ist die genetische Diversität in Wildrüben höher als in Zuckerrüben. Vermutlich aufgrund der jahrhundertlangen Differenzierung sind Wildrüben der italienischen Adriaküste diverser als die erst seit kurzem etablierter Wildrüben an der deutschen Ostseeküste. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für den so genannten „*founder effect*“ in Pionier-Populationen der Wildrüben. Genetischen Distanzen zwischen den Populationen sind deutlich messbar und sprechen für eine genetische Differenzierung durch geographische Isolation, die nicht durch einen hohen Genfluss nivelliert wird. Genfluss durch Samen kann dennoch zumindest für eine italienische Wildrübenpopulation temporär nachgewiesen (CMS-Nachweis).

Die in dieser Arbeit gesammelten Erkenntnisse geben wertvolle Hinweise für die Umweltrisikoprüfung nach der europäischen Richtlinie 2001/18/EG für Zuckerrüben mit gentechnisch vermittelter Nematodenresistenz.

Ein Genfluss zwischen gentechnisch veränderten Kulturforen der Zuckerrübe (*B. vulg. ssp. vulgaris*) und Wildformen wie der *B. vulg. ssp. maritima* wird zwar zu begrenzen, nicht aber grundsätzlich zu vermeiden sein. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind nematodenresistente Kulturrüben nach dem derzeitigen Wissensstand kein besonderes Risiko, da der Rübenzystennematode (*H. schachtii*) in den Wildrübenstandorten fehlt. Dennoch sollte im Hinblick auf die Nutzung von Wildrüben als pflanzengenetische Ressource darauf geachtet werden, die Introgression von „Transgenen“ zu vermindern. Ein besonderes Augenmerk sollte deshalb auf das Management von blühenden Zuckerrüben wie z.B. Entfernung einjähriger Unkrautrüben oder Abstandmaßnahmen bei der Saatgutproduktion gelegt werden.

## 6.1 Abstract

Hybridization within or across different species in the genus *Beta* has been widely used for breeding of sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*). Interbreeding is easy with sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*). The genetic similarity of the sea beet provide a useful source of genetic characters, which could then be transferred to cultivated varieties. More complicated are inter-species crosses with *Beta procumbens*, but a nematode resistant gene was recently transferred with modern non-GMO as well as GMO breeding methods.

However, new genes with a potential impact on fitness characters have entered the *Beta vulgaris* species gene pool, and natural gene flow and introgression from cultivated sugar beet to wild sea beet plants may have important consequences. Cultivated beet seed production areas are sometimes adjacent to sea beet populations. It is likely that new transgenic or non-transgenic cultivars of sugar beet may hybridize with wild beets in the seed-production areas (f.e. northern Italy).

In this study I used experiments to study the potential ecological role of genes mediating resistance to an important beet pest, the nematode (*Heterodera schachtii*). This nematode causes a root disease, which decreases sugar quality. The gene of interest ( $Hs1^{pro-1}$ ) is widespread in *Beta procumbens* but so far unknown in (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*). Theoretically, *B. maritima* should be susceptible to *H. schachtii* since interbreeding has not provided any source of resistance to cultivated beet. But the potential co-existence of this nematode species with wild *B. maritima* along seashores has not been studied systematically. Detecting *H. schachtii* in natural habitats of *B. maritima* is difficult to perform. I therefore measured the susceptibility of different *B. maritima* populations under controlled nematode infestation in the laboratory at soil conditions found in natural seashore habitats. These habitats are characterized by moderate to high salt levels in the soil solution. If the fitness of nematodes is negatively effected by high salt conditions, than nematode resistance genes are of minor importance for wild *B. maritima* seashore populations. Our first results show that *B. maritima* are susceptible to *H. schachtii* even under high salt conditions, but exhibit weaker symptoms than cultivated beet. These preliminary results suggest that nematode resistance genes may have a moderate impact on the fitness of *B. maritima*, if *H. schachtii* is widespread in natural habits.

## VII Verzeichnisse

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Abe, J., Guan, G.P. & Shimamoto, Y.** (1997) A gene complex for annual habit in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Euphytica*, **94**, 129-135
- Aellen, P.** (1979) Chenopodiaceae. In Redinger, K.H. & Hegi, G. (eds.): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa II/2*, 2. Auflage, 533-747
- Anand, S.C., Wrather, J.A. & Shumway, C.R.** (1985) Soybean genotypes with resistance to races of soybean cyst nematode. *Crop Science* **25**, 1073-1075
- Arias, D., Rieseberg, H.** (1994) Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *App. Gen.* **89**, 655-660
- Baermann, G.** (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomen (Nematoden)- Larven in Erdproben. *Mededeel Geneesk. Lb. Weltevreden Festbundel*, Batavia, 41-47
- Balke, T.** (2001) Erfassung von Resistenz und Toleranz gegen den Rübenzysten-nematoden (*Heterodera schachtii*) in Feldversuchen mit Zuckerrüben und Einfluss einer resistenten Sorte auf die Entwicklung des Nematoden sowie auf seine pilzlichen Eierparasiten. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, November 2001
- Barocka, K.H.** (1985) Zucker- und Futterrüben, in: *Lehrbuch der Pflanzenzüchtung landwirtschaftlicher Kulturformen*, Bd. 2, Spezieller Teil, Paul Parey Verlag, Berlin-Hamburg, 245-287
- Baron, R.L.** (1994) A carbamate insecticide: A case study of Aldicarb. *Environmental Health Perspectives* 102, Supplement **11**, 23-27
- Bartsch, D., Schuphan I.** (1998) Gentechnische Eingriffe an Kulturpflanzen. Erschienen in: *Materialien zur Umweltforschung vom Rat von Sachverständigen für Umweltfragen: Zu Umweltproblemen der Freisetzung und des Interkehrbringens gentechnisch veränderter Pflanzen*. 53-122
- Bartsch, D. & Pohl-Orf, M.** (1996) Ecological aspects of transgenic sugar beet: Transfer and expression of herbicide resistance in hybrids with wild beets. *Euphytica* **91**, 55-88
- Bartsch, D. & Schuphan, I.** (2002) Lessons we can learn from ecological biosafety research. *Journal of Biotechnology*, **98**, 71-77
- Bartsch, D.** (1997) Ökologische Aspekte der Gentechnologie. Fachtagung „Umweltgerechter und ertragsorientierter Maisanbau“. Soest 8.-9. Juli, Deutsches Maiskomitee e.V. Bonn, 51-75
- Bartsch, D., Brand, U.** (1998) Saline soil condition decreases rhizomania infection of *Beta vulgaris*, *Journal of Plant Pathology*, **80** (3), 219-223
- Bartsch, D., Clegg, J. & Ellstrand, N.C.** (1999) Genetic evidence for the origin of Californian wild beets (genus *Beta*), *Molecular Ecology*
- Bartsch, D., Cuguen, J., Biancardi, E. & Sweet, J.** (2003b) Environmental implications of gene flow from sugar beet to wild beet – current status and future research needs. *Environmental Biosafety Research* **2**, 105-115.



- Bartsch, D., Ellstrand N.C.** (1999) Genetic evidence for the origin of Californian wild beets (genus *Beta*). *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 1120-1130
- Bartsch, D., Hoffmann, A., Lehnen M., Wehres, U.** (2003a) Ecological consequences of gene flow from cultivars to wild relatives, Rhizomania resistance genes in the genus *Beta*. In, T. Lelley, E. Balazs, M. Tepfer (Eds.) *Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems*. Facultas Verlags- und Buchhandelsgesellschaft AG, Wien: 115 – 130.
- Bartsch, D., Lehnen, M., Clegg, J., Pohl-Orf, M., Schuphan, I., Ellstrand, N.C.** (1999) Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology* **8**, 1733-1741.
- Bartsch, D., Schmidt, M.** (1997) Influence of sugar beet breeding on populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in Italy. *J Veget Sci* **8**, 81–84
- Bartsch, D., Sukopp, H. & Sukopp, U.** (1993) Introduction of plants with special regard to cultigens running wild. *Transgenic organisms*. Birkhäuser Verlag, Switzerland
- Barzen, E., Mechelke, W., Ritter, E., Seitzer, J.F., Salamini, F.** (1992) RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogermmy and hypocotyl colour. *Plant Journal* **2**, 601-611
- BBA,** (2000) (Biologische Bundesanstalt für Landwirtschaft und Forsten) Liste der zugelassenen Pflanzenschutzmittel (Hrsg. BBA)
- Bell, C.H., Price, N., Chakrabart, B.** (1996) *Agrochemicals and Plant Protection: The Methyl Bromide Issue*. John Wiley & Sons, Chichester, Großbritannien
- Boerma, H. R., & Hussey, R.S.** (1984) Tolerance to *Heterodera glycines* in soybean. *Journal of Nematology* **16**, 289-296.
- Boudry, P., Mörchen, M., Saumitou-Laprade, P., Vernet, P. & vanDijk, H.** (1993) The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets, *Theoretical and Applied Genetics* **87**, 471-478
- Boudry, P., Wieber, R., Saumitou-Laprade, P., Pillen, K., vanDijk, H. & Jung, C.** (1994) Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene B and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied genetics* **88**, 852-858
- Brand, U.** (1997) Untersuchungen zur Diversität in italienischen Wildpopulationen von *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*—Ein Beitrag zur ökologischen Risikoabschätzung von transgenen Kulturpflanzen. Diplomarbeit, RWTH-Aachen, Februar 1997
- Büchting, A.J.** (1998) Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* **28**, 16-21
- Christensen, E.** (1996) Neuer Fund der Betarübe an Schleswig-Holsteins Ostseeküste, *Kieler Notizen zur Pflanzenkunde in Schleswig-Holstein und Hamburg* **24**, 30-38
- Cook, R. & Evans K.** (1987) Resistance and tolerance. In: Brown, R.H. & Kerry, B.R. (Eds.) *—Principles and practice of nematode control in crops—* Sydney, Academic Press 179-231

- Curtis**, W.M. (1967) The students flora of Tasmania, T.J. Hughes, Government Printer, Tasmania, Part **3**, 573
- Dale**, P.J., Irwin, J.A., Scheffler, J.A. (1993) The Experimental and Commercial Release of Transgenic Crop Plants. *Plant Breeding* **111**, 1-22
- Darmency**, H. (1994) The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their relate species: introgression and weedeness. *Molecular Ecology* **3**, 37-40
- Decker**, H. (1963) Pflanzenparasitäre Nematoden und ihre Bekämpfung. Dt. Landwirtschaftsverlag Berlin
- Decker**, H. (1969) Phytonematologie. Dt. Landwirtschafts-Verlag Berlin
- Desplanque**, B., Boudry, P., Broomberg, K., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J. & vanDijk, H. (1998) Genetic Diversity and Gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae). assessed by RFLP and Microsatellite Markers. In: Theoretical Applied Genetics **98**, 1194-1201
- Desplanque**, B., Viard, F., Forciolo, D., Bernard, J., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J. & van Dijk, H. (2000) The linkage disequilibrium between cpDNA and mtDNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Molecular Ecology*, **9**, 141-154
- DeWet**, J.M.J. & Harlan J.R. (1975) Weeds and domesticates: Evolution in the manmade habitat. *Econ. Bot.* **29**. 99-107
- Dowe**, A. (1969) Die Bedeutung natürlicher Feinde für die Bekämpfung von zystenbildenden Nematoden. *Wissenschaftliche Zeitung der Universität Rostock*, 18.Jahrgang Mathematische-Naturwissenschaftliche Reihe, Heft **3/4**, 397-402
- Driessen**, S. (1999) Populationsökologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Beta vulgaris* ssp. *maritima* Arcangeli: Im Küstengebiet von Nord- und Ostsee unter besonderer Berücksichtigung ihrer genetischen und morphologischen Variabilität
- Driessen**, S. (2003) *Beta vulgaris* subsp. *maritima* an Deutschlands Ostseeküste. Kartierung, genetische und physiologische Charakterisierung und ihr Rolle als Kreuzungspartner für transgene Zuckerrüben. Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH-Aachen.
- Driessen**, S., Pohl, M., Bartsch, D. (2001) RAPD-PCR analysis of the genetic origin of sea beat (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) at Germany's Baltic sea coast. *Basic and Applied Ecology*, **2**, 341-349
- Dürschner**, U. (1993) Pilzliche Endoparasiten an beweglichen Nematodenstadien. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt*, Heft **217**, 83 S.
- Ekingen**, H.R. (1986) Verfügbarkeit genetischer Ressourcen in Entwicklungsländern. Türkei. Vorträge für Pflanzenzüchtung. Heft **10**. S. 37-47.
- Ellenberg**, H. (1992) Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. 2. Auflage, *Scripta Geobot.* 18 S.
- Ellstrand**, N.C. (1988) Pollen as a Vehicle for the Escape of engineered Genes? *Trends in Ecology and Evolution* **3**, 30-32
- Ellstrand**, N.C. (1992) Gene flow among seed plant production. *New For.* **6**, 241-256

- Ellstrand, N.C., Hoffmann, C.A.** (1990) Hybridization as an Avenue of Escape for Engineered Genes. *BioScience* **40**, 4238-442
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., Hancock, J.F.** (1999) Gene Flow and introgression from Domesticated Plants into their Wild relatives. *Annuals Review of Ecology and Systematics* **30**, 539-563
- Evans, A. & Weier, J** (1981) The evolution of weed beet in sugar beet crops, *Kulturpflanze* **29**, 301-310
- Evans, K. & Haydock, P.P.J.** (1990) A review of tolerance by potato plants of cyst nematode attack, with consideration of what factors may confer tolerance and methods of assaying and improving it in crops. *Ann. Appl. Biol.* **117**, 703-740
- Fichtner, E.** (1985) Untersuchungen zur Ableitung einer Temperatursummen-Methode für die Überwachung von *Heterodera schachtii* (Schmidt 1871) in Zuckerrübenfruchtfolgen. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **21**, 31-40
- Fichtner, E.** (1986) Einfluss von Textur, Gehalt an organischer Substanz, Dichte und Luftgehalt des Bodens auf die Vermehrung von *Heterodera schachtii* (Schmidt 1871) an Zuckerrüben. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **21**, 343-350
- Frankel, O. & Bennett E.** (1970) Genetic Resources in Plants – Their Exploration and Conservation. IBP-Handbook No. **11**, Oxford
- Frese, L.** (1991) Sammlung, Erhaltung und Nutzbarmachung der genetischen Ressourcen von Beta-Rüben (*Beta vulgaris* L.) und Wurzelzichorien (*Cichorium intybus* L.). *Landbauforschung Völkenrode*, **41**, 65-73
- Frese, L.** (1996) Pflanzengenetische Vielfalt für die Welternährung, *Spektrum der Wissenschaft* **11**, 82-87
- Graner, A.** (2003) Kulturpflanzen evolution: Moderne Pflanzenzüchtung als Biodiversitätssink?. In: *Nova Acta Leopoldina* NF 87 Nr. **328**, S. 147-161.
- Grant, V.** (1981) *Plant Speciation*. New York, Columbia University Press 2nd Edition
- Gray, F.A., Franc, G.D., Kerr, F.D.** (1992) Sugar beet nematode. Cooperative Extension Service, University of Wyoming, B-975
- Greco, N., D'Addabbo T., Brandonisio, A. & Elia, F.** (1993) Damage to Italian Crops caused by cyst-forming nematodes. Supplement to *Journal of Nematology* **25**, 836-842
- Halden, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M. & Säll, T.** (1994) Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics* **88**, 123-128
- Hammer, K. & Willner, E.** (1997) Genbanken. In: W. Odenbach (Hrsg.), *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung*, pp. 23-30. Parey Buchverlag, Berlin.
- Hammer, K.** (1998) Genpools – Struktur, Verfügbarkeit und Bearbeitung für die Züchtung. *Schriften zu Genetischen Ressourcen* **4**, 245-283
- Hammer, K., Esquivel, M. & Knüpffer, H.** (1992-1994) "...y tienen faxones y fabas muy diversos de los nuestros..." Origin, Evolution and Diversity of Cuban Plant Genetic Resources. IPK, Gatersleben, **3** vols.

- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W.** (1997) Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Sci.* **37**, 26-30
- Harlan, J.R.** (1951) Anatomy of gene Centers. *Amer. Nat.* **85**, 97-103
- Hartwig, E.E. & Epps, J.M.** (1978) Registration of Bedford Soybeans. *Crop Science* **18**, 915
- Hawkes, J.G.,** (1997) J.G. Hawkes – distinguished economic botanist. Reply to AWARD – 4<sup>th</sup> July 1996, *Econ. Bot.* **51**, 2-5
- Heijbroek, W., McFarlane, J.S.M. & Doney, D.L.** (1977) Breeding for tolerance to beet cyst eelworm *Heterodera schachtii* Schm. in sugar beet *Euphytica* **32**, 287-298
- Hilleshög, (Syngenta Seeds)** (2002) Nematoden, eine Herausforderung für den Rübenanbau. Informationen zur Zuckerrübe von Hilleshög - Nematoden
- Horsney, K.G. & Arnold, M.H.** (1979) The origin of weed beet, *Annals of Applied Biology*, **92** 279-285
- Jung, C.** (1998) Züchterischer Durchbruch erzielt. *Zuckerrübe* **47**, 1, 39
- Jung, C.,** (1997) Identifizierung eines Resistenzgens zum Schutz von Zuckerrüben gegen Fadenwürmer. *Spektrum der Wissenschaft* **11**, 14-16
- Jung, C., Pillen, K., Frese, L., Fähr, S. & Melchinger, A.E.** (1993) Phylogenetic relationship between cultivate and wild species of the genus *Beta* revealed by DNA "fingerprinting". *Theor. Appl. Genet.* **86**, 449-457
- Jung, C., Wricke, G.** (1987) Selection of diploid nematode-resistant sugar beet from monosomic addition lines. *Plant Breeding* **98**, 205-214
- Jung, C., Wyss, U.** (1999) New approaches to control plant parasitic nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 439-446
- Kapteijns, A.J.A.M.** (1993) Risk assessment of genetically modified crops. Potential of four arable crops to hybridised with the wild flora. *Euphytica* **66**. 145-149
- Kareiva, P., Morris, W. & Jacobi, C.M.** (1994) Studying and managing the risk of crossfertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* **3**, 15-21
- Kleine, M, Cai D, Eibl C, Herrmann RG, Jung C** (1995) Physical mapping and cloning of a translocation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) carrying a gene for nematode (*Heterodera schachtii*) resistance from *B. procumbens*. *Theor Appl Genet* **90**, 399-406
- Kleine, M., Cai, D., Klein-Lankhorst, R.M., Sandal, N.N., Salentijn, E.M.J., Harloff, H., Kifle, S., Marcker, K.A., Stiekema, W.J., Jung, C.** (1997) Breeding for nematode resistance in sugar beet: A molecular Approach . *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions.* 176-190
- Klinger, T., Arriola, P.E. & Ellstrand, N.C.** (1999) Crop weed hybridization in radish (*Raphanus sativus*): effects of distance and population size. *American Journal of Botany*, **79**, 1431-1435
- Knapp, E.** (1958) Beta-Rüben, *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, Bd. 3, Züchtung der Knollen- und Wurzelfruchtarten, Hrsg. Kappert, H. und Rudorf, W., Paul Parey Verlag, Berlin Hamburg, 196-283

- Koch**, F. (1980) Die Rhizomania der Zuckerrübe. Bericht auf der Grundlage eines Erfahrungsaustausches von Sachverständigen des IIRB, Sitzung vom 26./27.06. 1980, Paris
- Koenning**, S. R., Anand, S. C., Meyers, G. O. (1992) An alternative method for evaluating soybean tolerance to *Heterodera glycines*. Journal of Nematology 24 (1)
- Krause**, A. & Olson, M. (2000) The Basics of S and S-Plus, 2nd edn. Springer Verlag
- KWS**, (Kleinwanzlebener Saatzucht) (2002) Methoden gegen Nematoden, Ratgeber für den Zuckerrübenanbau
- Lange**, W., Jung, C., & Heijbroek, W. (1990) Transfer of beet cyst nematode resistance from *Beta* species of the section Patellaris to cultivated beet. Proc. 53th Winter Congr. int. Inst. Sugar Beet Res., Brussels, 14-15 Feb. 1990, 89-102
- Lauenstein**, G. (1977) Untersuchungen zur Resistenz und Toleranz ausgewählter Wirtschaftssorten von Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.) bei Befall mit Kartoffelnematoden (*Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens), Virulenzgruppe Pa 2/3. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz 104, 321-335
- Lehnen**, M. (2000) Molekulare Untersuchungen zur Diversität von *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, Diplomarbeit an der RWTH-Aachen. Dezember 2000
- Lerch**, G. (1991) Pflanzenökologie. Akademie Verlag Berlin
- Letschert**, J.P.W. (1993) *Beta* section *Beta*, biographical patterns of variation and taxonomy, Dissertation Universität Wageningen
- Lexander**, K. (1980) Present knowledge on sugarbeet bolting mechanisms. Proc. Int. Inst. Sugar Beet Res., 43rd Winter Congress, Brussels, 245-258
- Lippmann**, E.O. von (1925) Geschichte der Rübe (*Beta*) als Kulturpflanze. Springer, Berlin
- Marggraf**, A.S. (1747) Chemische Versuche, einen wahren Zucker aus verschiedene Pflanzen die in unseren Ländern wachsen zu ziehen. Ber. d. Wiss., Berlin, 79-90
- McNeely**, J.A. (1990) Nature and culture: Conservation needs them both. Nautre and resources 28 (3), 37-43
- Mesken**, M. & Lekkerker, B. (1982) Selectie op partiele resistentie tegen het bietecystenaaltje in kruisingen van suiker- en voederbieten met *B. maritima*. Prophyta, Bijlage Januari, 68-71
- Milbourne**, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., & Waugh, R. (1997) Comparision of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato Mol. Breed. 3, 127-136
- Müller**, J. (1989) Zur Definition von Resistenz und anderer Fachbegriffe in der Nematologie. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst 41, 137-139
- Müller**, J. (1992) Detection of pathotypes by assessing the virulence of *Heterodera schachtii* populations. Nematologica 38, 50-64
- Müller**, J. (1998) Investigation on the contents of *Heterodera schachtii* cysts from susceptible and resistant sugar-beet plants. Nematologica 38 50-64

- Munerati, O.** (1931) L'eredita della tendenza alla annualita nella commune barbabietietola coltivata. Zeitschrift Züchtung, Reihe A, Pflanzenzüchtung **17**, 84-89
- Nei, M. & Li, W.H.** (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proceedings of the National Academy of Science, USA, **76**, 5269-5273
- Nei, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics **89**, S. 583 . 590.
- Nevers, P.,** (1991) Pflanzenzüchtung aus der Nähe gesehen. Max-Planck Institut für Züchtungsforschung (Hrsg.), Köln 4-7
- Owen, F.W.** (1945) Cytoplasmatically inherited male sterility in sugar beets. J. of Agricultural Research, **71**, 423-440
- Parker, I. & Bartsch, D.** (1996) Recent advances in ecological biosafety research on the risks of transgenic plants: A trans- continental perspective, in: Tomiuk, J., Sentker, A. and Wöhrmann, K. (eds): Transgenic Organisms – Biological and Social Implications. Birkhäuser- Verlag Basel, 147-161
- Petersen, L., Ostergard , H., Giese, H.** (1994) Genetic diversity among wild and cultivated barley as revealed by RFLP. TAG **89**, 676-681
- Pillen, K.; Steinrücken, G., Wricke, G., Herrmann, R.g., Jung, C.** (1992). A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Theoretical Applied Genetics **84**, 129-135
- Pohl-Orf, M.** (1999) Untersuchungen zur Ausbreitungswahrscheinlichkeit transgener Eigenschaften gentechnisch veränderter Zuckerrüben, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*- Überwinterung, Überdauerung in Brach-sukzessionen und RAPD-PCR zur molekularen Analyse verwandtschaftlicher Beziehungen. PhD Thesis. RWTH-Aachen
- Pohl-Orf, M., Brand, U., Driessen, S., Hesse, P., Lehnen, M., Morak, C., Mücher, T., Saegltiz, C., vonSoosten, C. & Bartsch, D.** (1999) Overwintering of genetically modified sugar beet, *Beta vulgaris* var. *altissima* Döll, as a source for dispersal of transgenic pollen. Euphytica. Enviromental, **108**, 181-186
- Potthast, T.** (1996) Transgenic organisms and evolution: Ethical implications, in: Tomiuk, J., Wöhrmann, K. & Sentker, A. (eds), Transgenic Organisms– Biological and Social Implications, Birkhäuser- Verlag Basel, 227-240
- Powell, W., Morgante, M., Andre, M., Hanafrey, M., Vogel, J.M. & Tingey, S.V.** (1996) The comparasion of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. **2**, 225-238
- Primack, R. B.** (1995) Naturschutzbiologie. Berlin, Oxford (Spektrum Akademischer Verlag).
- Ran, Z. & Michaelis, G.,** (1995) Mapping of chloroplast RFLP marker associated with the CMS cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris*). Theoretical and Applied Genetics, **91**, 836-840
- Raybould, R.F., Gray, A.J.** (1993) Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: A UK perspective. Journal of Applied Ecology **30**, 199-219

- Rose, T.** (2001) Fermentation und Verkapselung des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* in Polyelektrolyt-Hohlkugeln zur Bekämpfung des Nematoden *Heterodera schachtii*. Dissertation, TU Braunschweig, Januar 2001
- Ross, J.P. & Brim, C.A.** (1966) Registration of pickett soybeans. *Crop Science* **6**, 305
- Sadeghian, Y.W.** (1993) Bolting in sugar beet, genetics and physiological aspects. The Swedish University of Agricultural Science, Department of Plant Breeding Research, Svalov
- Saeglitz, C.** (1999) Freisetzung transgener Zuckerrüben (*Beta vulgaris* var. *altissima* DÖLL): Untersuchungen zur Auskreuzung durch Pollenflug. Diplomarbeit, RWTH-Aachen, Mai 1999
- Santoni, S. & Berville, A.** (1992) Evidence for gene exchange between sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beets: consequences for transgenic sugar beets, *Plant and Applied Genetics* **85** 529-535
- Saumitou-Laprade, P., Rouwendal, G.J.A., Cuguen, J., Krens, F.A., Michaelis, G.** (1993) Different CMS sources found in *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. mitochondrial variability in wild populations revealed by a rapid screening procedure. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 529-535
- Savitsky, H.** (1975) Hybridization between *Beta vulgaris* and *B. procumbens* and transmission of Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance to sugar beet. *Canadian journal of genetics and Cytology.* **17**. 197-209
- Savitsky, H.** (1978) Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance and meiosis in diploid plants from interspecific *Beta vulgaris* x *Beta procumbens* hybrids. *Canadian journal of genetics genetics an Cytology* **17**. 177-209
- Schacht, H.** (1859) Über einige Feinde der Rübenfelder. *Zeitung des Verbandes des Rübenzuckerindustrie des dt. Reiches* **9**, 175-179
- Schiemann, E., Noll, F., Schenck, H. & Schimper, A.F.W.** (1932) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 33. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 109-111
- Schlang, J.** (1991a) Anbau resistenter Zwischenfrüchte zur biologischen Bekämpfung des Rübenzystemnematoden. *Zuckerrübe* **40**, 240-22
- Schlang, J.** (1991b) Biologische Nematodenbekämpfung, Saaten-Union GmbH, Hannover
- Schlang, J.** (2001) Die Kontrolle von *Heterodera schachtii* in Zuckerrüben-Fruchtfolgen. AK Nematologie-Tagung 2001, Abstract
- Schlösser, E.** (1997) Allgemeine Phytopathologie, **2.**, neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York
- Schmidt, M., Bartsch, D.** (1996) Zum Einfluss der Zuckerrübensaatgutproduktion auf Wildrüben– Ein Beitrag zur ökologischen Risikoabschätzung von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* **26**, 575-580
- Schondelmaier, J., Steinrücken, G., Jung.** (1996) Integration of AFLP markers into a linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Plant Breeding* **115**, 231-237

- Schumacher**, K., Schondelmaier, J., Barzen, E., Steinrücken, G. Borchardt, D., Weber, W.E., Jung, C., Salamini, F. (1997) Combining different linkage maps in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to make one map. *Plant breeding* **116**, 23-38
- Smit**, A.L. (1982) Influence of the temperature and day length on bolting in sugarbeet, Proceedings of the International Institute for Sugarbeet Research, 45th Winter Congress, Brussels 25-36
- Sneath**, P.H.A. & Socal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy. W. Freeman, San Francisco.
- Sperlich**, D. (1998) Populationsgenetik: Grundlagen und experimentelle Ergebnisse, 2- Aufl., Gustav-Fischer Verlag
- Steele**, A.E. (1965) The host range of the sugar beet nematode, *Heterodera schachtii* Schmidt. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists* **13**, 573-603
- Sukopp**, H. & Sukopp, U. (1993a) Ecological long-term effects of cultigens becoming feral and of naturalization of non-native species. Birkhäuser Verlag. Basel
- Sukopp**, H. (1996) Welche Natur wollen wir schützen? Fragen der Ökologie und der Naturschutzes in : Bartsch, D. & Haag, C. (eds), Langzeitmonitoring von Umwelteffekten transgener Organismen, UBA-Texte 58/96, 27-46
- Sukopp**, U. & Sukopp, H. (1993b) Das Modell der Einführung und Einbürgerung nicht einheimischer Arten, *GAIA*, 2, Spektrum Akademischer Verlag, 267-288
- Tiedemann**, R. (2001) Ökologische Genetik der Ostseekegelrobbe: Molekulare Methoden in der Erfassung biologischer Vielfalt. Erschienen in: Korn, H. & Feit, U. (2001): Treffpunkt Biologische Vielfalt, Bundesamt für Naturschutz
- Tiedje**, J.M.R., Colwell, R.L., Grossmann, Y.I., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.N. & Regal, P.J. (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* **70**, 298-315.
- Tralle**, K.A. & Blumenberg, E. (1998) Nematoden in Zuckerrüben: Resistente Sorten helfen bei der Kontrolle und sichern den Ertrag. *Zuckerrübe* **47**, 1, 34-36
- Tranzschel**, T. (1927) Die Arten der Gattung *Beta* L. *Bull. appl. Bot & Pl. Breed.* (Trudy) **17**. 203-223 (russ. m. dtsh. Zusammenfassung) *Ref. ber. wiss. Biol.* 6.210 (1928)
- Trudgill**, D.L. (1991) Resistance to and tolerance of plant parasite in plants. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 167-92
- Tutin**, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valetine, D.H., Walters, S.M. & Weeb, D.A. (1964) *Flora europae*, Band 1, Lycopodaceae to Plantaceae. Cambridge University Press, 91-92
- Ulbrich**, E. (1934) *Beta*. In: Engler. A. & Krantl (Hrsg.), *Natürliche Pflanzenfamilien*, ed. 2. 16e, 457-480
- van de Peer**, Y., & Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows enviroment, *Compu Applic Biosci.* **10**, 569-570



- vanDijk**, H. & Boudry, P., McCombie, H. & Vernet, P. (1997) Flowering time in wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) along a latitudinal cline. *Acta Ecologica* **18** (1) 47-60
- vanDijk**, H.; Boudry, P.; Mc (1989) Genetic variability for life-histories in *Beta maritima*. Second Beta Network meeting, 9-16
- Vavilov**, N.I. (1926) Geographical regularities in the distribution of genes of cultivated plants. *Bull. appl. bot. Gen. i Sel.* **17**, **3**, 411-428
- Venables**, W.N.& Ripley, B.D. (1999) *Modern Applied Statistics with S-Plus*, 3rd edn. Springer Verlag
- vonBroock**, R. (2002) Biodiversität. In: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft: Diskurs Grüne Gentechnik (Online: <http://www.transgen.de>).
- Vos**, P., Hogers, R., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M. Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414
- Wallace**, H. R. (1987a) A perception of Tolerance. *Nematologica* **33**, 419-432.
- Wehres**, U. (2001) Untersuchungen zur Populationsdynamik und genetische Diversität von *Beta vulgaris* subsp. *maritima* an der deutschen Ostseeküste – Grunddaten für ein Monitoring nach Inverkehrbringen transgener Zuckerrüben. Diplomarbeit, RWTHAachen
- Wilmanns**, O. (1993) *Ökologisches Pflanzensoziologie*. 5. Auflage, Quelle und Meyer Verlag, 479
- Young**, L.D. & Hartwig, E. E. (1988) Selection pressure on soybean cyst nematode from soybean cropping sequences. *Crop Science* **28**, 845-847
- Zosimovic**, V.P. (1934) *Especies et formes sauvages du genre Beta L. d'apres de nouvelles recherches effectuees dans URSS*. I.I.R.B.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb.2.1:** Aus der Wildrübe wurden die folgenden Kultur- und Nutzpflanzen kultiviert: die Zuckerrübe, die Runkel-/Futterrübe, der Mangold und die Rote Rübe/Beete (Letschert 1993). Von links nach rechts, beginnend mit der Wildrübe. \_\_\_\_\_ **6**
- Abb.2.2:** Die Blüten der Gattung *Beta* stehen in einer Rispe  
Der Blütenstand ist eher unscheinbar und besteht aus einer Blütenhülle die mit dem Fruchtknoten verwachsen ist. \_\_\_\_\_ **7**
- Abb.2.3:** Der Rübenzystennematode *H. schachtii* gehört zum Stamm der *Nemathelminthes* (Rundwürmer), darunter zur Klasse der *Nematoda* (Fadenwürmer) und zur Ordnung der Tylenchida \_\_\_\_\_ **8**
- Abb.2.4:** Verbreitung von *H. schachtii* in Europa aus: KWS 2002 \_\_\_\_\_ **8**
- Abb.2.5:** Befallsnest im Feld (aus: KWS 2002) \_\_\_\_\_ **9**
- Abb.2.6:** Wurzelbart an einer Zuckerrübe bei Nematodenbefall (aus: KWS 2002) \_\_\_\_\_ **9**
- Abb.2.7:** Lebenszyklus von *H. schachtii* mit den verschiedenen Larvenstadien \_\_\_\_\_ **9**
- Abb.3.1:** Übersicht über die Fundorte von *B. vulg. ssp. maritima* an der norditalienischen Adriaküste. Die angegebenen Markierungen stellen die Fundorte der Populationen dar und sind in Tab.3.1 erläutert. \_\_\_\_\_ **16**
- Abb.3.2:** Darstellung eines einfachen Box-Plots. Mit Ausreißern, Median und Perzentilen \_\_\_\_\_ **26**
- Abb.3.3:** Karte der sequenzierten cpDNA-Region. Schwarze Kästchen zeigen kodierende Regionen an. Die Lage der polymorphen *HindIII*-Schnittstelle ist eingezeichnet (Ran und Michaelis, 1995). \_\_\_\_\_ **29**
- Abb.3.4:** Längenstandard  $\lambda$ DNA/ Eco47 I \*, Markiert sind die Banden zwischen 511 und 597 Basenpaarlänge. Liegt die nach der Gelelektrophorese sichtbare Bande zwischen den beiden markierten Banden, so handelt es sich um DNA einer Wildrübe. Liegt die gefundene Bande unterhalb der Markierung, so handelt es sich um DNA einer Kulturrübe. \_\_\_\_\_ **31**
- Abb.4.1:** Standort Fusina, nahe eines Gewerbegebietes und Campingplatzes. \_\_\_\_\_ **39**
- Abb.4.2:** Vergleich der Summe der Mittelwerte der Zysten pro Pflanze aller Populationen bei den verschiedenen Salzkonzentrationen. Die Abkürzungen sind in Tab.3.4 im Kapitel 3.4.3 erläutert. \_\_\_\_\_ **42**
- Abb.4.3:** Einfluss der drei verschiedenen Salzkonzentrationen 0%, 0,5% und 1% auf den Infektionsgrad. Die Konzentrationen haben einen unterschiedlichen signifikanten Einfluss auf den Befall der Nematoden. Bei der Konzentration 0,5% zeigte sich ein deutlich stärkerer Befall als bei 0% oder 1% (hier war der Befall am geringsten). Das Perzentil der beiden Boxes der Konzentrationen 0% und 1% zeigt eine gleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben (Normalverteilt). \_\_\_\_\_ **43**
- Abb.4.4:** Vergleich des Einflusses der beiden Sorten Wildrübe und Kulturrübe auf den Infektionsgrad. Die Kulturrübe zeigte einen geringfügigen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Zysten des Nematoden, als die Wildrübe.  
Das Perzentil der beiden Boxes zeigt eine gleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben (Normalverteilt). \_\_\_\_\_ **44**

**Abb.4.5:** Einfluss der vier verschiedenen Anzucht-kammern, auf den Infektionsgrad des Nematoden, auf die Pflanzen. Bei der Kammer 2 ist der Befall von Nematoden signifikant höher als bei den Kammern 1, 3 und 4. Das Perzentil der vier Boxes zeigt eine gleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben (normalverteilt).\_\_\_\_\_45

**Abb.4.6:** Vergleich der verschiedenen Regionen miteinander, wobei die Kulturrübe auch als Region gezählt wurde. Der Vergleich zeigte bei den Wildrüben aus Helgoland und der Ostsee und der Kulturrübe einen signifikanten Unterschied im Befall der Nematoden, zu den Wildrüben der Adriaküste (Italien). Das Perzentil der vier Boxes zeigt bei allen Regionen eine Normalverteilung.\_\_\_\_\_45

**Abb.4.7:** Vergleich des Einflusses des Infektionsgrades der verschiedenen Populationen miteinander 1=Kulturrübe 2-6 der deutschen Wildrüben, 7-14 Wildrüben der italienischen Adriaküste. Die signifikanten Unterschiede der einzelnen Populationen zeigte sich im Unterschied der Populationen 1-6 zu den Populationen 7-14. Wie schon die Abbildung 4.5 zeigte, sind die Wildrüben der italienischen Adriaküste stärker Befallen als die Wildrüben der Ostseeküste und der Kulturrübe. Aber auch innerhalb der Populationen zeigten sich signifikante Unterschiede. So war die italienische Wildrübe aus der Population AUSA CORNO am stärksten Befallen und die Wildrübe der Ostsee aus der Population am geringsten Befallen. Das Perzentil der vierzehn Boxes zeigt bei sieben (H, Fa, BB, AIC, AC, PS, und Fu) eine ungleichmäßige Verteilung in dem Infektionsgrad der Rüben an, die restlichen Populationen zeigen eine Normalverteilung an.\_\_\_\_\_46

**Abb.4.8:** Bild eines Agarosegels nach der Restriktion mit *HindIII*. In Spur 1-3 und 8-10 ist das unverdaute Fragment zu sehen, wie es bei Rüben vorkommt, die das Merkmal für CMS nicht tragen. Bei den Kulturrüben dagegen (Spur 4,5 und 7) ist eines der beiden kleineren Fragmente zu sehen, das nach der Restriktion aufgrund der entsprechenden Schnittstelle entsteht.\_\_\_\_\_47

**Abb.4.9:** M=Markerlinie Bei den Proben die 1998 am Standort Cervia gesammelt wurden waren alle Proben negativ (links Wildrübe). Es handelt sich um eine vollständige Wildrübenpopulation. Als Kontrolle wurde rechts Kulturrüben geprüft, in allen Proben war die Bande für das CMS zu erkennen.\_\_\_\_\_48

**Abb.4.10:** M=Markerlinie, 1=Blindprobe, 2=negativ Kontrolle (Wildrübe). Bei den Proben die 1999 in Cervia gesammelt wurden, handelte es sich um eine Mischpopulation von CMS positiven (3-6,13) und CMS negativen (7-12) Proben. Probe 1 Blindprobe, Probe 2 Kontrolle einer Wildrübe, Probe 3 Kontrolle einer Kulturrübe mit einer CMS-Bande. 48

**Abb.4.11:** M=Markerlinie, P=negativ Kontrolle. Bei den Proben die 2001 vom Standort Cervia gesammelt wurden, handelt es sich um eine Hybridpopulation. Die Proben 1,2 5-8 besitzen das CMS. Bei den Proben 3 und 4 ist kein CMS vorhanden.\_\_\_\_\_48

**Abb.4.12:** Ausschnitt aus einem PA-Gel der italienischen Populationen N, To; Bo, SM, Pe, Fu mit der Primenkombination P5. Es wurden jeweils die DNA von 10 Individuen pro Population verwendet. An erster und an letzter Stelle befindet sich der Längenstandard M (50-350bp).\_\_\_\_\_50

**Abb.4.13:** Die italienische Adriaküste mit den eingezeichneten Standorten der Wildrübenpopulationen.\_\_\_\_\_54

**Abb.4.14:** AFLP-Dendrogramm der UPGMA-Analyse mit Bootstrap-Werten.\_\_\_\_\_56

**Abb.5.1:** Charakteristischer Standort der *B. vulg. ssp. maritima* für die italienische Adriaküste (hier Standort Albarella).\_\_\_\_\_62

**Abb.5.2:** Kultur-Unkrautrübenkomplexe (Harlan, 1965).\_\_\_\_\_65

**Abb.5.3:** Saline bei Cervia. Die Saline liegt in unmittelbarer Nähe zu den Zuckerrübensaatgutfeldern. \_\_\_\_\_ **72**

### 7.3 Tabellenverzeichnis

**Tab.3.1:** Liste der in den Untersuchungen berücksichtigten Wildrübenpopulationen. Angegeben sind Standort/Herkunft, verwendete Abkürzungen (Abk.), Ursprungs-Region, Jahr der Probennahme der Samen und die Art der Untersuchungen (Nematoden-Suszeptibilitätstest zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber Nematoden, Bestimmung der genetischen Diversität mit Hilfe der Amplified Fragment Length Polymorphism-Methode (AFLP), Untersuchung der mütterlichen Herkunft des Untersuchungsmaterials (CMS) [Wild- oder Kulturherkunft]). \_\_\_\_\_ **18**

**Tab.3.2:** Anzahl der untersuchten Senf- und Kulturrübenpflanzen zur Bestimmung des Nematodengehaltes in Bodenproben von verschiedenen Wildrübenstandorten. Die Bezeichnung a/b/c/d stehen für die Anzahl an Proben die genommen wurden. Als positiv und Negativkontrolle wurden der Senf und die Kulturrübe einmal in infizierter Erde und nicht infizierter Erde angezogen. Die infizierte Erde wurde mit jeweils 15 Zysten von *H. schachtii* inokuliert. \_\_\_\_\_ **21**

**Tab.3.3:** Versuchspflanzenzahl zur Bestimmung der Infektiösität von Rübennematoden in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Gießwassers. \_\_\_\_\_ **23**

**Tab.3.4:** Codierung der Populationen mit der zugehörigen Salzkonzentration, zur besseren Darstellung der Ergebnisse im Säulendiagramm. \_\_\_\_\_ **24**

**Tab.3.5:** Sequenz der eingesetzten Primer. \_\_\_\_\_ **30**

**Tab.3.6:** PCR-Komponenten die für die Amplifikation verwendet wurden. \_\_\_\_\_ **30**

**Tab.3.7:** PCR-Bedingungen der selektiven Amplifikation. \_\_\_\_\_ **30**

**Tab.3.8:** Restriktionsvolumen für die Restriktion. \_\_\_\_\_ **30**

**Tab.3.9:** Auflistung der einzelnen Komponenten der Restriktion. \_\_\_\_\_ **32**

**Tab.3.10:** Oligonukleotidsequenz der Adaptoren. \_\_\_\_\_ **33**

**Tab.3.11:** Übersicht der Bestandteile für die Ligation. \_\_\_\_\_ **33**

**Tab.3.12:** Basensequenzen der Primer für die Präamplifikation. \_\_\_\_\_ **34**

**Tab.3.13:** Komponenten für die Präamplifikation. \_\_\_\_\_ **34**

**Tab.3.14:** PCR-Bedingungen der Präamplifikation. \_\_\_\_\_ **34**

**Tab. 3.15:** Basensequenzen der Primer für die Präamplifikation. \_\_\_\_\_ **35**

**Tab.3.16:** PCR-Komponenten der selektiven +3-Amplifikation. \_\_\_\_\_ **35**

**Tab.3.17:** PCR-Bedingungen der selektiven Amplifikation. \_\_\_\_\_ **35**

**Tab.4.1:** Übersicht über die untersuchten Populationen in der Po-Ebene (Italien) im Zeitraum zwischen 1994 und 2001. Populationen mit mehr als 100 Individuen wurden geschätzt. Bei der Abkürzung n.d. wurden die Populationen für dieses Jahr nicht detektiert. \_\_\_\_\_ **38**

**Tab.4.2:** Kurzbeschreibung der Standorte. \_\_\_\_\_ **39**

**Tab.4.3:** Charakterisierung der Bodenproben einzelner Wildrübenstandorte an der italienischen Adria-Küste. a-d gibt die Parallelen an die von den Boden als Proben gezogen wurden. \_\_\_\_\_ **40**

**Tab.4.4:** Nach ca. 8-9 Wochen wurden die Pflanzen von der Erde befreit und auf Zysten des Nematoden *H. schachtii* untersucht. \_\_\_\_\_ **41**

**Tab.4.5:** Ergebnisse der PCR-RFLP zur Bestimmung von CMS. Angegeben sind die Populationen und die Jahre in denen das Samenmaterial gesammelt wurde. Als negativ sind die Proben bezeichnet die kein CMS besitzen. Als positiv wurden die Proben bezeichnet bei denen CMS nachgewiesen werden konnte. \_\_\_\_\_ **49**

**Tab.4.6:** Anzahl der ausgewerteten Banden für jede der fünf unterschiedlichen Primerkombinationen. \_\_\_\_\_ **51**

**Tab.4.7:** Überblick über die Anzahl polymorpher Banden, den Polymorphiegrad [in %] und den Shannon Index bei den untersuchten Populationen. n gibt die Anzahl der Individuen pro untersuchter Populationen an. Grau unterlegt sind die Populationen aus denen Samenmaterial aus verschiedenen Jahrgängen vorhanden war. \_\_\_\_\_ **51**

**Tab.4.8:** Genetische Distanzen innerhalb der italienischen Populationen. Grau markiert wurden jeweils die höchsten und die niedrigsten Werte im Vergleich zu den jeweiligen Populationen. \_\_\_\_\_ **53**

**Tab.4.9:** Genetische Distanzen der deutschen Populationen und Referenz Populationen zueinander. \_\_\_\_\_ **54**

## VIII Anhang

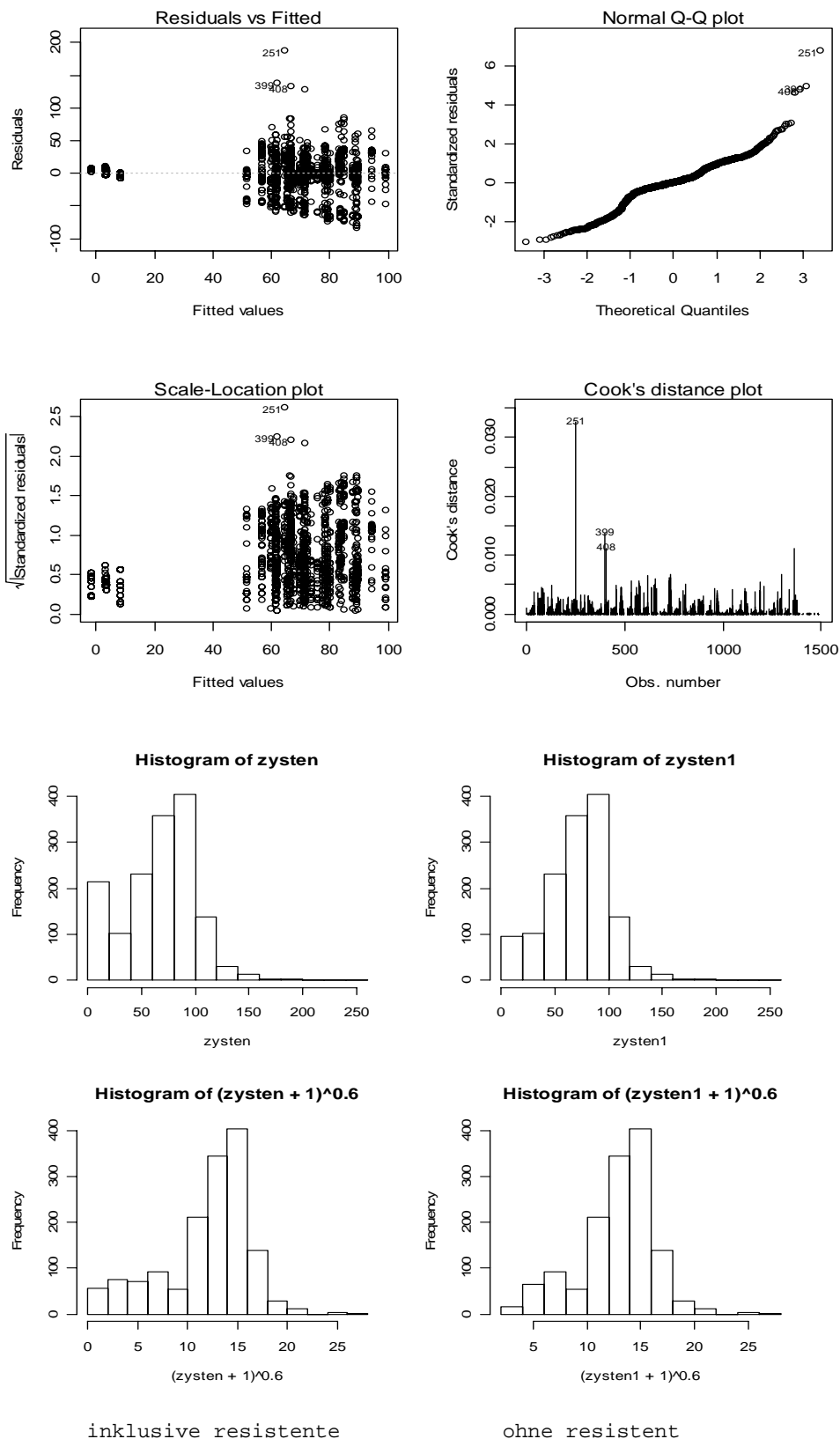
### 8.1 ANOVA (Rohdaten der statistischen Auswertung)

Daten plus Resistente

```
> ruebe<-read.table("d:/bine/arbeitsgruppe/ute/utes daten R file.txt",header=T)
> attach(ruebe)
> names(ruebe)
[1] "sorte" "pop" "konz" "plantnr" "zysten" "kammer" "popname"
[8] "region"
> fkonz<-factor(konz)
> fkammer<-factor(kammer)
> anova1<-aov(zysten~sorte+konz+kammer+region+popname)
> summary(anova1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
sorte  1     138      138   0.1792 0.6721473
konz   1    21148    21148  27.4400 1.854e-07 ***
kammer 1     8559     8559  11.1059 0.0008818 ***
region 3    634192   211397  274.2934 < 2.2e-16 ***
popname 10   30182     3018   3.9162 2.801e-05 ***
Residuals 1479 1139862     771
---
> anova2<-aov(zysten~konz+kammer+region+popname)
> summary(anova2)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
konz   1    21128    21128  27.4139 1.879e-07 ***
kammer 1     8360     8360  10.8471 0.001013 **
region 4    634550   158637  205.8361 < 2.2e-16 ***
popname 10   30182     3018   3.9162 2.801e-05 ***
Residuals 1479 1139862     771
---
> summary.lm(anova2)
Call:
aov(formula = zysten ~ konz + kammer + region + popname)
Residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-84.1678  -9.9053   0.3818  16.3047 188.2140

Coefficients: (4 not defined because of singularities)
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   71.46923    5.88671  12.141 < 2e-16 ***
konz          -9.76751    1.78146  -5.483 4.91e-08 ***
kammer        -0.06454    1.24046  -0.052 0.958510
regionItalien 27.83216    5.02800   5.535 3.67e-08 ***
regionKulturrübe 0.33262    3.93186   0.085 0.932594
regionOstsee  -1.73489    5.69546  -0.305 0.760707
regionResistente -62.91472    4.70283 -13.378 < 2e-16 ***
popnameAlC    -15.63217    4.44681  -3.515 0.000452 ***
popnameBB     -7.88722    4.97367  -1.586 0.113000
popnameBo     -9.93998    4.44819  -2.235 0.025592 *
popnameDZD    -3.05155    4.27108  -0.714 0.475050
popnameFa      0.55906    4.31411   0.130 0.896909
popnameFu    -23.18425    5.08355  -4.561 5.52e-06 ***
popnameNu    -10.94207    4.90661  -2.230 0.025893 *
popnamePe    -21.60063    4.59221  -4.704 2.79e-06 ***
popnamePW    -10.20270    4.36264  -2.339 0.019486 *
popnameTo     -9.22500    4.30286  -2.144 0.032201 *
---
Residual standard error: 27.76 on 1479 degrees of freedom
Multiple R-Squared: 0.3785, Adjusted R-squared: 0.3718
F-statistic: 56.3 on 16 and 1479 DF, p-value: < 2.2e-16

> par(mfrow=c(2,2))
> plot(anova2)
```



```
Daten ohne Resistente
> sinresist<-read.table("d:/bine/arbeitsgruppe/ute/utes daten R file sin
resist.txt",header=T)
> attach(sinresist)
> names(sinresist)
[1] "sortel"    "pop1"      "konz1"     "plantnr1"  "zysten1"   "kammer1"   "popname1"
[8] "region1" > konz1f<-factor(konz1)
```

## VIII Anhang

---

```
> kammer1f<-factor(kammer1)
> anova3<-aov(zysten1~sortel+konlf+region1+popname1+kammer1f)
> summary(anova3)
      Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
sortel  1  14288   14288  20.8085 5.534e-06 ***
konlf   2  193786   96893 141.1155 < 2.2e-16 ***
region1 2   97242   48621  70.8116 < 2.2e-16 ***
popname1 10  39257    3926   5.7174 1.910e-08 ***
kammer1f 3   22088    7363  10.7232 5.750e-07 ***
Residuals 1357 931747    687
---

> summary.lm(anova3)
aov(formula = zysten1 ~ sortel + konlf + region1 + popname1 +
      kammer1f)

Residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-89.904  -6.001   4.834  11.579  172.500

Coefficients: (4 not defined because of singularities)
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   70.0756     3.1863  21.993 < 2e-16 ***
sortelw      -9.2410     4.1456  -2.229 0.025969 *
konlf0.5     18.7380     1.7136  10.935 < 2e-16 ***
konlf1     -11.2868     1.7560  -6.428 1.79e-10 ***
region1Italien 39.3313     6.0275   6.525 9.56e-11 ***
region1Ostsee  0.9271     5.8659   0.158 0.874447
popname1ALC  -26.5709     6.0003  -4.428 1.03e-05 ***
popname1BB    11.5725     5.9152   1.956 0.050622 .
popname1Bo     1.3744     6.0121   0.229 0.819207
popname1DZD   -3.1457     4.0314  -0.780 0.435350
popname1Fa    -0.3209     4.0727  -0.079 0.937203
popname1Fu   -34.8052     6.0675  -5.736 1.19e-08 ***
popname1Nu   -21.3116     5.9366  -3.590 0.000343 ***
popname1Pe   -11.0711     6.1059  -1.813 0.070024 .
popname1PW   -8.1426     4.1198  -1.976 0.048307 *
popname1To   -9.7696     4.0619  -2.405 0.016296 *
kammer1f2    -8.2298     4.4414  -1.853 0.064104 .
kammer1f3   -19.3774     4.2935  -4.513 6.94e-06 ***
kammer1f4     2.5860     4.2248   0.612 0.540567
---
Residual standard error: 26.2 on 1357 degrees of freedom
Multiple R-Squared: 0.2824, Adjusted R-squared: 0.2729
F-statistic: 29.67 on 18 and 1357 DF, p-value: < 2.2e-16 > anova2<-
> plot(anova2)
> zy65tra<-((zysten1+1)**0.65)
> anova3<-aov(zy65tra~sortel+konzlf+region1+kammer1f+popname1)
> summary(anova3)
      Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
sortel  1   311.5    311.5  18.3697 1.948e-05 ***
konzlf  2  3917.4   1958.7 115.5135 < 2.2e-16 ***
region1 2  2101.5   1050.8  61.9682 < 2.2e-16 ***
kammer1f 3   380.2    126.7   7.4746 5.790e-05 ***
popname1 10  881.2     88.1   5.1970 1.639e-07 ***
Residuals 1357 23010.0    17.0

> summary.lm(anova3)
aov(formula = zy65tra ~ sortel + konzlf + region1 + kammer1f +
      popname1)
Residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-15.4312  -0.6365   0.9809   1.9127  19.5798

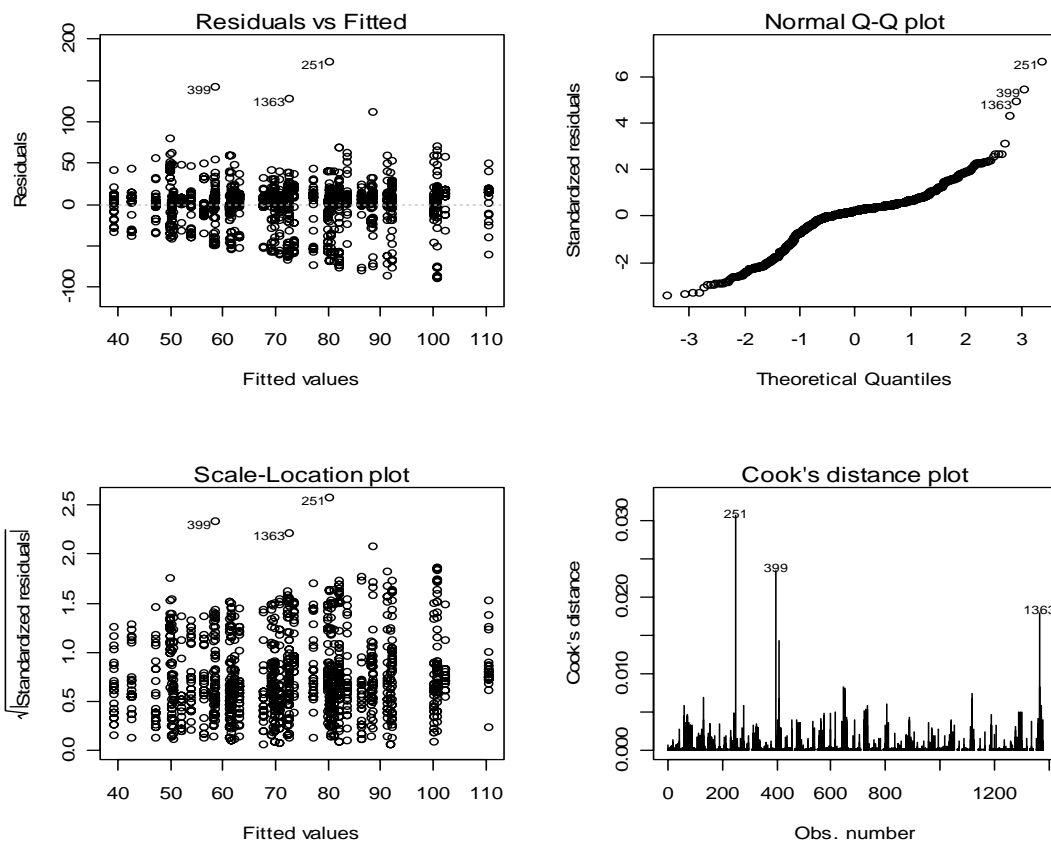
Coefficients: (4 not defined because of singularities)
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  15.62558     0.50072  31.206 < 2e-16 ***
sortelw     -1.25767     0.65147  -1.931 0.05375 .
konzlf0.5   2.60446     0.26928   9.672 < 2e-16 ***
konzlf1    -1.68047     0.27594  -6.090 1.47e-09 ***
```



|                |          |         |        |          |     |
|----------------|----------|---------|--------|----------|-----|
| region1Italien | 5.58053  | 0.94720 | 5.892  | 4.82e-09 | *** |
| region1Ostsee  | 0.01928  | 0.92182 | 0.021  | 0.98332  |     |
| kammer1f2      | -1.13936 | 0.69796 | -1.632 | 0.10283  |     |
| kammer1f3      | -2.87549 | 0.67471 | -4.262 | 2.17e-05 | *** |
| kammer1f4      | 0.40596  | 0.66391 | 0.611  | 0.54099  |     |
| popname1ALC    | -3.78875 | 0.94294 | -4.018 | 6.19e-05 | *** |
| popname1BB     | 1.67392  | 0.92956 | 1.801  | 0.07196  | .   |
| popname1Bo     | 0.31526  | 0.94478 | 0.334  | 0.73867  |     |
| popname1DZD    | -0.43582 | 0.63353 | -0.688 | 0.49161  |     |
| popname1Fa     | 0.05419  | 0.64002 | 0.085  | 0.93253  |     |
| popname1Fu     | -4.88670 | 0.95349 | -5.125 | 3.40e-07 | *** |
| popname1Nu     | -2.90085 | 0.93292 | -3.109 | 0.00191  | **  |
| popname1Pe     | -1.36106 | 0.95953 | -1.418 | 0.15629  |     |
| popname1PW     | -1.28938 | 0.64742 | -1.992 | 0.04662  | *   |
| popname1To     | -1.55054 | 0.63831 | -2.429 | 0.01526  | *   |

---  
Residual standard error: 4.118 on 1357 degrees of freedom  
Multiple R-Squared: 0.2481, Adjusted R-squared: 0.2381  
F-statistic: 24.87 on 18 and 1357 DF, p-value: < 2.2e-16

```
> plot(anova2)
```



## 8.2 Rohdaten der gezählten Nematodenzysten

| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 0   | 1  | 50  | AIC | w   | 0,5 | 19 | 103 | AIC | w   | 0,5 | 2  | 0   | AIC | w   | 1   | 20 | 130 | Fa  | w   |
| 0   | 2  | 81  | AIC | w   | 0,5 | 20 | 119 | AIC | w   | 0,5 | 3  | 0   | AIC | w   | 0   | 1  | 20  | Fa  | w   |
| 0   | 3  | 82  | AIC | w   | 0   | 1  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 4  | 0   | AIC | w   | 0   | 2  | 55  | Fa  | w   |
| 0   | 4  | 84  | AIC | w   | 0   | 2  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 5  | 0   | AIC | w   | 0   | 3  | 53  | Fa  | w   |
| 0   | 5  | 85  | AIC | w   | 0   | 3  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 6  | 0   | AIC | w   | 0   | 4  | 56  | Fa  | w   |
| 0   | 6  | 90  | AIC | w   | 0   | 4  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 7  | 0   | AIC | w   | 0   | 5  | 58  | Fa  | w   |
| 0   | 7  | 90  | AIC | w   | 0   | 5  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 8  | 0   | AIC | w   | 0   | 6  | 41  | Fa  | w   |
| 0   | 8  | 92  | AIC | w   | 0   | 6  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 9  | 0   | AIC | w   | 0   | 7  | 55  | Fa  | w   |
| 0   | 9  | 93  | AIC | w   | 0   | 7  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 10 | 0   | AIC | w   | 0   | 8  | 55  | Fa  | w   |
| 0   | 10 | 94  | AIC | w   | 0   | 8  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 11 | 0   | AIC | w   | 0   | 9  | 56  | Fa  | w   |
| 0   | 11 | 94  | AIC | w   | 0   | 9  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 12 | 15  | AIC | w   | 0   | 10 | 56  | Fa  | w   |
| 0   | 12 | 94  | AIC | w   | 0   | 10 | 0   | AIC | w   | 0,5 | 13 | 24  | AIC | w   | 0   | 11 | 56  | Fa  | w   |
| 0   | 13 | 95  | AIC | w   | 0   | 11 | 14  | AIC | w   | 0,5 | 14 | 32  | AIC | w   | 0   | 12 | 57  | Fa  | w   |
| 0   | 14 | 95  | AIC | w   | 0   | 12 | 16  | AIC | w   | 0,5 | 15 | 87  | AIC | w   | 0   | 13 | 58  | Fa  | w   |
| 0   | 15 | 95  | AIC | w   | 0   | 13 | 17  | AIC | w   | 0,5 | 16 | 89  | AIC | w   | 0   | 14 | 59  | Fa  | w   |
| 0   | 16 | 95  | AIC | w   | 0   | 14 | 23  | AIC | w   | 0,5 | 17 | 92  | AIC | w   | 0   | 15 | 59  | Fa  | w   |
| 0   | 17 | 96  | AIC | w   | 0   | 15 | 30  | AIC | w   | 0,5 | 18 | 73  | AIC | w   | 0   | 16 | 60  | Fa  | w   |
| 0   | 18 | 96  | AIC | w   | 0   | 16 | 50  | AIC | w   | 0,5 | 19 | 76  | AIC | w   | 0   | 17 | 60  | Fa  | w   |
| 0   | 19 | 97  | AIC | w   | 0   | 17 | 28  | AIC | w   | 0,5 | 20 | 80  | AIC | w   | 0   | 18 | 71  | Fa  | w   |
| 0   | 20 | 110 | AIC | w   | 0   | 18 | 26  | AIC | w   | 0,5 | 1  | 0   | AIC | w   | 0   | 19 | 72  | Fa  | w   |
| 0,5 | 1  | 60  | AIC | w   | 0   | 19 | 22  | AIC | w   | 0,5 | 2  | 0   | AIC | w   | 0   | 20 | 100 | Fa  | w   |
| 0,5 | 2  | 90  | AIC | w   | 0   | 20 | 70  | AIC | w   | 0,5 | 3  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 1  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 3  | 91  | AIC | w   | 0,5 | 1  | 25  | Fa  | w   | 0,5 | 4  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 2  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 4  | 94  | AIC | w   | 0,5 | 2  | 65  | Fa  | w   | 0,5 | 5  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 3  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 5  | 96  | AIC | w   | 0,5 | 3  | 64  | Fa  | w   | 0,5 | 6  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 4  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 6  | 99  | AIC | w   | 0,5 | 4  | 68  | Fa  | w   | 0,5 | 7  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 5  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 7  | 110 | AIC | w   | 0,5 | 5  | 69  | Fa  | w   | 0,5 | 8  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 6  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 8  | 113 | AIC | w   | 0,5 | 6  | 63  | Fa  | w   | 0,5 | 9  | 0   | AIC | w   | 0,5 | 7  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 9  | 114 | AIC | w   | 0,5 | 7  | 65  | Fa  | w   | 0,5 | 10 | 0   | AIC | w   | 0,5 | 8  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 10 | 115 | AIC | w   | 0,5 | 8  | 65  | Fa  | w   | 0,5 | 11 | 23  | AIC | w   | 0,5 | 9  | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 11 | 116 | AIC | w   | 0,5 | 9  | 66  | Fa  | w   | 0,5 | 12 | 24  | AIC | w   | 0,5 | 10 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 12 | 118 | AIC | w   | 0,5 | 10 | 67  | Fa  | w   | 0,5 | 13 | 25  | AIC | w   | 0,5 | 11 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 13 | 118 | AIC | w   | 0,5 | 11 | 68  | Fa  | w   | 0,5 | 14 | 44  | AIC | w   | 0,5 | 12 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 14 | 119 | AIC | w   | 0,5 | 12 | 68  | Fa  | w   | 0,5 | 15 | 87  | AIC | w   | 0,5 | 13 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 15 | 119 | AIC | w   | 0,5 | 13 | 69  | Fa  | w   | 0,5 | 16 | 90  | AIC | w   | 0,5 | 14 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 16 | 119 | AIC | w   | 0,5 | 14 | 69  | Fa  | w   | 0,5 | 17 | 95  | AIC | w   | 0,5 | 15 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 17 | 120 | AIC | w   | 0,5 | 15 | 70  | Fa  | w   | 0,5 | 18 | 96  | AIC | w   | 0,5 | 16 | 0   | Fa  | w   |
| 0,5 | 19 | 120 | AIC | w   | 0,5 | 17 | 82  | Fa  | w   | 0,5 | 17 | 0   | Fa  | w   | 1   | 15 | 60  | FSF | w   |
| 0,5 | 20 | 145 | AIC | w   | 0,5 | 18 | 83  | Fa  | w   | 0,5 | 18 | 0   | Fa  | w   | 1   | 16 | 50  | FSF | w   |
| 1   | 1  | 30  | AIC | w   | 0,5 | 19 | 84  | Fa  | w   | 0,5 | 19 | 35  | Fa  | w   | 1   | 17 | 51  | FSF | w   |
| 1   | 2  | 61  | AIC | w   | 0,5 | 20 | 120 | Fa  | w   | 0,5 | 20 | 60  | Fa  | w   | 1   | 18 | 51  | FSF | w   |
| 1   | 3  | 62  | AIC | w   | 1   | 1  | 40  | Fa  | w   | 0,5 | 1  | 0   | Fa  | w   | 1   | 19 | 51  | FSF | w   |
| 1   | 4  | 70  | AIC | w   | 1   | 2  | 90  | Fa  | w   | 0,5 | 2  | 0   | Fa  | w   | 1   | 20 | 100 | FSF | w   |
| 1   | 5  | 71  | AIC | w   | 1   | 3  | 90  | Fa  | w   | 0,5 | 3  | 0   | Fa  | w   | 0   | 1  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 6  | 72  | AIC | w   | 1   | 4  | 91  | Fa  | w   | 0,5 | 4  | 0   | Fa  | w   | 0   | 2  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 7  | 72  | AIC | w   | 1   | 5  | 95  | Fa  | w   | 0,5 | 5  | 0   | Fa  | w   | 0   | 3  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 8  | 73  | AIC | w   | 1   | 6  | 89  | Fa  | w   | 0,5 | 6  | 0   | Fa  | w   | 0   | 4  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 9  | 73  | AIC | w   | 1   | 7  | 91  | Fa  | w   | 0,5 | 7  | 0   | Fa  | w   | 0   | 5  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 10 | 74  | AIC | w   | 1   | 8  | 91  | Fa  | w   | 0,5 | 8  | 0   | Fa  | w   | 0   | 6  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 11 | 75  | AIC | w   | 1   | 9  | 81  | Fa  | w   | 0,5 | 9  | 0   | Fa  | w   | 0   | 7  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 12 | 76  | AIC | w   | 1   | 10 | 82  | Fa  | w   | 0,5 | 10 | 0   | Fa  | w   | 0   | 8  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 13 | 76  | AIC | w   | 1   | 11 | 92  | Fa  | w   | 0,5 | 11 | 23  | Fa  | w   | 0   | 9  | 0   | FSF | w   |
| 1   | 14 | 78  | AIC | w   | 1   | 12 | 92  | Fa  | w   | 0,5 | 12 | 23  | Fa  | w   | 0   | 10 | 21  | FSF | w   |
| 1   | 15 | 79  | AIC | w   | 1   | 13 | 95  | Fa  | w   | 0,5 | 13 | 28  | Fa  | w   | 0   | 11 | 21  | FSF | w   |
| 1   | 16 | 79  | AIC | w   | 1   | 14 | 96  | Fa  | w   | 0,5 | 14 | 33  | Fa  | w   | 0   | 12 | 27  | FSF | w   |
| 1   | 17 | 80  | AIC | w   | 1   | 15 | 96  | Fa  | w   | 0,5 | 15 | 42  | Fa  | w   | 0   | 13 | 28  | FSF | w   |
| 1   | 18 | 84  | AIC | w   | 1   | 16 | 96  | Fa  | w   | 0,5 | 16 | 50  | Fa  | w   | 0   | 14 | 28  | FSF | w   |
| 1   | 19 | 86  | AIC | w   | 1   | 17 | 97  | Fa  | w   | 0,5 | 17 | 67  | Fa  | w   | 0   | 15 | 60  | FSF | w   |
| 1   | 20 | 110 | AIC | w   | 1   | 18 | 100 | Fa  | w   | 0,5 | 18 | 70  | Fa  | w   | 0   | 16 | 70  | FSF | w   |

|     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 0,5 | 1  | 0   | AIC | w   | 1   | 19 | 110 | Fa  | w   | 0,5 | 19 | 71  | Fa  | w   | 0   | 17 | 74  | FSF | w   |
| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 1   | 1  | 0   | Fa  | w   | 0   | 19 | 76  | FSF | w   | 0,5 | 20 | 120 | Fa  | w   | 0   | 18 | 74  | FSF | w   |
| 1   | 2  | 0   | Fa  | w   | 0   | 20 | 79  | FSF | w   | 1   | 3  | 35  | FSF | w   | 0,5 | 1  | 3   | DZD | w   |
| 1   | 3  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 1  | 0   | FSF | w   | 1   | 4  | 77  | FSF | w   | 0,5 | 2  | 45  | DZD | w   |
| 1   | 4  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 2  | 0   | FSF | w   | 1   | 5  | 49  | FSF | w   | 0,5 | 3  | 77  | DZD | w   |
| 1   | 5  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 3  | 0   | FSF | w   | 1   | 6  | 31  | FSF | w   | 0,5 | 4  | 81  | DZD | w   |
| 1   | 6  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 4  | 0   | FSF | w   | 1   | 7  | 45  | FSF | w   | 0,5 | 5  | 84  | DZD | w   |
| 1   | 7  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 5  | 0   | FSF | w   | 1   | 8  | 45  | FSF | w   | 0,5 | 6  | 85  | DZD | w   |
| 1   | 8  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 6  | 0   | FSF | w   | 1   | 9  | 46  | FSF | w   | 0,5 | 7  | 85  | DZD | w   |
| 1   | 9  | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 7  | 0   | FSF | w   | 1   | 10 | 46  | FSF | w   | 0,5 | 8  | 85  | DZD | w   |
| 1   | 10 | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 8  | 0   | FSF | w   | 1   | 11 | 48  | FSF | w   | 0,5 | 9  | 86  | DZD | w   |
| 1   | 11 | 0   | Fa  | w   | 0,5 | 9  | 0   | FSF | w   | 1   | 12 | 48  | FSF | w   | 0,5 | 10 | 86  | DZD | w   |
| 1   | 12 | 10  | Fa  | w   | 0,5 | 10 | 0   | FSF | w   | 1   | 13 | 49  | FSF | w   | 0,5 | 11 | 86  | DZD | w   |
| 1   | 13 | 20  | Fa  | w   | 0,5 | 11 | 12  | FSF | w   | 1   | 14 | 49  | FSF | w   | 0,5 | 12 | 89  | DZD | w   |
| 1   | 15 | 23  | Fa  | w   | 0,5 | 13 | 13  | FSF | w   | 0,5 | 13 | 90  | DZD | w   | 0   | 11 | 78  | Le  | k   |
| 1   | 16 | 25  | Fa  | w   | 0,5 | 14 | 86  | FSF | w   | 0,5 | 14 | 91  | DZD | w   | 0   | 12 | 78  | Le  | k   |
| 1   | 17 | 15  | Fa  | w   | 0,5 | 15 | 87  | FSF | w   | 0,5 | 15 | 91  | DZD | w   | 0   | 13 | 65  | Le  | k   |
| 1   | 18 | 15  | Fa  | w   | 0,5 | 16 | 88  | FSF | w   | 0,5 | 16 | 94  | DZD | w   | 0   | 14 | 80  | Le  | k   |
| 1   | 19 | 25  | Fa  | w   | 0,5 | 17 | 90  | FSF | w   | 0,5 | 17 | 94  | DZD | w   | 0   | 15 | 80  | Le  | k   |
| 1   | 20 | 70  | Fa  | w   | 0,5 | 18 | 98  | FSF | w   | 0,5 | 18 | 105 | DZD | w   | 0   | 16 | 81  | Le  | k   |
| 0   | 1  | 20  | FSF | w   | 0,5 | 19 | 98  | FSF | w   | 0,5 | 19 | 107 | DZD | w   | 0   | 17 | 81  | Le  | k   |
| 0   | 2  | 61  | FSF | w   | 0,5 | 20 | 253 | FSF | w   | 0,5 | 20 | 120 | DZD | w   | 0   | 18 | 91  | Le  | k   |
| 0   | 3  | 60  | FSF | w   | 0,5 | 1  | 0   | FSF | w   | 1   | 1  | 30  | DZD | w   | 0   | 19 | 90  | Le  | k   |
| 0   | 4  | 64  | FSF | w   | 1   | 2  | 0   | FSF | w   | 1   | 2  | 43  | DZD | w   | 0   | 20 | 100 | Le  | k   |
| 0   | 5  | 66  | FSF | w   | 1   | 3  | 0   | FSF | w   | 1   | 3  | 44  | DZD | w   | 0,5 | 1  | 60  | Le  | k   |
| 0   | 6  | 50  | FSF | w   | 1   | 4  | 0   | FSF | w   | 1   | 4  | 45  | DZD | w   | 0,5 | 2  | 91  | Le  | k   |
| 0   | 7  | 62  | FSF | w   | 1   | 5  | 0   | FSF | w   | 1   | 5  | 45  | DZD | w   | 0,5 | 3  | 70  | Le  | k   |
| 0   | 8  | 62  | FSF | w   | 1   | 6  | 0   | FSF | w   | 1   | 6  | 46  | DZD | w   | 0,5 | 4  | 98  | Le  | k   |
| 0   | 9  | 62  | FSF | w   | 1   | 7  | 0   | FSF | w   | 1   | 7  | 46  | DZD | w   | 0,5 | 5  | 100 | Le  | k   |
| 0   | 10 | 63  | FSF | w   | 1   | 8  | 0   | FSF | w   | 1   | 8  | 47  | DZD | w   | 0,5 | 6  | 65  | Le  | k   |
| 0   | 11 | 64  | FSF | w   | 1   | 9  | 0   | FSF | w   | 1   | 9  | 49  | DZD | w   | 0,5 | 7  | 85  | Le  | k   |
| 0   | 12 | 65  | FSF | w   | 1   | 10 | 0   | FSF | w   | 1   | 10 | 50  | DZD | w   | 0,5 | 8  | 95  | Le  | k   |
| 0   | 13 | 66  | FSF | w   | 1   | 11 | 0   | FSF | w   | 1   | 11 | 51  | DZD | w   | 0,5 | 9  | 96  | Le  | k   |
| 0   | 14 | 67  | FSF | w   | 1   | 12 | 0   | FSF | w   | 1   | 12 | 51  | DZD | w   | 0,5 | 10 | 96  | Le  | k   |
| 0   | 15 | 69  | FSF | w   | 1   | 13 | 0   | FSF | w   | 1   | 13 | 51  | DZD | w   | 0,5 | 11 | 99  | Le  | k   |
| 0   | 16 | 70  | FSF | w   | 1   | 14 | 0   | FSF | w   | 1   | 14 | 51  | DZD | w   | 0,5 | 12 | 90  | Le  | k   |
| 0   | 17 | 72  | FSF | w   | 1   | 15 | 0   | FSF | w   | 1   | 15 | 55  | DZD | w   | 0,5 | 13 | 100 | Le  | k   |
| 0   | 18 | 82  | FSF | w   | 1   | 16 | 0   | FSF | w   | 1   | 16 | 56  | DZD | w   | 0,5 | 14 | 101 | Le  | k   |
| 0   | 19 | 84  | FSF | w   | 1   | 17 | 30  | FSF | w   | 1   | 17 | 60  | DZD | w   | 0,5 | 15 | 101 | Le  | k   |
| 0   | 20 | 120 | FSF | w   | 1   | 18 | 35  | FSF | w   | 1   | 18 | 77  | DZD | w   | 0,5 | 16 | 102 | Le  | k   |
| 0,5 | 1  | 60  | FSF | w   | 1   | 19 | 24  | FSF | w   | 1   | 19 | 78  | DZD | w   | 0,5 | 17 | 104 | Le  | k   |
| 0,5 | 2  | 85  | FSF | w   | 1   | 20 | 12  | FSF | w   | 1   | 20 | 102 | DZD | w   | 0,5 | 18 | 104 | Le  | k   |
| 0,5 | 3  | 83  | FSF | w   | 0   | 1  | 42  | DZD | w   | 0   | 1  | 0   | DZD | w   | 0,5 | 19 | 120 | Le  | k   |
| 0,5 | 4  | 88  | FSF | w   | 0   | 2  | 63  | DZD | w   | 0   | 2  | 0   | DZD | w   | 0,5 | 20 | 110 | Le  | k   |
| 0,5 | 5  | 90  | FSF | w   | 0   | 3  | 62  | DZD | w   | 0   | 3  | 0   | DZD | w   | 1   | 1  | 35  | Le  | k   |
| 0,5 | 6  | 71  | FSF | w   | 0   | 4  | 67  | DZD | w   | 0   | 4  | 0   | DZD | w   | 1   | 2  | 62  | Le  | k   |
| 0,5 | 7  | 85  | FSF | w   | 0   | 5  | 71  | DZD | w   | 0   | 5  | 0   | DZD | w   | 1   | 3  | 62  | Le  | k   |
| 0,5 | 8  | 86  | FSF | w   | 0   | 6  | 42  | DZD | w   | 0   | 6  | 0   | DZD | w   | 1   | 4  | 65  | Le  | k   |
| 0,5 | 9  | 86  | FSF | w   | 0   | 7  | 65  | DZD | w   | 0   | 7  | 0   | DZD | w   | 1   | 5  | 76  | Le  | k   |
| 0,5 | 10 | 77  | FSF | w   | 0   | 8  | 65  | DZD | w   | 0   | 8  | 0   | DZD | w   | 1   | 6  | 61  | Le  | k   |
| 0,5 | 11 | 79  | FSF | w   | 0   | 9  | 96  | DZD | w   | 0   | 9  | 0   | DZD | w   | 1   | 7  | 53  | Le  | k   |
| 0,5 | 12 | 79  | FSF | w   | 0   | 10 | 66  | DZD | w   | 0   | 10 | 0   | DZD | w   | 1   | 8  | 64  | Le  | k   |
| 0,5 | 13 | 85  | FSF | w   | 0   | 11 | 69  | DZD | w   | 0   | 11 | 12  | DZD | w   | 1   | 9  | 65  | Le  | k   |
| 0,5 | 14 | 90  | FSF | w   | 0   | 12 | 69  | DZD | w   | 0   | 12 | 12  | DZD | w   | 1   | 10 | 65  | Le  | k   |
| 0,5 | 15 | 91  | FSF | w   | 0   | 13 | 69  | DZD | w   | 0   | 13 | 13  | DZD | w   | 1   | 11 | 66  | Le  | k   |
| 0,5 | 16 | 91  | FSF | w   | 0   | 14 | 72  | DZD | w   | 0   | 14 | 18  | DZD | w   | 1   | 12 | 66  | Le  | k   |
| 0,5 | 17 | 95  | FSF | w   | 0   | 15 | 72  | DZD | w   | 0   | 15 | 24  | DZD | w   | 1   | 13 | 67  | Le  | k   |
| 0,5 | 18 | 100 | FSF | w   | 0   | 16 | 73  | DZD | w   | 0   | 16 | 65  | DZD | w   | 1   | 14 | 69  | Le  | k   |
| 0,5 | 19 | 106 | FSF | w   | 0   | 17 | 73  | DZD | w   | 0   | 17 | 67  | DZD | w   | 1   | 15 | 69  | Le  | k   |
| 0,5 | 20 | 120 | FSF | w   | 0   | 18 | 83  | DZD | w   | 0   | 18 | 69  | DZD | w   | 1   | 16 | 70  | Le  | k   |
| 1   | 1  | 8   | FSF | w   | 0   | 19 | 85  | DZD | w   | 0   | 19 | 70  | DZD | w   | 1   | 17 | 70  | Le  | k   |

## VIII Anhang

|     |    |    |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |
|-----|----|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 1   | 2  | 30 | FSF | w   | 0   | 20 | 112 | DZD | w   | 0   | 20 | 70  | DZD | w   | 1   | 18 | 81  | Le  | k   |
| Kon | N  | Zy | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 0,5 | 2  | 0  | DZD | w   | 1   | 20 | 200 | Le  | k   | 0,5 | 1  | 0   | DZD | w   | 1   | 19 | 91  | Le  | k   |
| 0,5 | 3  | 0  | DZD | w   | 0   | 1  | 0   | Le  | k   | 0   | 1  | 52  | AC  | w   | 1   | 19 | 86  | AC  | w   |
| 0,5 | 4  | 0  | DZD | w   | 0   | 2  | 0   | Le  | k   | 0   | 2  | 73  | AC  | w   | 1   | 20 | 99  | AC  | w   |
| 0,5 | 5  | 0  | DZD | w   | 0   | 3  | 0   | Le  | k   | 0   | 3  | 82  | AC  | w   | 0   | 1  | 60  | PW  | w   |
| 0,5 | 6  | 0  | DZD | w   | 0   | 4  | 0   | Le  | k   | 0   | 4  | 92  | AC  | w   | 0   | 2  | 70  | PW  | w   |
| 0,5 | 7  | 0  | DZD | w   | 0   | 5  | 0   | Le  | k   | 0   | 5  | 92  | AC  | w   | 0   | 3  | 73  | PW  | w   |
| 0,5 | 8  | 0  | DZD | w   | 0   | 6  | 0   | Le  | k   | 0   | 6  | 94  | AC  | w   | 0   | 4  | 84  | PW  | w   |
| 0,5 | 9  | 0  | DZD | w   | 0   | 7  | 0   | Le  | k   | 0   | 7  | 96  | AC  | w   | 0   | 5  | 85  | PW  | w   |
| 0,5 | 10 | 0  | DZD | w   | 0   | 8  | 0   | Le  | k   | 0   | 8  | 98  | AC  | w   | 0   | 6  | 87  | PW  | w   |
| 0,5 | 11 | 20 | DZD | w   | 0   | 9  | 0   | Le  | k   | 0   | 9  | 99  | AC  | w   | 0   | 7  | 87  | PW  | w   |
| 0,5 | 12 | 23 | DZD | w   | 0   | 10 | 0   | Le  | k   | 0   | 10 | 99  | AC  | w   | 0   | 8  | 88  | PW  | w   |
| 0,5 | 13 | 23 | DZD | w   | 0   | 11 | 0   | Le  | k   | 0   | 11 | 100 | AC  | w   | 0   | 9  | 89  | PW  | w   |
| 0,5 | 14 | 24 | DZD | w   | 0   | 12 | 0   | Le  | k   | 0   | 12 | 100 | AC  | w   | 0   | 10 | 90  | PW  | w   |
| 0,5 | 15 | 25 | DZD | w   | 0   | 13 | 0   | Le  | k   | 0   | 13 | 102 | AC  | w   | 0   | 11 | 91  | PW  | w   |
| 0,5 | 16 | 60 | DZD | w   | 0   | 14 | 0   | Le  | k   | 0   | 14 | 105 | AC  | w   | 0   | 12 | 92  | PW  | w   |
| 0,5 | 17 | 87 | DZD | w   | 0   | 15 | 0   | Le  | k   | 0   | 15 | 105 | AC  | w   | 0   | 13 | 93  | PW  | w   |
| 0,5 | 18 | 88 | DZD | w   | 0   | 16 | 60  | Le  | k   | 0   | 16 | 105 | AC  | w   | 0   | 14 | 93  | PW  | w   |
| 0,5 | 19 | 89 | DZD | w   | 0   | 17 | 50  | Le  | k   | 0   | 17 | 105 | AC  | w   | 0   | 15 | 93  | PW  | w   |
| 0,5 | 20 | 97 | DZD | w   | 0   | 18 | 23  | Le  | k   | 0   | 18 | 107 | AC  | w   | 0   | 16 | 94  | PW  | w   |
| 1   | 1  | 0  | DZD | w   | 0   | 19 | 12  | Le  | k   | 0   | 19 | 108 | AC  | w   | 0   | 17 | 94  | PW  | w   |
| 1   | 2  | 0  | DZD | w   | 0   | 20 | 30  | Le  | k   | 0   | 20 | 130 | AC  | w   | 0   | 18 | 95  | PW  | w   |
| 1   | 3  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 1  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 1  | 70  | AC  | w   | 0   | 19 | 96  | PW  | w   |
| 1   | 4  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 2  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 2  | 85  | AC  | w   | 0   | 20 | 120 | PW  | w   |
| 1   | 5  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 3  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 3  | 97  | AC  | w   | 0,5 | 1  | 70  | PW  | w   |
| 1   | 6  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 4  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 4  | 99  | AC  | w   | 0,5 | 2  | 89  | PW  | w   |
| 1   | 7  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 5  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 5  | 124 | AC  | w   | 0,5 | 3  | 90  | PW  | w   |
| 1   | 8  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 6  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 6  | 124 | AC  | w   | 0,5 | 4  | 95  | PW  | w   |
| 1   | 9  | 0  | DZD | w   | 0,5 | 7  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 7  | 124 | AC  | w   | 0,5 | 5  | 112 | PW  | w   |
| 1   | 10 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 8  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 8  | 125 | AC  | w   | 0,5 | 6  | 112 | PW  | w   |
| 1   | 11 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 9  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 9  | 125 | AC  | w   | 0,5 | 7  | 112 | PW  | w   |
| 1   | 12 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 10 | 0   | Le  | k   | 0,5 | 10 | 125 | AC  | w   | 0,5 | 8  | 114 | PW  | w   |
| 1   | 13 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 11 | 0   | Le  | k   | 0,5 | 11 | 125 | AC  | w   | 0,5 | 9  | 115 | PW  | w   |
| 1   | 14 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 12 | 0   | Le  | k   | 0,5 | 12 | 126 | AC  | w   | 0,5 | 10 | 115 | PW  | w   |
| 1   | 15 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 13 | 0   | Le  | k   | 0,5 | 13 | 126 | AC  | w   | 0,5 | 11 | 115 | PW  | w   |
| 1   | 16 | 0  | DZD | w   | 0,5 | 14 | 70  | Le  | k   | 0,5 | 14 | 127 | AC  | w   | 0,5 | 12 | 117 | PW  | w   |
| 1   | 17 | 12 | DZD | w   | 0,5 | 15 | 73  | Le  | k   | 0,5 | 15 | 127 | AC  | w   | 0,5 | 13 | 117 | PW  | w   |
| 1   | 18 | 14 | DZD | w   | 0,5 | 16 | 24  | Le  | k   | 0,5 | 16 | 127 | AC  | w   | 0,5 | 14 | 119 | PW  | w   |
| 1   | 19 | 26 | DZD | w   | 0,5 | 17 | 200 | Le  | k   | 0,5 | 17 | 128 | AC  | w   | 0,5 | 15 | 120 | PW  | w   |
| 1   | 20 | 30 | DZD | w   | 0,5 | 18 | 50  | Le  | k   | 0,5 | 18 | 128 | AC  | w   | 0,5 | 16 | 120 | PW  | w   |
| 0   | 1  | 43 | Le  | k   | 0,5 | 19 | 13  | Le  | k   | 0,5 | 19 | 129 | AC  | w   | 0,5 | 17 | 120 | PW  | w   |
| 0   | 2  | 74 | Le  | k   | 0,5 | 20 | 17  | Le  | k   | 0,5 | 20 | 160 | AC  | w   | 0,5 | 18 | 120 | PW  | w   |
| 0   | 3  | 54 | Le  | k   | 1   | 1  | 0   | Le  | k   | 1   | 1  | 20  | AC  | w   | 0,5 | 19 | 120 | PW  | w   |
| 0   | 4  | 77 | Le  | k   | 1   | 2  | 0   | Le  | k   | 1   | 2  | 70  | AC  | w   | 0,5 | 20 | 160 | PW  | w   |
| 0   | 5  | 79 | Le  | k   | 1   | 3  | 0   | Le  | k   | 1   | 3  | 75  | AC  | w   | 1   | 1  | 20  | PW  | w   |
| 0   | 6  | 53 | Le  | k   | 1   | 4  | 0   | Le  | k   | 1   | 4  | 79  | AC  | w   | 1   | 2  | 51  | PW  | w   |
| 0   | 7  | 75 | Le  | k   | 1   | 5  | 0   | Le  | k   | 1   | 5  | 80  | AC  | w   | 1   | 3  | 61  | PW  | w   |
| 0   | 8  | 75 | Le  | k   | 1   | 6  | 0   | Le  | k   | 1   | 6  | 82  | AC  | w   | 1   | 4  | 65  | PW  | w   |
| 0   | 9  | 75 | Le  | k   | 1   | 7  | 0   | Le  | k   | 1   | 7  | 82  | AC  | w   | 1   | 5  | 71  | PW  | w   |
| 0   | 10 | 76 | Le  | k   | 1   | 8  | 0   | Le  | k   | 1   | 8  | 83  | AC  | w   | 1   | 6  | 72  | PW  | w   |
| 1   | 9  | 0  | Le  | k   | 1   | 7  | 23  | AC  | w   | 1   | 10 | 84  | AC  | w   | 1   | 8  | 73  | PW  | w   |
| 1   | 10 | 0  | Le  | k   | 1   | 8  | 23  | AC  | w   | 1   | 11 | 85  | AC  | w   | 1   | 9  | 74  | PW  | w   |
| 1   | 11 | 0  | Le  | k   | 1   | 9  | 23  | AC  | w   | 1   | 12 | 85  | AC  | w   | 1   | 10 | 74  | PW  | w   |
| 1   | 12 | 0  | Le  | k   | 1   | 10 | 34  | AC  | w   | 1   | 13 | 86  | AC  | w   | 1   | 11 | 75  | PW  | w   |
| 1   | 13 | 0  | Le  | k   | 1   | 11 | 42  | AC  | w   | 1   | 14 | 86  | AC  | w   | 1   | 12 | 75  | PW  | w   |
| 1   | 14 | 0  | Le  | k   | 1   | 12 | 44  | AC  | w   | 1   | 15 | 87  | AC  | w   | 1   | 13 | 78  | PW  | w   |
| 1   | 15 | 0  | Le  | k   | 1   | 13 | 45  | AC  | w   | 1   | 16 | 87  | AC  | w   | 1   | 14 | 78  | PW  | w   |
| 1   | 16 | 0  | Le  | k   | 1   | 14 | 75  | AC  | w   | 1   | 17 | 88  | AC  | w   | 1   | 15 | 79  | PW  | w   |
| 1   | 17 | 0  | Le  | k   | 1   | 15 | 82  | AC  | w   | 1   | 18 | 89  | AC  | w   | 1   | 16 | 80  | PW  | w   |
| 1   | 18 | 12 | Le  | k   | 1   | 16 | 82  | AC  | w   | 1   | 19 | 90  | AC  | w   | 1   | 17 | 80  | PW  | w   |
| 1   | 19 | 10 | Le  | k   | 1   | 17 | 83  | AC  | w   | 1   | 20 | 100 | AC  | w   | 1   | 18 | 81  | PW  | w   |

|     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 1   | 20 | 9   | Le  | k   | 1   | 18 | 84  | AC  | w   | 0,5 | 1  | 0   | AC  | w   | 1   | 19 | 81  | PW  | w   |
| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 0,5 | 3  | 0   | AC  | w   | 0   | 1  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 2  | 0   | AC  | w   | 1   | 20 | 110 | PW  | w   |
| 0,5 | 4  | 0   | AC  | w   | 0   | 2  | 0   | PW  | w   | 0   | 2  | 75  | To  | w   | 0,5 | 20 | 166 | To  | w   |
| 0,5 | 5  | 0   | AC  | w   | 0   | 3  | 0   | PW  | w   | 0   | 3  | 78  | To  | w   | 1   | 1  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 6  | 0   | AC  | w   | 0   | 4  | 0   | PW  | w   | 0   | 4  | 90  | To  | w   | 1   | 2  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 7  | 0   | AC  | w   | 0   | 5  | 0   | PW  | w   | 0   | 5  | 95  | To  | w   | 1   | 3  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 8  | 0   | AC  | w   | 0   | 6  | 0   | PW  | w   | 0   | 6  | 95  | To  | w   | 1   | 4  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 9  | 0   | AC  | w   | 0   | 7  | 0   | PW  | w   | 0   | 7  | 95  | To  | w   | 1   | 5  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 10 | 0   | AC  | w   | 0   | 8  | 0   | PW  | w   | 0   | 8  | 95  | To  | w   | 1   | 6  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 11 | 0   | AC  | w   | 0   | 9  | 0   | PW  | w   | 0   | 9  | 96  | To  | w   | 1   | 7  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 12 | 0   | AC  | w   | 0   | 10 | 0   | PW  | w   | 0   | 10 | 97  | To  | w   | 1   | 8  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 13 | 0   | AC  | w   | 0   | 11 | 0   | PW  | w   | 0   | 11 | 97  | To  | w   | 1   | 9  | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 14 | 50  | AC  | w   | 0   | 12 | 0   | PW  | w   | 0   | 12 | 97  | To  | w   | 1   | 10 | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 15 | 90  | AC  | w   | 0   | 13 | 0   | PW  | w   | 0   | 13 | 98  | To  | w   | 1   | 11 | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 16 | 112 | AC  | w   | 0   | 14 | 0   | PW  | w   | 0   | 14 | 98  | To  | w   | 1   | 12 | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 17 | 120 | AC  | w   | 0   | 15 | 35  | PW  | w   | 0   | 15 | 99  | To  | w   | 1   | 13 | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 18 | 125 | AC  | w   | 0   | 16 | 100 | PW  | w   | 0   | 16 | 100 | To  | w   | 1   | 14 | 0   | To  | w   |
| 0,5 | 19 | 130 | AC  | w   | 0   | 17 | 125 | PW  | w   | 0   | 17 | 102 | To  | w   | 1   | 15 | 10  | To  | w   |
| 0,5 | 20 | 150 | AC  | w   | 0   | 18 | 135 | PW  | w   | 0   | 18 | 102 | To  | w   | 1   | 16 | 12  | To  | w   |
| 1   | 1  | 0   | AC  | w   | 0   | 19 | 140 | PW  | w   | 0   | 19 | 103 | To  | w   | 1   | 17 | 14  | To  | w   |
| 1   | 2  | 0   | AC  | w   | 0   | 20 | 145 | PW  | w   | 0   | 20 | 150 | To  | w   | 1   | 18 | 71  | To  | w   |
| 1   | 3  | 0   | AC  | w   | 1   | 1  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 1  | 50  | To  | w   | 1   | 19 | 72  | To  | w   |
| 1   | 4  | 0   | AC  | w   | 1   | 2  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 2  | 80  | To  | w   | 1   | 20 | 88  | To  | w   |
| 1   | 5  | 0   | AC  | w   | 1   | 3  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 3  | 85  | To  | k   | 0   | 1  | 45  | Le  | k   |
| 1   | 6  | 0   | AC  | w   | 1   | 4  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 4  | 90  | To  | k   | 0   | 2  | 54  | Le  | k   |
| 1   | 5  | 0   | PW  | w   | 0   | 3  | 0   | To  | w   | 0,5 | 6  | 100 | To  | k   | 0   | 4  | 57  | Le  | k   |
| 1   | 6  | 0   | PW  | w   | 0   | 4  | 0   | To  | w   | 0,5 | 7  | 110 | To  | k   | 0   | 5  | 64  | Le  | k   |
| 1   | 7  | 0   | PW  | w   | 0   | 5  | 0   | To  | w   | 0,5 | 8  | 112 | To  | k   | 0   | 6  | 64  | Le  | k   |
| 1   | 8  | 0   | PW  | w   | 0   | 6  | 0   | To  | w   | 0,5 | 9  | 118 | To  | k   | 0   | 7  | 65  | Le  | k   |
| 1   | 9  | 0   | PW  | w   | 0   | 7  | 0   | To  | w   | 0,5 | 10 | 118 | To  | k   | 0   | 8  | 66  | Le  | k   |
| 1   | 10 | 13  | PW  | w   | 0   | 8  | 0   | To  | w   | 0,5 | 11 | 118 | To  | k   | 0   | 9  | 67  | Le  | k   |
| 1   | 11 | 23  | PW  | w   | 0   | 9  | 0   | To  | w   | 0,5 | 12 | 119 | To  | k   | 0   | 10 | 67  | Le  | k   |
| 1   | 12 | 23  | PW  | w   | 0   | 10 | 0   | To  | w   | 0,5 | 13 | 119 | To  | k   | 0   | 11 | 67  | Le  | k   |
| 1   | 13 | 23  | PW  | w   | 0   | 11 | 22  | To  | w   | 0,5 | 14 | 120 | To  | k   | 0   | 12 | 68  | Le  | k   |
| 1   | 14 | 23  | PW  | w   | 0   | 12 | 23  | To  | w   | 0,5 | 15 | 120 | To  | k   | 0   | 13 | 68  | Le  | k   |
| 1   | 15 | 25  | PW  | w   | 0   | 13 | 24  | To  | w   | 0,5 | 16 | 120 | To  | k   | 0   | 14 | 69  | Le  | k   |
| 1   | 16 | 80  | PW  | w   | 0   | 14 | 82  | To  | w   | 0,5 | 17 | 121 | To  | k   | 0   | 15 | 71  | Le  | k   |
| 1   | 17 | 86  | PW  | w   | 0   | 15 | 85  | To  | w   | 0,5 | 18 | 121 | To  | k   | 0   | 16 | 71  | Le  | k   |
| 1   | 18 | 91  | PW  | w   | 0   | 16 | 97  | To  | w   | 0,5 | 19 | 122 | To  | k   | 0   | 17 | 71  | Le  | k   |
| 1   | 19 | 93  | PW  | w   | 0   | 17 | 97  | To  | w   | 0,5 | 20 | 170 | To  | k   | 0   | 18 | 73  | Le  | k   |
| 1   | 20 | 96  | PW  | w   | 0   | 18 | 97  | To  | w   | 1   | 1  | 35  | To  | k   | 0   | 19 | 74  | Le  | k   |
| 1   | 1  | 0   | PW  | w   | 0   | 19 | 98  | To  | w   | 1   | 2  | 51  | To  | k   | 0   | 20 | 100 | Le  | k   |
| 1   | 2  | 0   | PW  | w   | 0   | 20 | 108 | To  | w   | 1   | 3  | 62  | To  | k   | 0,5 | 1  | 27  | Le  | k   |
| 1   | 3  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 1  | 0   | To  | w   | 1   | 4  | 69  | To  | k   | 0,5 | 2  | 81  | Le  | k   |
| 1   | 4  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 2  | 0   | To  | w   | 1   | 5  | 69  | To  | k   | 0,5 | 3  | 81  | Le  | k   |
| 1   | 5  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 3  | 0   | To  | w   | 1   | 6  | 74  | To  | k   | 0,5 | 4  | 85  | Le  | k   |
| 1   | 6  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 4  | 0   | To  | w   | 1   | 7  | 75  | To  | k   | 0,5 | 5  | 86  | Le  | k   |
| 1   | 7  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 5  | 0   | To  | w   | 1   | 8  | 75  | To  | k   | 0,5 | 6  | 89  | Le  | k   |
| 1   | 8  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 6  | 0   | To  | w   | 1   | 9  | 75  | To  | k   | 0,5 | 7  | 89  | Le  | k   |
| 1   | 9  | 0   | PW  | w   | 0,5 | 7  | 0   | To  | w   | 1   | 10 | 76  | To  | k   | 0,5 | 8  | 89  | Le  | k   |
| 1   | 10 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 8  | 0   | To  | w   | 1   | 11 | 76  | To  | k   | 0,5 | 9  | 90  | Le  | k   |
| 1   | 11 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 9  | 0   | To  | w   | 1   | 12 | 77  | To  | k   | 0,5 | 10 | 90  | Le  | k   |
| 1   | 12 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 10 | 0   | To  | w   | 1   | 13 | 78  | To  | k   | 0,5 | 11 | 91  | Le  | k   |
| 1   | 13 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 11 | 11  | To  | w   | 1   | 14 | 78  | To  | k   | 0,5 | 12 | 91  | Le  | k   |
| 1   | 14 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 12 | 12  | To  | w   | 1   | 15 | 79  | To  | k   | 0,5 | 13 | 92  | Le  | k   |
| 1   | 15 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 13 | 14  | To  | w   | 1   | 16 | 80  | To  | k   | 0,5 | 14 | 93  | Le  | k   |
| 1   | 16 | 0   | PW  | w   | 0,5 | 14 | 23  | To  | w   | 1   | 17 | 80  | To  | k   | 0,5 | 15 | 95  | Le  | k   |
| 1   | 17 | 5   | PW  | w   | 0,5 | 15 | 24  | To  | w   | 1   | 18 | 82  | To  | k   | 0,5 | 16 | 95  | Le  | k   |
| 1   | 18 | 8   | PW  | w   | 0,5 | 16 | 25  | To  | w   | 1   | 19 | 85  | To  | k   | 0,5 | 17 | 96  | Le  | k   |
| 1   | 19 | 10  | PW  | w   | 0,5 | 17 | 135 | To  | w   | 1   | 20 | 110 | To  | k   | 0,5 | 18 | 97  | Le  | k   |
| 1   | 20 | 12  | PW  | w   | 0,5 | 18 | 148 | To  | w   | 0   | 1  | 0   | To  | k   | 0,5 | 19 | 97  | Le  | k   |

## VIII Anhang

| 0   | 1  | 65  | To  | w   | 0,5 | 19 | 160 | To  | w   | 0   | 2  | 0   | To  | k   | 0,5 | 20 | 120 | Le  | k   |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 1   | 3  | 37  | Le  | k   | 0,5 | 1  | 90  | Bo  | w   | 1   | 1  | 24  | Le  | k   | 0   | 19 | 101 | Bo  | w   |
| 1   | 4  | 39  | Le  | k   | 0,5 | 2  | 98  | Bo  | w   | 0   | 4  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 2  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 5  | 44  | Le  | k   | 0,5 | 3  | 107 | Bo  | w   | 0   | 5  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 3  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 6  | 48  | Le  | k   | 0,5 | 4  | 108 | Bo  | w   | 0   | 6  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 4  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 7  | 48  | Le  | k   | 0,5 | 5  | 109 | Bo  | w   | 0   | 7  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 5  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 8  | 48  | Le  | k   | 0,5 | 6  | 72  | Bo  | w   | 0   | 8  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 6  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 9  | 49  | Le  | k   | 0,5 | 7  | 110 | Bo  | w   | 0   | 9  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 7  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 10 | 49  | Le  | k   | 0,5 | 8  | 110 | Bo  | w   | 0   | 10 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 8  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 11 | 50  | Le  | k   | 0,5 | 9  | 110 | Bo  | w   | 0   | 11 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 9  | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 12 | 51  | Le  | k   | 0,5 | 10 | 110 | Bo  | w   | 0   | 12 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 10 | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 13 | 51  | Le  | k   | 0,5 | 11 | 120 | Bo  | w   | 0   | 13 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 11 | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 14 | 52  | Le  | k   | 0,5 | 12 | 111 | Bo  | w   | 0   | 14 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 12 | 0   | Bo  | w   |
| 1   | 15 | 52  | Le  | k   | 0,5 | 13 | 112 | Bo  | w   | 0   | 15 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 13 | 24  | Bo  | w   |
| 1   | 16 | 52  | Le  | k   | 0,5 | 14 | 112 | Bo  | w   | 0   | 16 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 14 | 85  | Bo  | w   |
| 1   | 17 | 53  | Le  | k   | 0,5 | 15 | 115 | Bo  | w   | 0   | 17 | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 15 | 97  | Bo  | w   |
| 1   | 18 | 54  | Le  | k   | 0,5 | 16 | 113 | Bo  | w   | 0   | 18 | 5   | Bo  | w   | 0,5 | 16 | 97  | Bo  | w   |
| 1   | 19 | 55  | Le  | k   | 0,5 | 17 | 114 | Bo  | w   | 0   | 19 | 8   | Bo  | w   | 0,5 | 17 | 103 | Bo  | w   |
| 1   | 20 | 112 | Le  | k   | 0,5 | 18 | 115 | Bo  | w   | 0   | 20 | 60  | Bo  | w   | 0,5 | 18 | 111 | Bo  | w   |
| 0   | 1  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 19 | 117 | Bo  | w   | 0   | 1  | 81  | Bo  | w   | 0,5 | 19 | 120 | Bo  | w   |
| 0   | 2  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 20 | 140 | Bo  | w   | 0   | 2  | 82  | Bo  | w   | 0,5 | 20 | 160 | Bo  | w   |
| 0   | 3  | 0   | Le  | k   | 1   | 1  | 66  | Bo  | w   | 0   | 3  | 83  | Bo  | w   | 1   | 1  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 4  | 0   | Le  | k   | 1   | 2  | 68  | Bo  | w   | 0   | 4  | 85  | Bo  | w   | 1   | 2  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 5  | 0   | Le  | k   | 1   | 3  | 69  | Bo  | w   | 0   | 5  | 86  | Bo  | w   | 1   | 3  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 6  | 0   | Le  | k   | 1   | 4  | 72  | Bo  | w   | 0   | 6  | 52  | Bo  | w   | 1   | 4  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 7  | 0   | Le  | k   | 1   | 5  | 73  | Bo  | w   | 0   | 7  | 93  | Bo  | w   | 1   | 5  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 8  | 0   | Le  | k   | 1   | 6  | 32  | Bo  | w   | 0   | 8  | 93  | Bo  | w   | 1   | 6  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 9  | 0   | Le  | k   | 1   | 7  | 75  | Bo  | w   | 0   | 9  | 94  | Bo  | w   | 1   | 7  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 10 | 0   | Le  | k   | 1   | 8  | 75  | Bo  | w   | 0   | 10 | 95  | Bo  | w   | 1   | 8  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 11 | 0   | Le  | k   | 1   | 9  | 71  | Bo  | w   | 0   | 11 | 96  | Bo  | w   | 1   | 9  | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 12 | 0   | Le  | k   | 1   | 10 | 75  | Bo  | w   | 0   | 12 | 90  | Bo  | w   | 1   | 10 | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 13 | 0   | Le  | k   | 1   | 11 | 74  | Bo  | w   | 0   | 13 | 93  | Bo  | w   | 1   | 11 | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 14 | 0   | Le  | k   | 1   | 12 | 76  | Bo  | w   | 0   | 14 | 95  | Bo  | w   | 1   | 12 | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 15 | 0   | Le  | k   | 1   | 13 | 76  | Bo  | w   | 0   | 15 | 99  | Bo  | w   | 1   | 13 | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 16 | 7   | Le  | k   | 1   | 14 | 80  | Bo  | w   | 0   | 16 | 96  | Bo  | w   | 1   | 14 | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 17 | 8   | Le  | k   | 1   | 15 | 77  | Bo  | w   | 0   | 17 | 100 | Bo  | w   | 1   | 15 | 0   | Bo  | w   |
| 0   | 18 | 12  | Le  | k   | 1   | 16 | 79  | Bo  | w   | 0   | 18 | 110 | Bo  | w   | 1   | 16 | 54  | Bo  | w   |
| 0   | 20 | 15  | Le  | k   | 1   | 18 | 80  | Bo  | w   | 1   | 17 | 60  | Bo  | w   | 0,5 | 15 | 14  | BB  | w   |
| 0   | 1  | 0   | Bo  | w   | 1   | 19 | 82  | Bo  | w   | 1   | 18 | 64  | Bo  | w   | 0,5 | 16 | 55  | BB  | w   |
| 0   | 2  | 0   | Bo  | w   | 1   | 20 | 100 | Bo  | w   | 1   | 19 | 65  | Bo  | w   | 0,5 | 17 | 55  | BB  | w   |
| 0   | 3  | 0   | Bo  | w   | 0   | 1  | 0   | Bo  | w   | 1   | 20 | 67  | Bo  | w   | 0,5 | 18 | 60  | BB  | w   |
| 0   | 4  | 0   | Bo  | w   | 0   | 2  | 0   | Bo  | w   | 0   | 1  | 50  | BB  | w   | 0,5 | 19 | 60  | BB  | w   |
| 0   | 5  | 0   | Bo  | w   | 0   | 3  | 0   | Bo  | w   | 0   | 2  | 52  | BB  | w   | 0,5 | 20 | 70  | BB  | w   |
| 0   | 6  | 0   | Bo  | w   | 0   | 4  | 0   | Bo  | w   | 0   | 3  | 53  | BB  | w   | 1   | 1  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 7  | 0   | Bo  | w   | 0   | 5  | 0   | Bo  | w   | 0   | 4  | 58  | BB  | w   | 1   | 2  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 8  | 0   | Bo  | w   | 0   | 6  | 0   | Bo  | w   | 0   | 5  | 58  | BB  | w   | 1   | 3  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 9  | 0   | Bo  | w   | 0   | 7  | 0   | Bo  | w   | 0   | 6  | 40  | BB  | w   | 1   | 4  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 10 | 0   | Bo  | w   | 0   | 8  | 0   | Bo  | w   | 0   | 7  | 61  | BB  | w   | 1   | 5  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 11 | 0   | Bo  | w   | 0   | 9  | 0   | Bo  | w   | 0   | 8  | 62  | BB  | w   | 1   | 6  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 12 | 0   | Bo  | w   | 0   | 10 | 0   | Bo  | w   | 0   | 9  | 62  | BB  | w   | 1   | 7  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 13 | 0   | Bo  | w   | 0   | 11 | 0   | Bo  | w   | 0   | 10 | 60  | BB  | w   | 1   | 8  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 14 | 0   | Bo  | w   | 0   | 12 | 0   | Bo  | w   | 0   | 11 | 60  | BB  | w   | 1   | 9  | 0   | BB  | w   |
| 0   | 15 | 8   | Bo  | w   | 0   | 13 | 0   | Bo  | w   | 0   | 12 | 64  | BB  | w   | 1   | 10 | 0   | BB  | w   |
| 0   | 16 | 12  | Bo  | w   | 0   | 14 | 24  | Bo  | w   | 0   | 13 | 64  | BB  | w   | 1   | 11 | 0   | BB  | w   |
| 0   | 17 | 23  | Bo  | w   | 0   | 15 | 92  | Bo  | w   | 0   | 14 | 70  | BB  | w   | 1   | 12 | 0   | BB  | w   |
| 0   | 18 | 24  | Bo  | w   | 0   | 16 | 96  | Bo  | w   | 0   | 15 | 66  | BB  | w   | 1   | 13 | 0   | BB  | w   |
| 0   | 19 | 84  | Bo  | w   | 0   | 17 | 97  | Bo  | w   | 0   | 16 | 67  | BB  | w   | 1   | 14 | 0   | BB  | w   |
| 0   | 20 | 90  | Bo  | w   | 0   | 18 | 99  | Bo  | w   | 0   | 17 | 68  | BB  | w   | 1   | 15 | 0   | BB  | w   |
| 0   | 1  | 0   | Bo  | w   | 0   | 19 | 100 | Bo  | w   | 0   | 18 | 68  | BB  | w   | 1   | 16 | 4   | BB  | w   |
| 0   | 2  | 0   | Bo  | w   | 0   | 20 | 110 | Bo  | w   | 0   | 19 | 68  | BB  | w   | 1   | 17 | 8   | BB  | w   |
| 0   | 3  | 0   | Bo  | w   | 0,5 | 1  | 0   | Bo  | w   | 0   | 20 | 99  | BB  | w   | 1   | 18 | 9   | BB  | w   |

|     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 0,5 | 6  | 0   | BB  | w   | 0   | 4  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 1  | 82  | BB  | w   | 1   | 19 | 10  | BB  | w   |
| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 0,5 | 7  | 0   | BB  | w   | 0   | 5  | 0   | Pe  |     | 0,5 | 2  | 83  | BB  | w   | 1   | 20 | 12  | BB  | w   |
| 0,5 | 8  | 0   | BB  | w   | 0   | 6  | 0   | Pe  |     | 0,5 | 3  | 85  | BB  | w   | 0   | 1  | 69  | Pe  | w   |
| 0,5 | 9  | 0   | BB  | w   | 0   | 7  | 0   | Pe  |     | 0,5 | 4  | 86  | BB  | w   | 0   | 2  | 71  | Pe  | w   |
| 0,5 | 10 | 0   | BB  | w   | 0   | 8  | 0   | Pe  |     | 0,5 | 5  | 86  | BB  | w   | 0   | 3  | 72  | Pe  | w   |
| 0,5 | 11 | 0   | BB  | w   | 0   | 9  | 0   | Pe  |     | 0,5 | 6  | 66  | BB  | w   | 0   | 4  | 75  | Pe  | w   |
| 0,5 | 12 | 0   | BB  | w   | 0   | 10 | 0   | Pe  |     | 0,5 | 7  | 87  | BB  | w   | 0   | 5  | 75  | Pe  | w   |
| 0,5 | 13 | 10  | BB  | w   | 0   | 11 | 0   | Pe  |     | 0,5 | 8  | 87  | BB  | w   | 0   | 6  | 25  | Pe  | w   |
| 0,5 | 14 | 12  | BB  | w   | 0   | 12 | 0   | Pe  |     | 0,5 | 9  | 89  | BB  | w   | 0   | 7  | 76  | Pe  | w   |
| 0   | 13 | 0   | Pe  | w   | 1   | 11 | 43  | Le  | k   | 0,5 | 11 | 100 | BB  | w   | 0   | 9  | 75  | Pe  | w   |
| 0   | 14 | 0   | Pe  | w   | 1   | 12 | 43  | Le  | k   | 0,5 | 12 | 100 | BB  | w   | 0   | 10 | 77  | Pe  | w   |
| 0   | 15 | 0   | Pe  | w   | 1   | 13 | 45  | Le  | k   | 0,5 | 13 | 95  | BB  | w   | 0   | 11 | 78  | Pe  | w   |
| 0   | 16 | 14  | Pe  | w   | 1   | 14 | 60  | Le  | k   | 0,5 | 14 | 98  | BB  | w   | 0   | 12 | 78  | Pe  | w   |
| 0   | 17 | 78  | Pe  | w   | 1   | 15 | 49  | Le  | k   | 0,5 | 15 | 90  | BB  | w   | 0   | 13 | 79  | Pe  | w   |
| 0   | 18 | 80  | Pe  | w   | 1   | 16 | 50  | Le  | k   | 0,5 | 16 | 91  | BB  | w   | 0   | 14 | 79  | Pe  | w   |
| 0   | 19 | 85  | Pe  | w   | 1   | 17 | 50  | Le  | k   | 0,5 | 17 | 91  | BB  | w   | 0   | 15 | 78  | Pe  | w   |
| 0   | 20 | 88  | Pe  | w   | 1   | 18 | 51  | Le  | k   | 0,5 | 18 | 91  | BB  | w   | 0   | 16 | 80  | Pe  | w   |
| 0,5 | 1  | 0   | Pe  | w   | 1   | 19 | 52  | Le  | k   | 0,5 | 19 | 95  | BB  | w   | 0   | 17 | 85  | Pe  | w   |
| 0,5 | 2  | 0   | Pe  | w   | 1   | 20 | 80  | Le  | k   | 0,5 | 20 | 105 | BB  | w   | 0   | 18 | 80  | Pe  | w   |
| 0,5 | 3  | 0   | Pe  | w   | 0   | 1  | 0   | Le  | k   | 1   | 1  | 43  | BB  | w   | 0   | 19 | 90  | Pe  | w   |
| 0,5 | 4  | 0   | Pe  | w   | 0   | 2  | 0   | Le  | k   | 1   | 2  | 46  | BB  | w   | 0   | 20 | 100 | Pe  | w   |
| 0,5 | 5  | 0   | Pe  | w   | 0   | 3  | 0   | Le  | k   | 1   | 3  | 46  | BB  | w   | 0,5 | 1  | 83  | Pe  | w   |
| 0,5 | 6  | 0   | Pe  | w   | 0   | 4  | 0   | Le  | k   | 1   | 4  | 46  | BB  | w   | 0,5 | 2  | 85  | Pe  | w   |
| 0,5 | 7  | 0   | Pe  | w   | 0   | 5  | 0   | Le  | k   | 1   | 5  | 47  | BB  | w   | 0,5 | 3  | 88  | Pe  | w   |
| 0,5 | 8  | 0   | Pe  | w   | 0   | 6  | 0   | Le  | k   | 1   | 6  | 30  | BB  | w   | 0,5 | 4  | 90  | Pe  | w   |
| 0,5 | 9  | 0   | Pe  | w   | 0   | 7  | 0   | Le  | k   | 1   | 7  | 50  | BB  | w   | 0,5 | 5  | 91  | Pe  | w   |
| 0,5 | 10 | 0   | Pe  | w   | 0   | 8  | 0   | Le  | k   | 1   | 8  | 50  | BB  | w   | 0,5 | 6  | 95  | Pe  | w   |
| 0,5 | 11 | 0   | Pe  | w   | 0   | 9  | 0   | Le  | k   | 1   | 9  | 45  | BB  | w   | 0,5 | 7  | 95  | Pe  | w   |
| 0,5 | 12 | 0   | Pe  | w   | 0   | 10 | 0   | Le  | k   | 1   | 10 | 50  | BB  | w   | 0,5 | 8  | 95  | Pe  | w   |
| 0,5 | 13 | 0   | Pe  | w   | 0   | 11 | 0   | Le  | k   | 1   | 11 | 50  | BB  | w   | 0,5 | 9  | 96  | Pe  | w   |
| 0,5 | 14 | 60  | Pe  | w   | 0   | 12 | 0   | Le  | k   | 1   | 12 | 51  | BB  | w   | 0,5 | 10 | 96  | Pe  | w   |
| 0,5 | 15 | 65  | Pe  | w   | 0   | 13 | 0   | Le  | k   | 1   | 13 | 51  | BB  | w   | 0,5 | 11 | 96  | Pe  | w   |
| 0,5 | 16 | 66  | Pe  | w   | 0   | 14 | 0   | Le  | k   | 1   | 14 | 51  | BB  | w   | 0,5 | 12 | 97  | Pe  | w   |
| 0,5 | 17 | 68  | Pe  | w   | 0   | 15 | 0   | Le  | k   | 1   | 15 | 52  | BB  | w   | 0,5 | 13 | 98  | Pe  | w   |
| 0,5 | 18 | 69  | Pe  | w   | 0   | 16 | 0   | Le  | k   | 1   | 16 | 50  | BB  | w   | 0,5 | 14 | 98  | Pe  | w   |
| 0,5 | 19 | 70  | Pe  | w   | 0   | 17 | 19  | Le  | k   | 1   | 17 | 56  | BB  | w   | 0,5 | 15 | 98  | Pe  | w   |
| 0,5 | 20 | 114 | Pe  | w   | 0   | 18 | 20  | Le  | k   | 1   | 18 | 54  | BB  | w   | 0,5 | 16 | 100 | Pe  | w   |
| 1   | 1  | 0   | Pe  | w   | 0   | 19 | 23  | Le  | k   | 1   | 19 | 57  | BB  | w   | 0,5 | 17 | 109 | Pe  | w   |
| 1   | 2  | 0   | Pe  | w   | 0   | 20 | 50  | Le  | k   | 1   | 20 | 85  | BB  | w   | 0,5 | 18 | 110 | Pe  | w   |
| 1   | 3  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 1  | 0   | Le  | k   | 0   | 1  | 0   | BB  | w   | 0,5 | 19 | 110 | Pe  | w   |
| 1   | 4  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 2  | 0   | Le  | k   | 0   | 2  | 0   | BB  | w   | 0,5 | 20 | 120 | Pe  | w   |
| 1   | 5  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 3  | 0   | Le  | k   | 0   | 3  | 0   | BB  | w   | 1   | 1  | 50  | Pe  | w   |
| 1   | 6  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 4  | 0   | Le  | k   | 0   | 4  | 0   | BB  | w   | 1   | 2  | 51  | Pe  | w   |
| 1   | 7  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 5  | 0   | Le  | k   | 0   | 5  | 0   | BB  | w   | 1   | 3  | 53  | Pe  | w   |
| 1   | 8  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 6  | 0   | Le  | k   | 0   | 6  | 0   | BB  | w   | 1   | 4  | 55  | Pe  | w   |
| 1   | 9  | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 7  | 0   | Le  | k   | 0   | 7  | 0   | BB  | w   | 1   | 5  | 55  | Pe  | w   |
| 1   | 10 | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 8  | 0   | Le  | k   | 0   | 8  | 0   | BB  | w   | 1   | 6  | 42  | Pe  | w   |
| 1   | 11 | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 9  | 0   | Le  | k   | 0   | 9  | 0   | BB  | w   | 1   | 7  | 56  | Pe  | w   |
| 1   | 12 | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 10 | 0   | Le  | k   | 0   | 10 | 0   | BB  | w   | 1   | 8  | 57  | Pe  | w   |
| 1   | 13 | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 11 | 0   | Le  | k   | 0   | 11 | 0   | BB  | w   | 1   | 9  | 57  | Pe  | w   |
| 1   | 14 | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 12 | 0   | Le  | k   | 0   | 12 | 0   | BB  | w   | 1   | 10 | 58  | Pe  | w   |
| 1   | 15 | 0   | Pe  | w   | 0,5 | 13 | 0   | Le  | k   | 0   | 13 | 13  | BB  | w   | 1   | 11 | 60  | Pe  | w   |
| 1   | 16 | 8   | Pe  | w   | 0,5 | 14 | 12  | Le  | k   | 0   | 14 | 13  | BB  | w   | 1   | 12 | 61  | Pe  | w   |
| 1   | 17 | 10  | Pe  | w   | 0,5 | 15 | 13  | Le  | k   | 0   | 15 | 16  | BB  | w   | 1   | 13 | 61  | Pe  | w   |
| 1   | 18 | 14  | Pe  | w   | 0,5 | 16 | 17  | Le  | k   | 0   | 16 | 18  | BB  | w   | 1   | 14 | 61  | Pe  | w   |
| 1   | 19 | 18  | Pe  | w   | 0,5 | 17 | 23  | Le  | k   | 0   | 17 | 20  | BB  | w   | 1   | 15 | 62  | Pe  | w   |
| 1   | 20 | 23  | Pe  | w   | 0,5 | 18 | 40  | Le  | k   | 0   | 18 | 23  | BB  | w   | 1   | 16 | 65  | Pe  | w   |
| 0   | 1  | 51  | Le  | k   | 0,5 | 19 | 50  | Le  | k   | 0   | 19 | 24  | BB  | w   | 1   | 17 | 65  | Pe  | w   |
| 0   | 2  | 52  | Le  | k   | 0,5 | 20 | 100 | Le  | k   | 0   | 20 | 50  | BB  | w   | 1   | 18 | 66  | Pe  | w   |
| 0   | 3  | 53  | Le  | k   | 1   | 1  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 1  | 0   | BB  | w   | 1   | 19 | 68  | Pe  | w   |
| 0   | 4  | 57  | Le  | k   | 1   | 2  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 2  | 0   | BB  | w   | 1   | 20 | 90  | Pe  | w   |

## VIII Anhang

|     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 0   | 5  | 57  | Le  | k   | 1   | 3  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 3  | 0   | BB  | w   | 0   | 1  | 0   | Pe  | w   |
| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 0   | 6  | 12  | Le  | k   | 1   | 4  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 4  | 0   | BB  | w   | 0   | 2  | 0   | Pe  | w   |
| 0   | 7  | 58  | Le  | k   | 1   | 5  | 0   | Le  | k   | 0,5 | 5  | 0   | BB  | w   | 0   | 3  | 0   | Pe  | w   |
| 0   | 8  | 58  | Le  | k   | 1   | 6  | 0   | Le  | k   | 1   | 4  | 43  | Fu  | w   | 0,5 | 2  | 89  | Nu  | w   |
| 0   | 9  | 59  | Le  | k   | 1   | 7  | 0   | Le  | k   | 1   | 5  | 44  | Fu  | w   | 0,5 | 3  | 85  | Nu  | w   |
| 0   | 10 | 59  | Le  | k   | 1   | 8  | 0   | Le  | k   | 1   | 6  | 45  | Fu  | w   | 0,5 | 4  | 91  | Nu  | w   |
| 0   | 11 | 60  | Le  | k   | 1   | 9  | 0   | Le  | k   | 1   | 7  | 45  | Fu  | w   | 0,5 | 5  | 99  | Nu  | w   |
| 0   | 12 | 40  | Le  | k   | 1   | 10 | 0   | Le  | k   | 1   | 8  | 47  | Fu  | w   | 0,5 | 6  | 90  | Nu  | w   |
| 0   | 13 | 60  | Le  | k   | 1   | 11 | 0   | Le  | k   | 1   | 9  | 47  | Fu  | w   | 0,5 | 7  | 95  | Nu  | w   |
| 0   | 14 | 61  | Le  | k   | 1   | 12 | 0   | Le  | k   | 1   | 10 | 47  | Fu  | w   | 0,5 | 8  | 101 | Nu  | w   |
| 0   | 15 | 62  | Le  | k   | 1   | 13 | 0   | Le  | k   | 1   | 11 | 47  | Fu  | w   | 0,5 | 9  | 102 | Nu  | w   |
| 0   | 16 | 59  | Le  | k   | 1   | 14 | 0   | Le  | k   | 1   | 12 | 48  | Fu  | w   | 0,5 | 10 | 100 | Nu  | w   |
| 0   | 17 | 60  | Le  | k   | 1   | 15 | 0   | Le  | k   | 1   | 13 | 49  | Fu  | w   | 0,5 | 11 | 103 | Nu  | w   |
| 0   | 18 | 64  | Le  | k   | 1   | 16 | 0   | Le  | k   | 1   | 14 | 50  | Fu  | w   | 0,5 | 12 | 103 | Nu  | w   |
| 0   | 19 | 66  | Le  | k   | 1   | 17 | 5   | Le  | k   | 1   | 15 | 54  | Fu  | w   | 0,5 | 13 | 104 | Nu  | w   |
| 0   | 20 | 98  | Le  | k   | 1   | 18 | 10  | Le  | k   | 1   | 16 | 56  | Fu  | w   | 0,5 | 14 | 105 | Nu  | w   |
| 0,5 | 1  | 70  | Le  | k   | 1   | 19 | 12  | Le  | k   | 1   | 17 | 56  | Fu  | w   | 0,5 | 15 | 105 | Nu  | w   |
| 0,5 | 2  | 66  | Le  | k   | 1   | 20 | 15  | Le  | k   | 1   | 18 | 57  | Fu  | w   | 0,5 | 16 | 108 | Nu  | w   |
| 0,5 | 3  | 79  | Le  | k   | 0   | 1  | 15  | Fu  | w   | 1   | 19 | 58  | Fu  | w   | 0,5 | 17 | 110 | Nu  | w   |
| 0,5 | 4  | 79  | Le  | k   | 0   | 2  | 64  | Fu  | w   | 1   | 20 | 90  | Fu  | w   | 0,5 | 18 | 112 | Nu  | w   |
| 0,5 | 5  | 79  | Le  | k   | 0   | 3  | 65  | Fu  | w   | 0   | 1  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 19 | 120 | Nu  | w   |
| 0,5 | 6  | 52  | Le  | k   | 0   | 4  | 65  | Fu  | w   | 0   | 2  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 20 | 150 | Nu  | w   |
| 0,5 | 7  | 80  | Le  | k   | 0   | 5  | 65  | Fu  | w   | 0   | 3  | 0   | Fu  | w   | 1   | 1  | 50  | Nu  | w   |
| 0,5 | 8  | 80  | Le  | k   | 0   | 6  | 66  | Fu  | w   | 0   | 4  | 0   | Fu  | w   | 1   | 2  | 51  | Nu  | w   |
| 0,5 | 9  | 81  | Le  | k   | 0   | 7  | 67  | Fu  | w   | 0   | 5  | 0   | Fu  | w   | 1   | 3  | 65  | Nu  | w   |
| 0,5 | 10 | 82  | Le  | k   | 0   | 8  | 67  | Fu  | w   | 0   | 6  | 0   | Fu  | w   | 1   | 4  | 67  | Nu  | w   |
| 0,5 | 11 | 70  | Le  | k   | 0   | 9  | 68  | Fu  | w   | 0   | 7  | 0   | Fu  | w   | 1   | 5  | 69  | Nu  | w   |
| 0,5 | 12 | 80  | Le  | k   | 0   | 10 | 71  | Fu  | w   | 0   | 8  | 0   | Fu  | w   | 1   | 6  | 70  | Nu  | w   |
| 0,5 | 13 | 83  | Le  | k   | 0   | 11 | 72  | Fu  | w   | 0   | 9  | 0   | Fu  | w   | 1   | 7  | 70  | Nu  | w   |
| 0,5 | 14 | 84  | Le  | k   | 0   | 12 | 73  | Fu  | w   | 0   | 10 | 0   | Fu  | w   | 1   | 8  | 70  | Nu  | w   |
| 0,5 | 15 | 84  | Le  | k   | 0   | 13 | 73  | Fu  | w   | 0   | 11 | 0   | Fu  | w   | 1   | 9  | 71  | Nu  | w   |
| 0,5 | 16 | 83  | Le  | k   | 0   | 14 | 75  | Fu  | w   | 0   | 12 | 0   | Fu  | w   | 1   | 10 | 71  | Nu  | w   |
| 0,5 | 17 | 79  | Le  | k   | 0   | 15 | 76  | Fu  | w   | 0   | 13 | 0   | Fu  | w   | 1   | 11 | 72  | Nu  | w   |
| 0,5 | 18 | 80  | Le  | k   | 0   | 16 | 77  | Fu  | w   | 0   | 14 | 0   | Fu  | w   | 1   | 12 | 72  | Nu  | w   |
| 0,5 | 19 | 90  | Le  | k   | 0   | 17 | 77  | Fu  | w   | 0   | 15 | 0   | Fu  | w   | 1   | 13 | 72  | Nu  | w   |
| 0,5 | 20 | 110 | Le  | k   | 0   | 18 | 85  | Fu  | w   | 0   | 16 | 17  | Fu  | w   | 1   | 14 | 74  | Nu  | w   |
| 1   | 1  | 30  | Le  | k   | 0   | 19 | 87  | Fu  | w   | 0   | 17 | 72  | Fu  | w   | 1   | 15 | 75  | Nu  | w   |
| 1   | 2  | 35  | Le  | k   | 0   | 20 | 100 | Fu  | w   | 0   | 18 | 75  | Fu  | w   | 1   | 16 | 76  | Nu  | w   |
| 1   | 3  | 40  | Le  | k   | 0,5 | 1  | 74  | Fu  | w   | 0   | 19 | 75  | Fu  | w   | 1   | 17 | 76  | Nu  | w   |
| 1   | 4  | 31  | Le  | k   | 0,5 | 2  | 85  | Fu  | w   | 0   | 20 | 77  | Fu  | w   | 1   | 18 | 79  | Nu  | w   |
| 1   | 5  | 41  | Le  | k   | 0,5 | 3  | 85  | Fu  | w   | 0,5 | 1  | 0   | Fu  | w   | 1   | 19 | 80  | Nu  | w   |
| 1   | 6  | 20  | Le  | k   | 0,5 | 4  | 85  | Fu  | w   | 0,5 | 2  | 0   | Fu  | w   | 1   | 20 | 97  | Nu  | w   |
| 1   | 7  | 41  | Le  | k   | 0,5 | 5  | 86  | Fu  | w   | 0,5 | 3  | 0   | Fu  | w   | 0   | 1  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 8  | 22  | Le  | k   | 0,5 | 6  | 87  | Fu  | w   | 0,5 | 4  | 0   | Fu  | w   | 0   | 2  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 9  | 42  | Le  | k   | 0,5 | 7  | 87  | Fu  | w   | 0,5 | 5  | 0   | Fu  | w   | 0   | 3  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 10 | 42  | Le  | k   | 0,5 | 8  | 88  | Fu  | w   | 0,5 | 6  | 0   | Fu  | w   | 0   | 4  | 0   | Nu  | w   |
| 0,5 | 9  | 89  | Fu  | w   | 0   | 7  | 83  | Nu  | w   | 0,5 | 8  | 0   | Fu  | w   | 0   | 6  | 0   | Nu  | w   |
| 0,5 | 10 | 91  | Fu  | w   | 0   | 8  | 84  | Nu  | w   | 0,5 | 9  | 0   | Fu  | w   | 0   | 7  | 0   | Nu  | w   |
| 0,5 | 11 | 91  | Fu  | w   | 0   | 9  | 84  | Nu  | w   | 0,5 | 10 | 0   | Fu  | w   | 0   | 8  | 0   | Nu  | w   |
| 0,5 | 12 | 92  | Fu  | w   | 0   | 10 | 84  | Nu  | w   | 0,5 | 11 | 0   | Fu  | w   | 0   | 9  | 12  | Nu  | w   |
| 0,5 | 13 | 95  | Fu  | w   | 0   | 11 | 85  | Nu  | w   | 0,5 | 12 | 0   | Fu  | w   | 0   | 10 | 23  | Nu  | w   |
| 0,5 | 14 | 96  | Fu  | w   | 0   | 12 | 85  | Nu  | w   | 0,5 | 13 | 0   | Fu  | w   | 0   | 11 | 23  | Nu  | w   |
| 0,5 | 15 | 96  | Fu  | w   | 0   | 13 | 85  | Nu  | w   | 0,5 | 14 | 6   | Fu  | w   | 0   | 12 | 23  | Nu  | w   |
| 0,5 | 16 | 98  | Fu  | w   | 0   | 14 | 87  | Nu  | w   | 0,5 | 15 | 10  | Fu  | w   | 0   | 13 | 24  | Nu  | w   |
| 0,5 | 17 | 98  | Fu  | w   | 0   | 15 | 89  | Nu  | w   | 0,5 | 16 | 86  | Fu  | w   | 0   | 14 | 80  | Nu  | w   |
| 0,5 | 18 | 99  | Fu  | w   | 0   | 16 | 90  | Nu  | w   | 0,5 | 17 | 92  | Fu  | w   | 0   | 15 | 83  | Nu  | w   |
| 0,5 | 19 | 100 | Fu  | w   | 0   | 17 | 93  | Nu  | w   | 0,5 | 18 | 93  | Fu  | w   | 0   | 16 | 86  | Nu  | w   |
| 0,5 | 20 | 110 | Fu  | w   | 0   | 18 | 94  | Nu  | w   | 0,5 | 19 | 94  | Fu  | w   | 0   | 17 | 87  | Nu  | w   |
| 1   | 1  | 21  | Fu  | w   | 0   | 19 | 96  | Nu  | w   | 0,5 | 20 | 107 | Fu  | w   | 0   | 18 | 88  | Nu  | w   |
| 1   | 2  | 41  | Fu  | w   | 0   | 20 | 120 | Nu  | w   | 1   | 1  | 0   | Fu  | w   | 0   | 19 | 89  | Nu  | w   |
| 1   | 3  | 42  | Fu  | w   | 0,5 | 1  | 80  | Nu  | w   | 1   | 2  | 0   | Fu  | w   | 0   | 20 | 100 | Nu  | w   |



|     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |     |    |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| 1   | 9  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 7  | 0   | Nu  | w   | 1   | 3  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 1  | 0   | Nu  | w   |
| Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ | Kon | N  | Zys | Pop | Typ | Kon | N  | Zy  | Pop | Typ |
| 1   | 10 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 8  | 0   | Nu  | w   | 1   | 4  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 2  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 11 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 9  | 0   | Nu  | w   | 1   | 5  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 3  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 12 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 10 | 0   | Nu  | w   | 1   | 6  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 4  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 13 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 11 | 0   | Nu  | w   | 1   | 7  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 5  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 14 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 12 | 0   | Nu  | w   | 1   | 8  | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 6  | 0   | Nu  | w   |
| 1   | 15 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 13 | 54  | Nu  | w   | 0,5 | 8  | 89  | H   | w   | 0,5 | 6  | 94  | Le  | k   |
| 1   | 16 | 0   | Fu  | w   | 0,5 | 14 | 91  | Nu  | w   | 0,5 | 9  | 90  | H   | w   | 0,5 | 7  | 95  | Le  | k   |
| 1   | 17 | 86  | Fu  | w   | 0,5 | 15 | 101 | Nu  | w   | 0,5 | 10 | 90  | H   | w   | 0,5 | 8  | 95  | Le  | k   |
| 1   | 18 | 87  | Fu  | w   | 0,5 | 16 | 103 | Nu  | w   | 0,5 | 11 | 90  | H   | w   | 0,5 | 9  | 96  | Le  | k   |
| 1   | 19 | 90  | Fu  | w   | 0,5 | 17 | 104 | Nu  | w   | 0,5 | 12 | 91  | H   | w   | 0,5 | 10 | 97  | Le  | k   |
| 1   | 20 | 105 | Fu  | w   | 0,5 | 18 | 105 | Nu  | w   | 0,5 | 13 | 91  | H   | w   | 0,5 | 11 | 98  | Le  | k   |
| 0   | 1  | 51  | Nu  | w   | 0,5 | 19 | 106 | Nu  | w   | 0,5 | 14 | 91  | H   | w   | 0,5 | 12 | 98  | Le  | k   |
| 0   | 2  | 80  | Nu  | w   | 0,5 | 20 | 158 | Nu  | w   | 0,5 | 15 | 91  | H   | w   | 0,5 | 13 | 98  | Le  | k   |
| 0   | 3  | 81  | Nu  | w   | 1   | 1  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 16 | 91  | H   | w   | 0,5 | 14 | 100 | Le  | k   |
| 0   | 4  | 82  | Nu  | w   | 1   | 2  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 17 | 92  | H   | w   | 0,5 | 15 | 101 | Le  | k   |
| 0   | 5  | 82  | Nu  | w   | 1   | 3  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 18 | 92  | H   | w   | 0,5 | 16 | 102 | Le  | k   |
| 0   | 6  | 83  | Nu  | w   | 1   | 4  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 19 | 93  | H   | w   | 0,5 | 17 | 103 | Le  | k   |
| 1   | 5  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 3  | 0   | H   | w   | 1   | 1  | 20  | H   | w   | 0,5 | 19 | 105 | Le  | k   |
| 1   | 6  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 4  | 0   | H   | w   | 1   | 2  | 51  | H   | w   | 0,5 | 20 | 150 | Le  | k   |
| 1   | 7  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 5  | 0   | H   | w   | 1   | 3  | 51  | H   | w   | 1   | 1  | 41  | Le  | k   |
| 1   | 8  | 0   | Nu  | w   | 0,5 | 6  | 0   | H   | w   | 1   | 4  | 53  | H   | w   | 1   | 2  | 48  | Le  | k   |
| 1   | 9  | 71  | Nu  | w   | 0,5 | 7  | 0   | H   | w   | 1   | 5  | 53  | H   | w   | 1   | 3  | 50  | Le  | k   |
| 1   | 10 | 71  | Nu  | w   | 0,5 | 8  | 0   | H   | w   | 1   | 6  | 54  | H   | w   | 1   | 4  | 52  | Le  | k   |
| 1   | 11 | 71  | Nu  | w   | 0,5 | 9  | 0   | H   | w   | 1   | 7  | 54  | H   | w   | 1   | 5  | 54  | Le  | k   |
| 1   | 12 | 71  | Nu  | w   | 0,5 | 10 | 0   | H   | w   | 1   | 8  | 30  | H   | w   | 1   | 6  | 55  | Le  | k   |
| 1   | 13 | 73  | Nu  | w   | 0,5 | 11 | 0   | H   | w   | 1   | 9  | 55  | H   | w   | 1   | 7  | 57  | Le  | k   |
| 1   | 14 | 74  | Nu  | w   | 0,5 | 12 | 0   | H   | w   | 1   | 10 | 56  | H   | w   | 1   | 8  | 57  | Le  | k   |
| 1   | 15 | 75  | Nu  | w   | 0,5 | 13 | 14  | H   | w   | 1   | 11 | 57  | H   | w   | 1   | 9  | 58  | Le  | k   |
| 1   | 16 | 78  | Nu  | w   | 0,5 | 14 | 15  | H   | w   | 1   | 12 | 58  | H   | w   | 1   | 10 | 58  | Le  | k   |
| 1   | 17 | 78  | Nu  | w   | 0,5 | 15 | 16  | H   | w   | 1   | 13 | 59  | H   | w   | 1   | 11 | 58  | Le  | k   |
| 1   | 18 | 82  | Nu  | w   | 0,5 | 16 | 17  | H   | w   | 1   | 14 | 59  | H   | w   | 1   | 12 | 60  | Le  | k   |
| 1   | 19 | 86  | Nu  | w   | 0,5 | 17 | 74  | H   | w   | 1   | 15 | 59  | H   | w   | 1   | 13 | 60  | Le  | k   |
| 1   | 20 | 89  | Nu  | w   | 0,5 | 18 | 90  | H   | w   | 1   | 16 | 59  | H   | w   | 1   | 14 | 60  | Le  | k   |
| 0   | 1  | 51  | H   | w   | 0,5 | 19 | 97  | H   | w   | 1   | 17 | 59  | H   | w   | 1   | 15 | 61  | Le  | k   |
| 0   | 2  | 68  | H   | w   | 0,5 | 20 | 150 | H   | w   | 1   | 18 | 60  | H   | w   | 1   | 16 | 61  | Le  | k   |
| 0   | 3  | 69  | H   | w   | 0   | 1  | 40  | Le  | k   | 1   | 19 | 60  | H   | w   | 1   | 17 | 61  | Le  | k   |
| 0   | 4  | 70  | H   | w   | 0   | 2  | 61  | Le  | k   | 1   | 20 | 100 | H   | w   | 1   | 18 | 61  | Le  | k   |
| 0   | 5  | 71  | H   | w   | 0   | 3  | 71  | Le  | k   | 0   | 1  | 0   | H   | w   | 1   | 19 | 71  | Le  | k   |
| 0   | 6  | 71  | H   | w   | 0   | 4  | 72  | Le  | k   | 0   | 2  | 0   | H   | w   | 1   | 20 | 99  | Le  | k   |
| 0   | 7  | 72  | H   | w   | 0   | 5  | 72  | Le  | k   | 0   | 3  | 0   | H   | w   | 0   | 1  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 8  | 72  | H   | w   | 0   | 6  | 75  | Le  | k   | 0   | 4  | 0   | H   | w   | 0   | 2  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 9  | 72  | H   | w   | 0   | 7  | 75  | Le  | k   | 0   | 5  | 0   | H   | w   | 0   | 3  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 10 | 73  | H   | w   | 0   | 8  | 76  | Le  | k   | 0   | 6  | 0   | H   | w   | 0   | 4  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 11 | 73  | H   | w   | 0   | 9  | 78  | Le  | k   | 0   | 7  | 0   | H   | w   | 0   | 5  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 12 | 74  | H   | w   | 0   | 10 | 78  | Le  | k   | 0   | 8  | 10  | H   | w   | 0   | 6  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 13 | 74  | H   | w   | 0   | 11 | 78  | Le  | k   | 0   | 9  | 23  | H   | w   | 0   | 7  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 14 | 74  | H   | w   | 0   | 12 | 78  | Le  | k   | 0   | 10 | 23  | H   | w   | 0   | 8  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 15 | 74  | H   | w   | 0   | 13 | 78  | Le  | k   | 0   | 11 | 25  | H   | w   | 0   | 9  | 0   | Le  | k   |
| 0   | 16 | 74  | H   | w   | 0   | 14 | 80  | Le  | k   | 0   | 12 | 26  | H   | w   | 0   | 10 | 0   | Le  | k   |
| 0   | 17 | 75  | H   | w   | 0   | 15 | 80  | Le  | k   | 0   | 13 | 60  | H   | w   | 0   | 11 | 0   | Le  | k   |
| 0   | 18 | 75  | H   | w   | 0   | 16 | 81  | Le  | k   | 0   | 14 | 62  | H   | w   | 0   | 12 | 0   | Le  | k   |
| 0   | 19 | 76  | H   | w   | 0   | 17 | 81  | Le  | k   | 0   | 15 | 63  | H   | w   | 0   | 13 | 0   | Le  | k   |
| 0   | 20 | 99  | H   | w   | 0   | 18 | 81  | Le  | k   | 0   | 16 | 65  | H   | w   | 0   | 14 | 70  | Le  | k   |
| 0,5 | 1  | 60  | H   | w   | 0   | 19 | 81  | Le  | k   | 0   | 17 | 66  | H   | w   | 0   | 15 | 73  | Le  | k   |
| 0,5 | 2  | 82  | H   | w   | 0   | 20 | 110 | Le  | k   | 0   | 18 | 67  | H   | w   | 0   | 16 | 12  | Le  | k   |
| 0,5 | 3  | 85  | H   | w   | 0,5 | 1  | 71  | Le  | k   | 0   | 19 | 69  | H   | w   | 0   | 17 | 50  | Le  | k   |
| 0,5 | 4  | 85  | H   | w   | 0,5 | 2  | 76  | Le  | k   | 0   | 20 | 90  | H   | w   | 0   | 18 | 26  | Le  | k   |
| 0,5 | 5  | 86  | H   | w   | 0,5 | 3  | 87  | Le  | k   | 0,5 | 1  | 0   | H   | w   | 0   | 19 | 17  | Le  | k   |
| 0,5 | 6  | 60  | H   | w   | 0,5 | 4  | 90  | Le  | k   | 0,5 | 2  | 0   | H   | w   | 0   | 20 | 200 | Le  | k   |
| 0,5 | 19 | 28  | Le  | k   | 5   | 0  | 4   | Le  | k   | 1   | 11 | 0   | Le  | k   | 1   | 17 | 60  | Le  | k   |

### 8.3 Zusammensetzung und Dosierungsvorschrift der Steiner-Nährlösung

#### Stammlösung A

|  |       |
|--|-------|
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O | 882 g |
| KNO <sub>3</sub>                                       | 444 g |
| in 10 l Aqua demin. lösen                              |       |

#### Stammlösung B

|  |        |
|--|--------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 134 g  |
| K <sub>2</sub> SSO <sub>4</sub>        | 154 g  |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 473 g  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,1 n) | 125 ml |
| in 10 l Aqua demin. lösen              |        |

#### Stammlösung C

NaFe EDTA 32,85 g/l H<sub>2</sub>O

#### Stammlösung D

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O                | 2000 mg/100ml H <sub>2</sub> O        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>                        | 2690 mg/100ml heißes H <sub>2</sub> O |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 560 mg/100ml H <sub>2</sub> O         |
| CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O                | 78 mg/100ml H <sub>2</sub> O          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 126 mg/100ml H <sub>2</sub> O         |

zusammen auf 1 l auffüllen, CuSO<sub>4</sub> erst am Schluss zugeben

#### Mengen für 1 l gebrauchsfertige Nährlösung

|               |       |
|---------------|-------|
| Stammlösung A | 10 ml |
| Stammlösung B | 10 ml |
| Stammlösung C | 1 ml  |
| Stammlösung D | 1 ml  |

#### Dosierung für 25 kg trockenen Sand

1,2 l Steiner + 0,8 H<sub>2</sub>O

#### Dosierung für 25 kg feuchten Sand

nur 1,2 l Steiner

#### Auf 250 g feuchten Löss

12 ml



















## 8.5 Polymorphiegrad (Rohdata)

Population name : 1 AC11  
 The number of polymorphic loci is : 14  
 The percentage of polymorphic loci is : 6.19 %  
 Population name : 2 Pop 2 AH1  
 The number of polymorphic loci is : 20  
 The percentage of polymorphic loci is : 8.85 %  
 Population name : Pop 3 1AH1  
 The number of polymorphic loci is : 10  
 The percentage of polymorphic loci is : 4.42 %  
 Population name : Pop 4 AI1  
 The number of polymorphic loci is : 15  
 The percentage of polymorphic loci is : 6.64 %  
 Population name : Pop 5 Bo1  
 The number of polymorphic loci is : 25  
 The percentage of polymorphic loci is : 11.06 %  
 Population name : Pop 6 Ce1  
 The number of polymorphic loci is : 27  
 The percentage of polymorphic loci is : 11.95 %  
 Population name : Pop 7 AC1  
 The number of polymorphic loci is : 27  
 The percentage of polymorphic loci is : 11.95 %  
 Population name : Pop 8 Bi1  
 The number of polymorphic loci is : 22  
 The percentage of polymorphic loci is : 9.73 %  
 Population name : Pop 9 Gr1  
 The number of polymorphic loci is : 16  
 The percentage of polymorphic loci is : 7.08 %  
 Population name : pop 10 M1  
 The number of polymorphic loci is : 13  
 The percentage of polymorphic loci is : 5.75 %  
 Population name : pop 11 Sc1  
 The number of polymorphic loci is : 18  
 The percentage of polymorphic loci is : 7.96 %  
 Population name : pop 12 To1  
 The number of polymorphic loci is : 19  
 The percentage of polymorphic loci is : 8.41 %  
 Population name : pop 13 1Fu1  
 The number of polymorphic loci is : 15  
 The percentage of polymorphic loci is : 6.64 %  
 Population name : pop 14 Fu1  
 The number of polymorphic loci is : 23  
 The percentage of polymorphic loci is : 10.18 %  
 Population name : pop 15 Pe1  
 The number of polymorphic loci is : 24  
 The percentage of polymorphic loci is : 10.62 %  
 Population name : pop 16 1Pe1  
 The number of polymorphic loci is : 43  
 The percentage of polymorphic loci is : 19.03 %  
 Population name : pop 17 SM1  
 The number of polymorphic loci is : 39  
 The percentage of polymorphic loci is : 17.26 %  
 Population name : pop 18 1SM1  
 The number of polymorphic loci is : 21  
 The percentage of polymorphic loci is : 9.29 %  
 Population name : pop 19 1PI1  
 The number of polymorphic loci is : 17  
 The percentage of polymorphic loci is : 7.52 %  
 Population name : pop 20 PI1  
 The number of polymorphic loci is : 13  
 The percentage of polymorphic loci is : 5.75 %  
 Population name : pop 21 N1  
 The number of polymorphic loci is : 36

The percentage of polymorphic loci is : 15.93 %  
Population name : pop 22 Ch1  
The number of polymorphic loci is : 16  
The percentage of polymorphic loci is : 7.08 %  
Population name : pop 23 SP1  
The number of polymorphic loci is : 25  
The percentage of polymorphic loci is : 11.06 %  
Population name : pop 24 SPV1  
The number of polymorphic loci is : 23  
The percentage of polymorphic loci is : 10.18 %  
Population name : pop 25 Le1  
The number of polymorphic loci is : 3  
The percentage of polymorphic loci is : 1.33 %  
Population name : pop 26 GF1  
The number of polymorphic loci is : 72  
The percentage of polymorphic loci is : 31.86 %  
Population name : pop 27 SWU1  
The number of polymorphic loci is : 18  
The percentage of polymorphic loci is : 7.96 %  
Population name : pop 28 Fa1  
The number of polymorphic loci is : 5  
The percentage of polymorphic loci is : 2.21 %  
Population name : pop 29 DZD1  
The number of polymorphic loci is : 12  
The percentage of polymorphic loci is : 5.31 %  
Population name : pop 30 Pg1  
The number of polymorphic loci is : 19  
The percentage of polymorphic loci is : 8.41 %  
Population name : pop 31 FSF1  
The number of polymorphic loci is : 9  
The percentage of polymorphic loci is : 3.98 %  
Population name : pop 32 BB1  
The number of polymorphic loci is : 19  
The percentage of polymorphic loci is : 8.41 %  
Population name : pop 33 Bt1  
The number of polymorphic loci is : 7  
The percentage of polymorphic loci is : 3.10 %  
Population name : pop 34 Pr1  
The number of polymorphic loci is : 33  
The percentage of polymorphic loci is : 14.60 %  
Population name : pop 35 H1  
The number of polymorphic loci is : 11  
The percentage of polymorphic loci is : 4.87 %  
Population name : pop 36 WH1  
The number of polymorphic loci is : 13  
The percentage of polymorphic loci is : 5.75 %

## 8.6 Shannon Index (Rohdata)

| Locus | Sample Size | na*    | ne*    | h*     | I*     |
|-------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 001   | 360         | 2.0000 | 1.9674 | 0.4917 | 0.6848 |
| 002   | 360         | 2.0000 | 1.7373 | 0.4244 | 0.6155 |
| 003   | 360         | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 004   | 360         | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 005   | 360         | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 006   | 360         | 2.0000 | 1.0177 | 0.0174 | 0.0503 |
| 007   | 360         | 2.0000 | 1.9877 | 0.4969 | 0.6901 |
| 008   | 360         | 2.0000 | 1.8398 | 0.4565 | 0.6490 |
| 009   | 360         | 2.0000 | 1.1022 | 0.0927 | 0.1947 |
| 010   | 360         | 2.0000 | 1.8460 | 0.4583 | 0.6508 |
| 011   | 360         | 2.0000 | 1.4218 | 0.2967 | 0.4732 |
| 012   | 360         | 2.0000 | 1.3144 | 0.2392 | 0.4029 |
| 013   | 360         | 2.0000 | 1.1369 | 0.1204 | 0.2387 |
| 014   | 360         | 2.0000 | 1.0758 | 0.0705 | 0.1569 |
| 015   | 360         | 2.0000 | 1.9441 | 0.4856 | 0.6787 |
| 016   | 360         | 2.0000 | 1.9744 | 0.4935 | 0.6866 |
| 017   | 360         | 2.0000 | 1.3144 | 0.2392 | 0.4029 |
| 018   | 360         | 2.0000 | 2.0000 | 0.5000 | 0.6931 |
| 019   | 360         | 2.0000 | 1.2462 | 0.1975 | 0.3488 |
| 020   | 360         | 2.0000 | 1.3364 | 0.2517 | 0.4187 |
| 021   | 360         | 2.0000 | 1.6701 | 0.4012 | 0.5908 |
| 022   | 360         | 2.0000 | 1.3364 | 0.2517 | 0.4187 |
| 023   | 360         | 2.0000 | 1.2675 | 0.2110 | 0.3667 |
| 024   | 360         | 2.0000 | 1.6701 | 0.4012 | 0.5908 |
| 025   | 360         | 2.0000 | 1.0571 | 0.0540 | 0.1269 |
| 026   | 360         | 2.0000 | 1.4562 | 0.3133 | 0.4926 |
| 027   | 360         | 2.0000 | 1.6036 | 0.3764 | 0.5639 |
| 028   | 360         | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 029   | 360         | 2.0000 | 1.4562 | 0.3133 | 0.4926 |
| 030   | 360         | 2.0000 | 1.4562 | 0.3133 | 0.4926 |
| 031   | 360         | 2.0000 | 1.8031 | 0.4454 | 0.6375 |
| 032   | 360         | 2.0000 | 1.8595 | 0.4622 | 0.6549 |
| 033   | 360         | 2.0000 | 1.3883 | 0.2797 | 0.4528 |
| 034   | 360         | 2.0000 | 1.6952 | 0.4101 | 0.6003 |
| 035   | 360         | 2.0000 | 1.1803 | 0.1528 | 0.2868 |
| 036   | 360         | 2.0000 | 1.6224 | 0.3836 | 0.5718 |
| 037   | 360         | 2.0000 | 1.9827 | 0.4956 | 0.6888 |
| 038   | 360         | 2.0000 | 1.9756 | 0.4938 | 0.6870 |
| 039   | 360         | 2.0000 | 1.9459 | 0.4861 | 0.6792 |
| 040   | 360         | 2.0000 | 1.5283 | 0.3457 | 0.5297 |
| 041   | 360         | 2.0000 | 1.6701 | 0.4012 | 0.5908 |
| 042   | 360         | 2.0000 | 1.0571 | 0.0540 | 0.1269 |
| 043   | 360         | 2.0000 | 1.9059 | 0.4753 | 0.6682 |
| 044   | 360         | 2.0000 | 1.2496 | 0.1997 | 0.3518 |
| 045   | 360         | 2.0000 | 1.6701 | 0.4012 | 0.5908 |
| 046   | 360         | 2.0000 | 1.2009 | 0.1673 | 0.3074 |
| 047   | 360         | 2.0000 | 1.2496 | 0.1997 | 0.3518 |
| 048   | 360         | 2.0000 | 1.9938 | 0.4985 | 0.6916 |
| 049   | 360         | 2.0000 | 1.9059 | 0.4753 | 0.6682 |
| 050   | 360         | 2.0000 | 1.9459 | 0.4861 | 0.6792 |
| 051   | 360         | 2.0000 | 1.4562 | 0.3133 | 0.4926 |
| 052   | 360         | 2.0000 | 1.6036 | 0.3764 | 0.5639 |
| 053   | 360         | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 054   | 360         | 2.0000 | 1.0571 | 0.0540 | 0.1269 |
| 055   | 360         | 2.0000 | 1.3846 | 0.2778 | 0.4506 |
| 056   | 360         | 2.0000 | 1.3846 | 0.2778 | 0.4506 |
| 057   | 360         | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 058   | 360         | 2.0000 | 1.1803 | 0.1528 | 0.2868 |
| 059   | 360         | 2.0000 | 1.3846 | 0.2778 | 0.4506 |
| 060   | 360         | 2.0000 | 1.3846 | 0.2778 | 0.4506 |
| 061   | 360         | 2.0000 | 1.9744 | 0.4935 | 0.6866 |
| 062   | 360         | 2.0000 | 1.8335 | 0.4546 | 0.6470 |
| 063   | 360         | 2.0000 | 1.5133 | 0.3392 | 0.5224 |
| 064   | 360         | 2.0000 | 1.8965 | 0.4727 | 0.6656 |
| 065   | 360         | 2.0000 | 1.9335 | 0.4828 | 0.6758 |
| 066   | 360         | 2.0000 | 1.9967 | 0.4992 | 0.6923 |
| 067   | 360         | 2.0000 | 1.3246 | 0.2450 | 0.4103 |
| 068   | 360         | 2.0000 | 1.5038 | 0.3350 | 0.5176 |
| 069   | 360         | 2.0000 | 1.8188 | 0.4502 | 0.6425 |

## VIII Anhang

---

|     |     |        |        |        |        |
|-----|-----|--------|--------|--------|--------|
| 070 | 360 | 2.0000 | 1.3840 | 0.2775 | 0.4502 |
| 071 | 360 | 2.0000 | 1.9984 | 0.4996 | 0.6928 |
| 072 | 360 | 2.0000 | 1.4644 | 0.3171 | 0.4971 |
| 073 | 360 | 2.0000 | 1.8071 | 0.4466 | 0.6388 |
| 074 | 360 | 2.0000 | 1.8451 | 0.4580 | 0.6506 |
| 075 | 360 | 2.0000 | 1.9372 | 0.4838 | 0.6768 |
| 076 | 360 | 2.0000 | 1.7712 | 0.4354 | 0.6271 |
| 077 | 360 | 2.0000 | 1.9679 | 0.4918 | 0.6850 |
| 078 | 360 | 2.0000 | 1.6842 | 0.4062 | 0.5962 |
| 079 | 360 | 2.0000 | 1.3550 | 0.2620 | 0.4313 |
| 080 | 360 | 2.0000 | 1.7718 | 0.4356 | 0.6273 |
| 081 | 360 | 2.0000 | 1.4562 | 0.3133 | 0.4926 |
| 082 | 360 | 2.0000 | 1.8661 | 0.4641 | 0.6568 |
| 083 | 360 | 2.0000 | 1.7373 | 0.4244 | 0.6155 |
| 084 | 360 | 2.0000 | 1.3881 | 0.2796 | 0.4527 |
| 085 | 360 | 2.0000 | 1.5511 | 0.3553 | 0.5405 |
| 086 | 360 | 2.0000 | 1.3563 | 0.2627 | 0.4322 |
| 087 | 360 | 2.0000 | 1.9780 | 0.4944 | 0.6876 |
| 088 | 360 | 2.0000 | 1.5170 | 0.3408 | 0.5242 |
| 089 | 360 | 2.0000 | 1.2972 | 0.2291 | 0.3902 |
| 090 | 360 | 2.0000 | 1.0948 | 0.0866 | 0.1846 |
| 091 | 360 | 2.0000 | 1.0948 | 0.0866 | 0.1846 |
| 092 | 360 | 2.0000 | 1.7744 | 0.4364 | 0.6281 |
| 093 | 360 | 2.0000 | 1.2640 | 0.2089 | 0.3639 |
| 094 | 360 | 2.0000 | 1.3974 | 0.2844 | 0.4585 |
| 095 | 360 | 2.0000 | 1.6772 | 0.4038 | 0.5935 |
| 096 | 360 | 2.0000 | 1.4128 | 0.2922 | 0.4678 |
| 097 | 360 | 2.0000 | 1.3144 | 0.2392 | 0.4029 |
| 098 | 360 | 2.0000 | 1.6224 | 0.3836 | 0.5718 |
| 099 | 360 | 2.0000 | 1.0541 | 0.0513 | 0.1218 |
| 100 | 360 | 2.0000 | 1.8395 | 0.4564 | 0.6489 |
| 101 | 360 | 2.0000 | 1.8718 | 0.4658 | 0.6585 |
| 102 | 360 | 2.0000 | 1.1141 | 0.1024 | 0.2105 |
| 103 | 360 | 2.0000 | 1.0948 | 0.0866 | 0.1846 |
| 104 | 360 | 2.0000 | 1.4035 | 0.2875 | 0.4622 |
| 105 | 360 | 2.0000 | 1.4599 | 0.3150 | 0.4946 |
| 106 | 360 | 2.0000 | 1.6772 | 0.4038 | 0.5935 |
| 107 | 360 | 2.0000 | 1.0446 | 0.0427 | 0.1051 |
| 108 | 360 | 2.0000 | 1.8031 | 0.4454 | 0.6375 |

Mean            360   1.9646   1.5360   0.3180   0.4804  
St. Dev                 0.1852   0.3203   0.1517   0.1948

\* na = Observed number of alleles

\* ne = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]

\* h = Nei's (1973) gene diversity

\* I = Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

## Herzlichen Dank.....

- ..... Herrn Prof. Dr. Ingolf Schuphan für die Bereitstellung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut, seine Unterstützung und für die stets offene Tür.
- ..... Herrn PD Dr. Detlef Bartsch für die fachliche Betreuung und Hilfsbereitschaft, die vielen Anregungen und die gute Zusammenarbeit. Und für seine Geduld und stete Bereitschaft alle Fragen zu beantworten und Probleme zu lösen.
- ..... Herrn Dr. Achim Gathmann der das Erbe angetreten hat, meine Rüben und mich zu betreuen, seiner Hilfsbereitschaft und vielen Anregungen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- ..... Christiane für die unendlichen Stunden freundschaftlicher Diskussion und ihrer Geduld über die vielen Jahre (14).
- ..... Kristine Holz für ihre unermüdliche Bereitschaft allen Problemen den Garaus zu machen.
- ..... meiner Arbeitsgruppe, Frau Dr. Sabine Eber, Frau Dr. Christiane Saeglitz, Heike Engels, Claudia Gaspers, Kai-Uwe Priesnitz und Stephan Rauschen, bei der ich immer willkommen war.
- ..... den Mitarbeitern des Instituts für Umweltforschung
- ..... dem TransGen Team, Gerd Spelsberg, Sigrid Fuhrmann, Heike Heinrichs und Anika Poetschke, die mich immer wieder ermutigt haben am Ball zu bleiben.
- ..... meinen Eltern für ihre Unterstützung und auf die man sich immer verlassen kann.
- ..... Bernd dem ich nie zuviel wurde.

## Lebenslauf

Name: Ute Wehres  
Geburtsdatum: 05.10.1968

### Ausbildung:

|            |   |
|------------|---|
| 28.05.1990 | Abitur am Rückertgymnasium in Düsseldorf  |
| 02.09.1991 | Aufnahme der Ausbildung als Biologisch Technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie Köln   |
| 06.07.1993 | Abschluss als Biologisch Technischen Assistentin mit Zusatzqualifikation „Umweltschutz“   |
| 01.10.1993 | Beginn des Studiums der Diplom Biologie an der RWTH-Aachen  |
| 01.10.2001 | Abschluss des Studiums der Biologie. Diplomarbeit: „Untersuchung zur Populationsdynamik und gentechnischen Diversität von <i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> an der deutschen Ostseeküste – Grunddaten für ein Monitoring nach Inverkehrbringung transgener Zuckerrüben“ |

### Wissenschaftliche Tätigkeiten:

|                   |  |
|-------------------|--|
| 1997 – 1999       | Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entomologie und Ökologie der RWTH-Aachen  |
| 01.1999 – 12.2000 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Umwelt-hygiene am Uniklinikum Aachen  |
| 06.1999 – 10.2001 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Umwelt-forschung der RWTH-Aachen  |
| 01.2001 – 06.2001 | Stipendium der European Science Foundation<br>Aufenthalt am Institut für Populationsdynamik an der Universität Lille                         |
| 05.2002 - 08.2002 | Aufenthalt Institut für Pflanzenanbau und Pflanzen-züchtung am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| seit 2002:        | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Umwelt-forschung der RWTH-Aachen   |