Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
Direktor: Prof. Dr. habil. W.E. Weber
der
Landwirtschaftlichen Fakultät
Dekan: Prof. Dr. habil. P. Pickel
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Fachgebiet: Pflanzenzüchtung

Erschließung genetischer Ressourcen der Wiesenrispe für die Gräserzüchtung durch Analyse wichtiger Merkmalsausprägungen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

Von Diplomagraringenieur
Kalina Andreeva

Halle/Saale 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000010379
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010379]

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
Direktor: Prof. Dr. habil. W.E. Weber
der
Landwirtschaftlichen Fakultät
Dekan: Prof. Dr. habil. P. Pickel
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Erschließung genetischer Ressourcen der Wiesenrispe für die Gräserzüchtung durch Analyse wichtiger Merkmalsausprägungen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von
Diplomagraringenieur
Kalina Andreeva

geb.am 17.11.1973
in Burgas

Gutachter: Prof. Dr. habil. A. Graner
Prof. Dr. habil. W.E. Weber
PD Dr. habil. A. Börner

Verteidigung am: 16.01.2006

Halle/Saale 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000010379
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010379]

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung.....1

1.1 Die Wiesenrispe *Poa pratensis* L. als Nutzgras und genetisches Objekt.....1

1.2 Diversitätsanalyse mittels Marker.....3

1.3 Flow-cytometrischer Samen-Test.....10

1.4 Berechnung der morphologischen und genetischen Diversität und graphische Darstellung der Ergebnisse.....12

1.5 Populationsgenetische Methoden.....13

1.6 Ziel der Arbeit.....13

2 Material und Methoden.....15

2.1 Pflanzenmaterial.....15

2.2 Bonitur auf züchterisch-relevante Merkmale.....16

2.3 Molekulare Markeranalysen.....21

2.3.1 DNA-Extraktion und Quantifizierung.....21

2.3.2 AFLP-Analysen.....22

2.4 Durchflusszytometrie.....24

2.4.1 Ermittlung der Art der Samenbildung mittels durchflusszytometrischem Samentest.....25

2.4.2. Untersuchungen zur Bestimmung des Ploidiegrades.....28

2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse.....29

2.5.1 Morphologisch-phänotypische Daten.....29

2.5.2 Daten zur Art der Samenbildung.....29

2.5.3. Daten zur Ploidiestufe.....30

2.5.4 Molekulare Daten.....30

2.5.5 Korrelationen zwischen den Datensätzen.....30

3 Ergebnisse.....31

3.1 Feldversuche.....31

3.1.1 Morphologisch-phänotypische Diversität.....31

3.1.2 Umwelt 37

3.2 Ermittlung der Samenbildung 39

3.3 Ermittlung der Ploidiestufen 41

3.4 Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und morphologischen Merkmalen 44

3.5 AFLP-Untersuchungen bei *Poa pratensis* 45

3.5.1 Untersuchungen basierend auf *Poa pratensis*-Einzelpflanzen 47

3.5.2 Untersuchungen auf Herkunftsebene – Gendiversität innerhalb und zwischen den Ländern 48

3.5.3 Hierarchische Populationsstrukturen bei *Poa pratensis* 52

3.6 Zusammenhang zwischen AFLP- und morphologischen Daten 53

4 Diskussion 55

4.1 Morphologisch-phänotypische Feldevaluierungen der Primär- und Sekundäranlage 55

4.2 Einflüsse der Umwelt auf die Merkmalsausprägung 57

4.3 Ermittlung der Art der Samenbildung 58

4.4 Untersuchungen zur Ploidiestufe 60

4.5 Zusammenhang DNA-Gehalt - morphologisch-phänotypische Merkmale 61

4.6 AFLP-Untersuchungen bei der Wiesenrispe 62

4.6.1 Untersuchungen an *Poa pratensis*-Einzelpflanzen 63

4.6.2 Gendiversität innerhalb und zwischen den Ländern, Populationsstrukturen 63

4.7 Zusammenhang zwischen morphologisch-phänotypischen und AFLP-Daten 69

5 Zusammenfassung/Summary 72

5.1 Zusammenfassung 72

5.2 Summary 74

6 Literaturverzeichnis 76

7 Anhang 89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AMOVA	analysis of molecular variance
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
DAPI	4,6-diamino-2-phenolindol
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtripohosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N`,N`-tetraessigsäure
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute/ Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SNP	single nucleotide polymorphism
STS	sequence tagged site
SSR	simple sequence repeat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris, Borat, EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UPOV	Union for the protection of new varieties of plants

Abkürzungen der Länder (IPGRI, ISO 3166-1 Country Codes)

BEL	Belgien
CHE	Schweiz
CSK	Tschechoslowakei
DEU	Deutschland
DNK	Dänemark
ESP	Spanien
EST	Estland
FIN	Finnland
FRA	Frankreich
GBR	Großbritannien
GRL	Grönland
HRV	Bosnien-Herzegowina
HUN	Ungarn
ISL	Island
ITA	Italien
LTU	Litauen
MNG	Mongolei
NLD	Niederlande
NOR	Norwegen
POL	Polen
PRT	Portugal
ROM	Rumänien
RUS	Russland
SUN	Sowjetunion
SVK	Slowakische Republik
SVN	Slowenien
SWE	Schweden
TUR	Türkei
YUG	Jugoslawien

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: *Poa pratensis*-Herkünfte im generativen Stadium 16

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsanlage „Nachkommen-Diversität“ 19

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsanlage „Nachkommen-Umwelt“ ... 20

Abbildung 4: Aufbau eines Histogrammes: C-DNA-Gehalt im Embryo 26

Abbildung 5: Reproduktionswege bei *Poa pratensis*. 27

Abbildung 6: Durchflusszytometrische Auswertung des Ploidiegrades. 28

Abbildung 7: Hauptkomponenten-Analyse der 928 Akzessionen polnischer Herkunft 33

Abbildung 8: UPGMA-Phänogramme von 1583 europäischen *Poa pratensis*-Ökotypen, basierend auf der Auswertung von 24 morphologisch-phänotypischen Merkmalen. 34

Abbildung 9: UPGMA-Phänogramm der Nachkommenschaften von 504 europäischen *Poa pratensis*-Ökotypen, basierend auf der Auswertung von 26 morphologischen Merkmalen 35

Abbildung 11: Mit Hilfe des Durchflusszytometers festgestellte Reproduktionswege bei 110 *Poa pratensis*-Akzessionen verschiedener Herkunftsregionen mit Angabe der DNA-Gehalte im Embryo. 40

Abbildung 12: Verteilung der sechs Reproduktionstypen in 100 *Poa pratensis*-Herkünften in: A- Süd- und Mitteleuropa, B- Nordeuropa 41

Abbildung 13: Darstellung der relativen DNA-Gehalte bzw. -Ploidiestufen in den europäischen *Poa pratensis*-Herkünften 42

Abbildung 14: Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt der *Poa pratensis*-Akzessionen von Eltern- und Nachkommen-Generation. 42

Abbildung 15: Jaccard-Ähnlichkeiten zwischen den europäischen Genbankakzessionen (Ausschnitt aus dem Gesamtphänogramm). 47

Abbildung 16: Dreidimensionale Darstellung der genetischen Ähnlichkeiten zwischen 493 untersuchten Individuen, ermittelt mit fünf AFLP-Primerkombinationen .. 49

Abbildung 17: UPGMA-Phänogramm von nach Herkunft kombinierten *Poa pratensis*-Genotypen, basierend auf der genetischen Distanz nach Nei (1972) und Auswertung von fünf Primerkombinationen 50

Abbildung 18: Dreidimensionale Darstellung der nach Herkunftsländer kombinierten Genotypen, basierend auf der Rank-Correlation-Methode und Auswertung mit fünf Primerkombinationen 51

Tabellenverzeichnis

Tabelle. 1: Herkünfte und Anzahl der *Poa pratensis* Akzessionen nach Herkunftsländern und geographischen Regionen. 15

Tabelle 2: Zusammenfassung der bonitierten Merkmale. 17

Tabelle 3: Boniturschlüssel, verwendet beim Erfassen des Resistenzverhaltens. 17

Tabelle 4: Unterschiedliche Reproduktionswege nach Prodanovic et al. (2002). 27

Tabelle 5: Ergebnisse der Faktoranalyse für die Ausgangsakzessionen 32

Tabelle 7: GLM p-Werte unter Berücksichtigung aller geographischen Gebiete und aller erhobenen Merkmale bei *Poa pratensis* 39

Tabelle 8: Mittelwerte des DNA-Gehaltes der europäischen *Poa pratensis*-Akzessionen über zwei Generationen und 13 Herkunftsländer 43

Tabelle 9: Variationskoeffizienten des DNA-Gehaltes für die europäischen *Poa pratensis*-Akzessionen über 13 Herkunftsländer 44

Tabelle 10: Korrelation der phänotypischen Merkmale mit dem DNA-Gehalt 45

Tabelle 11: Anzahl und Größe der von den verwendeten PKs detektierten Fragmente. 46

Tabelle 12: Paarweiser Vergleich der Distanzmatrices der fünf analysierten Primerkombinationen. 46

Tabelle 13: Überblick über die Clusterung der zu den gleichen Akzessionen gehörigen Einzelpflanzen. 48

Tabelle 14: Gendiversität *h* nach Nei (1973) für *Poa pratensis*-Genotypen aus 16 Herkunftsländern. 49

Tabelle 15: Verteilung der molekularen Varianz für 466 *Poa pratensis*-Genotypen aus 14 Ländern und vier geographischen Großgebieten. 53

Tabelle 16: Anzahl der *Poa pratensis*-Akzessionen und Einzelpflanzen, welche morphologisch und molekulargenetisch untersucht wurden. 54

Tabelle 17: Manteltest-Korrelationen aus dem Vergleich der morphologisch-phänotypischen und molekulargenetischen Analysen, getrennt für die vier Evaluierungsstandorte. 54

1 Einleitung

Die Pflanzenzüchtung ist ein dynamisches Gebiet angewandter Wissenschaften und beruht auf der Auslese von Genotypen mit erwünschten Eigenschaften aus vorhandenen oder neu erstellten, variablen Populationen. Eine reiche Quelle solcher Eigenschaften stellt das Sammlungsmaterial der Genbanken dar. Zu Beginn der Gräserzüchtung waren solche Ökotypensammlungen das ausschließliche Ausgangsmaterial für die Züchtung einheimischer Futtergräser (Ktrings, 2000). In den meisten Fällen handelt es sich um Wildpopulationen und Ökotypen, die sich sehr variabel zeigen und somit neue Ressourcen für eine kontinuierliche, genetische Verbesserung der Kulturpflanzen bieten. Um in diesem Zusammenhang das Genbankmaterial optimal in Wert setzen zu können, sind detaillierte Charakterisierungen von großer Bedeutung.

1.1 Die Wiesenrispe *Poa pratensis* L. als Nutzgras und genetisches Objekt

Die Wiesenrispe (*Poa pratensis* L.) wird als Futtergras sowie als Rasengras für Sportrasenflächen, Park- und Golfanlagen genutzt (Bashaw & Funk, 1987). Verwendung findet sie auch bei der Verbesserung der Erdstruktur und Fruchtbarkeit von erodierten und gestörten Böden (Huff & Bara, 1993). Als formenreiche und sehr anpassungsfähige Art ist sie heute über die ganze Welt verbreitet (Soreng, 1990; Giussani, 2000), wobei Eurasien als Ursprungszentrum angenommen wird (Wedim & Huff, 1996; Gillespie & Bioles, 2001). Zu ihren wirtschaftlich wertvollen Eigenschaften zählen gute Winterhärte, Vielschnittverträglichkeit, Trittfestigkeit, Trockentoleranz und gute Narbenbildung. Die Art ist mehrjährig, hat eine langsame Entwicklung und wird erst ab dem zweiten Jahr voll leistungsfähig. Von Interesse bei der Züchtung der Wiesenrispe ist ihre sexuelle Fortpflanzungsweise zur Schaffung von Variabilität und damit zur Erzeugung von Ausgangsmaterial für den Selektionsprozess. Andererseits ist für die Erhaltungszüchtung die apomiktische Fortpflanzungsweise besonders beachtenswert, weil sie den betreffenden Zuchtstamm rein erhält (Albertini et al., 2001a). Apomixis kommt in mehr als 35 Pflanzenfamilien und in über 300 unterschiedlichen Spezies vor (Richards, 1986; Bashaw & Hanna, 1990) und ist ein System der asexuellen Samenentwicklung, bei dem die Pflanzen ohne Meiose und Befruchtung Embryonen erzeugen können. Sie ist weder mit einem Kernphasenwechsel noch mit einer Kern- oder einer Zellverschmelzung derjenigen Zellen verbunden (Rutishauser, 1967). Obligate Apomikten bilden Nachkommenschaften, die

morphologisch einheitlich und genetisch muttergleich sind. *Poa pratensis* ist ein aposporer, pseudogamer, fakultativer Apomikt (Müntzing, 1933; 1940; Tinney, 1940; Akerberg, 1943).
Botanisch gehört *Poa pratensis* zur Klasse der *Monocotyledoneae*, Unterklasse *Liliidaea*, Ordnung *Poales*, Familie *Poaceae* und Unterfamilie *Pooideae* (Strasburger et al., 1991). Anton & Connor (1995) beschreiben über 400 Arten in der Gattung *Poa*, die mehreren Sektionen angehören. *Poa pratensis* findet sich in der Sektion *Stoloniferae*. Sie ist Fremdbefruchter mit der Chromosomengrundzahl 7, wobei auch zwischen 2n = 18 und 150 Chromosomen beobachtet wurden (Matzk et al., 2005). In der Meiose wurden große Unregelmäßigkeiten festgestellt, welche starke Schwankungen im Ploidiegrad verursachen. Frühere Studien berichten, dass die Ausprägungen einiger Eigenschaften, z.B. Rostanfälligkeit, Samengewicht, Pollengröße und Grünmassegewicht in Beziehung zur Chromosomenzahl stehen (Akerberg et al., 1959). Clausen (1961) und Soreng (1990) erklären die Variabilität in der Chromosomenzahl als ein Resultat der Apomixis. Unter den Gräsern nimmt die Wiesenrispe aufgrund ihrer überwiegend apomiktischen Fortpflanzungsweise eine Sonderstellung ein.
Die Kontrolle und Nutzung der apomiktischen Samenbildung ist ein herausragendes Ziel der Pflanzenzüchtung und –produktion. Die wichtigsten Vorteile der Apomixis sind die Fixierung von Hybrideffekten, Vereinfachungen im Zuchtprozess und Ertragsstabilität unter ungünstigen Bestäubungsbedingungen. Im Vergleich mit der „Grünen Revolution“ wurde die Apomixis als „Asexuelle Revolution“ angekündigt (Galzada et al., 1996), von der möglicherweise noch größere Ertragszuwächse zu erwarten sind.
Die Übertragung von Apomixis aus Wildtypformen und eine mögliche Manipulation der Reproduktionswege hat in den letzten 30 Jahren große Aufmerksamkeit auf sich gezogen (Ozias-Akins et al., 1993; Hanna, 1995; Koltunow et al., 1995; Pessino et al., 1999; Ramulu et al., 1999; Savidan, 2000; Grossniklaus et al., 2001). Versuche zur Analyse und Induktion von Apomixis werden international sowohl an natürlich apomiktischen Arten (z. B. bei *Hieracium*, *Panicum*, *Paspalum*, *Tripsacum*, *Poa*, *Taraxacum*) als auch an sexuellen Arten (z.B. bei *Arabidopsis*, *Medicago*, *Petunia*, *Oryza*, *Triticum*) durchgeführt. Kartierungspopulationen wurden bei *Pennisetum squamulatum* und in Mais x *Tripsacum dactyloides*-Hybriden entwickelt, um die genetische Kontrolle der Apomixis zu erforschen (Ozias-Akins et al., 1993; Grimanelli et al., 1998). Drei Gene, die eine partielle autonome Endospermbildung verursachen - FIE (Ohad et al., 1996), FIS (Chaudhury et al., 1997a) und MEDEA (Grossniklaus et al., 1998) - wurden bereits isoliert. Die eigentlichen „Apomixis-Gene“ sind bisher jedoch noch nicht isoliert worden. Albertini et al. (2001b) berichteten, dass

mindestens vier Gene von dem sexuellen Elternteil und eines von dem apomiktischen Elternteil die Expression der Parthenogenese beeinflussen. Die Autoren stellen fest, dass Aposporie und Parthenogenese nicht gekoppelt sind und von zwei verschiedenen genetischen Faktoren kontrolliert werden. Ein neues Modell der genetischen Kontrolle der Apomixis beschrieben Matzk et al. (2005). Die Autoren stellten fest, dass die Apomixis von fünf Genen kontrolliert wird. Die Unterschiede in der Expression und Interaktionen zwischen diesen Genen sind für die große Variation in der Art der Samenbildung bei *Poa pratensis* verantwortlich.

Bei der Wiesenrispe sind eine Reihe von Zuchtzielen zu nennen. Eine Züchtung auf Rostresistenz ist notwendig, da der Rost in manchen Jahren sehr stark auftritt und Grünmasse- sowie Samenertrag reduziert. Die Beschleunigung der für *Poa pratensis* typischen, langsamen Jugendentwicklung wäre ein weiteres lohnendes Zuchtziel, sofern dadurch die Ausdauer nicht beeinträchtigt wird. Um diese Zuchtziele zu erreichen und um Material mit gewünschten Eigenschaften als Eltern in den entsprechenden Kreuzungen verwenden zu können, sind Merkmalsanalysen von Genbankmaterial notwendig.

Dabei ist die Kreuzungszüchtung beim fakultativen Apomikten *Poa pratensis* nur mit Schwierigkeiten anzuwenden. Wegen der komplizierten Befruchtungsverhälnisse kann nur mit Hilfe von Markergenen in der Nachkommenschaft nachgewiesen werden, ob die Kreuzung gelungen ist. In diesem Fall ist das Vorhandensein von für *Poa pratensis* spezifischen molekularen Markern von großem Vorteil; bisher sind jedoch nur sehr wenige molekulare Untersuchungen an dieser Grasart durchgeführt worden.

1.2 Diversitätsanalyse mittels Marker

Grundsätzlich zeichnet sich ein Marker durch eine stabile Vererbung und einen unterscheidbaren Phänotyp aus. Als Marker kommen sowohl vollständig ausgeprägte Eigenschaften morphologisch-phänotypischer Natur, als auch Unterschiede auf molekularer Ebene in Frage.

Bis in die siebziger Jahre wurden hauptsächlich morphologisch-phänotypische Marker als Maß für den genetischen Abstand eingesetzt. Diese sind monogen vererbte, am Phänotyp der Pflanze erkennbare spezifische Eigenschaften wie Wuchsform oder Krankheitsresistenz, die dominant bzw. rezessiv vererbt werden. Morphologische Marker bilden noch heute die Grundlage der systematischen Biologie, anhand derer die taxonomische Einordnung von Organismen erfolgt. Gleichfalls können mit Hilfe von morphologisch-phänotypischen

Markern Aussagen über evolutionäre Prozesse getroffen werden. So konnten Diederichsen & Hammer (1995) anhand einer Analyse von verschiedenen morphologischen Merkmalen eine Aussage über die Verwandtschaft des Kulturleins zu dem schmalblättrigen Flachs treffen. Untersuchungen zur morphologischen Variabilität erfolgten beispielsweise bei *Cyperus rotundus* L., wo Unterschiede zwischen Populationen von Ackerflächen und Feldwegen hinsichtlich der Blattlänge und -breite sowie des Blühbeginns festgestellt wurden (Chen & Thseng, 1990).

Bei der Wiesenrispe lassen die in der Literatur beschriebenen Versuche nur Teilaussagen zur morphologischen Variabilität zu. So wird einerseits die Variabilität umfassend und detailliert, aber nur an einer kleinen, eingeschränkten Materialgruppe analysiert. In anderen Fällen untersucht man die Variabilität nur an einzelnen Merkmalen von selektierten Genotypen, Populationen oder Sorten. Mazzucato et al. (1995) beschrieben zehn italienische *Poa pratensis*-Populationen im Vergleich zu drei Sorten, wobei sich die Populationen im Durchschnitt durch einen aufrechteren Wuchs, größere Pflanzen mit längeren und dünneren Blättern, ein früheres Rispenschieben, größere Rispen und höhere Anzahl von Blütenständen auszeichnen. Auch Ginzburg & Miroshnichenko (1997) untersuchten die Variabilität quantitativer Merkmale einer sibirischen *Poa pratensis*-Population und deren Nachkommen. Die Ergebnisse der statistischen Analyse von 28 Merkmalen zeigten u.a., dass die Variation des Samenertrages weniger von genetischen Komponenten abhängig ist als die von Samengröße und -form. Helgadottir & Snaydon (1986) untersuchten die Variabilität zwischen geographisch getrennten Populationen von *Poa pratensis* und *Agrostis capillaris*, die aus Großbritannien und Island stammen. Die phänotypischen Untersuchungen zeigten, dass bei fast allen gemessenen Parametern eine deutliche Variation vorliegt. Die größten Unterschiede ergaben sich dabei zwischen den Pflanzen der verschiedenen Klimaregionen, während zwischen Populationen, die aus Zuchtmaterial stammen (30-jährige Versuche), nur kleinere Differenzen auftreten. Auch die Größe der Variation ist nach diesen Untersuchungen an den einzelnen Standorten deutlich unterschiedlich: die isländischen Populationen variieren stärker als die britischen.

Die Bewertung der Diversität einer Akzession aufgrund rein morphologisch-phänotypischer Merkmale kann problematisch sein. Aufgrund der Reaktionsnorm des Genotyps können diese Merkmale in Abhängigkeit beispielsweise von Standortverhältnissen oder Jahreswitterung eine gewisse Schwankungsbreite aufweisen (Smith & Smith, 1989). Die Auswahl von quantitativen Eigenschaften ist schwierig, weil die Beziehung zwischen den beobachteten Eigenschaftswerten im Feld und der zugrunde liegenden genetischen Beschaffenheit nicht

unkompliziert ist. Quantitative Eigenschaften werden von vielen Genen kontrolliert, von denen jedes einzelne Gen nur einen kleinen Teil zur beobachteten Schwankung beiträgt. Das Vorkommen nur weniger Marker in einer Spezies ist ein in der Genomanalyse mit morphologischen Markern wesentliches Problem. Deshalb werden viele morphologisch-phänotypische Kriterien ausgewählt, um eine vollständige Differenzierung innerhalb einer Art zu ermöglichen. Nicht immer sind morphologische Marker mit agronomisch wichtigen Merkmalen korreliert und damit in der Pflanzenzüchtung anwendbar. Für die Evaluierung von Umwelteinflüssen oder epistatischen Effekten sind aufwendige Verfahren über mehrere Generationen nötig. Dazu kommt, dass viele morphologische Merkmale häufig erst in späteren Entwicklungsstadien bonitiert werden können. Deshalb ist die Verwendbarkeit von rein morphologischen Markern zur Analyse der genetischen Diversität nicht unumstritten. Zudem gibt es Befunde, welche anhand morphologischer Merkmale ermittelt wurden und nicht immer mit anderen Analysemethoden zu reproduzieren waren (Cross, 1992). Auch Genkarten mit morphologisch-phänotypischen Markern können daher nur mit einem großen experimentellen Aufwand erstellt werden und liegen nur für wenige Kulturpflanzen wie z.B. Tomate (Macarthur, 1934), Mais (Emerson et al., 1935) und Gerste (Von Wettstein Knowles, 1992) vor.

Wichtige Marker auf der physiologischen Ebene stellen die biochemischen Marker dar, welche auf Unterschieden in der Proteinstruktur basieren. Im Gegensatz zu morphologisch-phänotypischen rühren biochemische Marker unmittelbar von den Expressionsprodukten der Genloci her, wobei diese erhebliche Unterschiede aufweisen können. Eine eindeutige und vollständige Differenzierung der Genotypen ist jedoch aufgrund der limitierten Verfügbarkeit dieser Marker auch hier nur begrenzt möglich (Hsam et al., 1993).
Zu Beginn der 50er Jahre wurden die ersten Untersuchungen an Isoenzymen vorgenommen. Isoenzyme sind multiple, molekulare Formen eines Enzyms, die gleiche katalytische Aktivität zeigen. Die Vorteile der Isoenzymanalyse liegen in den geringen Laborkosten und der relativ raschen Analyse (Peakall et al., 1995b), wobei mehrere Loci gleichzeitig erfasst werden (Weising et al., 1995). Im Bereich der Futtergräser wurde die Isoenzymanalyse vor allem für die Identifizierung von Sorten bei *Poa pratensis* (Lin et al., 1984) und *Lolium sp*. (Ostergaard & Nielsen, 1981; Kennedy et al., 1985; Nielsen et al., 1985; Fernando et al., 1997; Bennett et al., 2002) eingesetzt. Daneben optimierte Eickmeyer (1994) die Techniken für Isoenzymmarker, so dass sie für Routinenuntersuchungen in der Gräserzüchtung verwendet werden können. Im Allgemeinen sind die Isoenzyme in der Diversitätsanalyse jedoch nur

begrenzt etabliert, da die genetische Variabilität aufgrund der beschränkten Zahl der durch die wenigen, bekannten Isoenzyme detektieren Loci unterschätzt wird (Clegg, 1989; Koller et al., 1993; Ronning et al., 1995) und nicht immer für das ganze Genom repräsentativ ist (Schaal et al., 1991). Ausserdem kann die Analyse der Izoenzymmuster bei polyploiden Arten wie *Poa pratensis* extrem kompliziert sein (Weising et al., 1995).

Mittels der Entwicklung und Anwendung von DNA-Markern stehen der modernen Züchtungsforschung inzwischen Methoden zur Verfügung, mit denen die angesprochenen Schwierigkeiten überwunden werden können. Prinzipiell stellt ein solcher genetischer Marker eine unterschiedliche Allel-Variante an einem DNA-Locus dar. Im direkten Vergleich zweier homozygoter Individuen äußert sich das Vorliegen von verschiedenen Allelen als Polymorphismus. Die Vorteile der molekularen Marker liegen darin, dass basierend auf Unterschieden in spezifischen DNA-Bereichen relativ einfach und schnell eine große Anzahl von Individuen untersucht werden kann. Darüber hinaus sind sie in allen Geweben unabhängig von Wachstum, Differenzierung, Entwicklung oder Stadium der Zellen zuverlässig nachweisbar. Sie sind unabhängig von Umweltbedingungen (Ovesná et al., 2002), da nicht die von den Genen codierten phänotypischen Merkmale, sondern die DNA selbst analysiert wird. Aufgrund der raschen Entwicklung molekularer Markersysteme existiert heute eine große Anzahl von Methoden, welche die Grundlage für die Identifizierung und Lokalisierung quantitativ bzw. qualitativ vererbter Eigenschaften bilden und somit einen wichtigen Beitrag zur Steigerung der Effizienz in Züchtungsprogrammen leisten können.

Der entscheidende Durchbruch für die Nutzung molekularer Marker geht auf die Arbeit von Botstein et al. (1980) zurück, in der sie die Erstellung einer Kopplungskarte für das menschliche Genom unter Einsatz einer DNA-Markerklasse beschrieben, die sie als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen bezeichneten. RFLPs – basierend auf der Detektion von bestimmten Zielsequenzen durch Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden - eignen sich als genetische Marker, da sie codominant exprimiert und stabil vererbt werden (Evola et al., 1986). Sie sind über das gesamte Genom gleichmäßig verteilt, wodurch eine hohe Genomabdeckung erzielt werden kann (Bernatzky & Tanksley, 1986). Jedoch ist die Technik nicht automatisierbar, so dass eine Anwendung in größerem Maßstab mit sehr hohem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist (Beckman & Soller, 1986; Bunce et al., 1986). Weitere Nachteile der RFLP-Technik sind die Erfassung relativ weniger Polymorphismen pro

Einzelreaktion (durchschnittlich 2-3; Hatz, 1997), in der Regel die Anwendung radioaktiver Isotope, sowie der Einsatz hoher DNA-Mengen.

Für die Bestimmung genetischer Diversität in Pflanzen-Populationen sowie für taxonomische Untersuchungen haben sich zunehmend weitere Markersysteme durchgesetzt, die auf der von Saiki et al. (1985) beschriebenen Polymerasekettenreaktion basieren (Übersicht PCR-gestützte Markertechniken in Karp et al., 1998; Bergmann & Leinemann, 2000; Sunnucks, 2000). Die PCR-Technik kann für die Erzeugung von DNA-Fingerabdrücken genutzt werden. Unter der Bezeichnung ‚DNA-Fingerprinting' werden heute alle Verfahren eingeordnet, die viele Genloci gleichzeitig erfassen.
Zur Bestimmung genetischer Variabilität fanden die RAPD-Technik (*random amplified polymorphic* DNA; Williams et al., 1990), Mikrosatelliten oder SSRs (*simple sequence repeats*; Tautz, 1989; Cregan, 1992) sowie AFLPs (*amplified fragment length polymorphisms*; Vos et al., 1995) die weiteste Verbreitung. Allen ist gemeinsam, dass mit Hilfe von einem bis zwei Primern Amplifikationsprodukte erzeugt werden, anhand derer polymorphe Sequenzbereiche detektiert werden können. Diese entstehen aufgrund von Punktmutationen innerhalb der Primerbindungsstellen, sowie durch chromosomale Umstrukturierungen. Dadurch variiert die Länge der Amplifikationsprodukte, und für jedes Individuum erscheinen spezifische Muster (Jeffreys et al., 1985).

Die RAPD-Analyse beruht darauf, dass bestimmte Bereiche unverdauter genomischer DNA mittels zufälliger Oligonukleotid-Primer in einer PCR als dominante Marker amplifiziert werden. Je nach verwendetem Primer werden bis zu 20 (und mehr) Fragmente erzeugt. Da die RAPD-Methode auf PCR-Basis arbeitet, ist die benötigte DNA-Menge im Vergleich zur RFLP-Analyse ca. 500-mal geringer. Die Detektion der amplifizierten Fragmente ist nach einer Auftrennung im Agarosegel möglich, so dass die Anwendung radioaktiver Isotope entfällt. Die Technik lässt sich teilweise automatisieren und erlaubt damit die Bearbeitung eines großen Probenumfangs. Aufgrund der höheren Anzahl an Markern, vor allem in Bereichen repetitiver DNA, detektieren RAPD-Untersuchungen mehr genetische Variation als Isoenzyme. Das berichten z. B. Studien im Bereich der Gräser (Sweeney & Danneberger, 1995 für die Charakterisierung von *Poa annua*-Populationen; Virk et al., 1995 für *Oryza sativa*; Fahima et al., 1999 für *Triticum turgidum*; Nebauer et al., 1999 für *Digitalis obscura*; Strelchenko et al., 1999 für *Hordeum vulgare*).

Mikrosatelliten-Marker, die auf unterschiedlich oft sich wiederholenden DNA–Sequenzmotiven von zwei bis fünf Basen Länge beruhen, sind in der Regel von nichtrepetitiven Randsequenzen flankiert (Tautz, 1989). Letztere sind hochkonservativ und können als Vorlage-Sequenz für spezifische PCR-Primerpaare genutzt werden, um einzelne Mikrosatelliten zu amplifizieren, deren Länge (bzw. die Anzahl der Wiederholungseinheiten) via Gelelektrophorese detektiert wird.
Grundsätzliche Vorteile der Mikrosatellitenmarker sind ihre codominante Vererbung, ihre Multiallelie und Locus-Spezifität; zudem werden relativ geringe Mengen an DNA benötigt. Die hohe allelische Diversität der über das gesamte Genom verteilten Wiederholungseinheiten (Weising et al., 1989; Zhao & Kochert, 1992; Saghai Maroof et al., 1994; Liu et al., 1996b) und deren großen Anzahl im Genom, sowie die gute Reproduzierbarkeit (Powell et al., 1997; Pillen et al., 2000) sind weitere wesentliche Vorteile. Beispiele für die Anwendung von Mikrosatellitenmarkern sind Fingerprint-Untersuchungen (Taramino & Tingey, 1996; Diwan & Cregan, 1997) oder markergestützte Selektion (Blair & McCouch, 1997). Die Anwendung der SSRs in der Populationsgenetik wird bei Bruford & Wayne (1993) und Jarne & Lagoda (1996) diskutiert. Über Untersuchungen zur genetischen Differenzierung nahe verwandter Genotypen mit Hilfe der SSR-Analyse berichten zahlreiche Studien bei Gerste (Struss & Plieske, 1988; Pillen et al., 2000; Russell et al., 2000) auch beim Deutschen Weidelgras, *Lolium perenne,* sind solche polymorphen Mikrosatelliten publiziert (Kubik et al., 1999; Jones et al., 2001; Kubik et al., 2001).

Die in der Regel dominanten AFLP-Marker kombinieren die Restriktionsanalyse mit der PCR-Technik (Vos et al., 1995) und haben sich im Bereich der Genomforschung bei Pflanzen sehr schnell etabliert. AFLPs bieten als hoch effektive Fingerprint-Methode die Möglichkeit, auch geringe genetische Variation zu detektieren. Der prinzipielle Ablauf besteht aus vier Einzelschritten: in einem ersten Schritt wird die genomische DNA mit zwei Restriktionsendonukleasen - eine selten (`six-base cutter´) und eine häufiger schneidend (`four-base cutter´) - behandelt. Allgemein gebräuchlich ist die Kombination *Eco*RI/*Mse*I. Zum Vermeiden der repetitiven Sequenzen, die u.a. in Pflanzen-Genomen häufig vorkommen, empfiehlt sich jedoch die Verwendung eines CPG-methylierungssensitiven Restriktionsenzyms, wie z.B. *Pst* I (Vuylsteke et al., 1999). Dies stützt sich zum einen auf die Beobachtung, dass repetitive DNA-Sequenzen einen höheren Methylierungsgrad aufweisen (Burr et al., 1988), bzw. im Umkehrschluß, dass nicht methylierte Anhäufungen von CG-Dinukleotiden oft mit Genen assoziiert sind (Antequera & Bird, 1988). Zum anderen stellten Gruenbaum et al. (1981) fest, dass in Pflanzen die Dinukleotidabfolge CG sowie die

Trinukleotide CAG und CTG zu über 80% 5-Methylcytosin enthalten.Waugh et al. (1997) wiesen auf den Nachteil hin, dass sich AFLPs, die mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI/*Mse*I erzeugt wurden, oft in den Centromer-Regionen anhäufen, wo stark methyliertes, inaktives Heterochromatin vorliegt und miterfasst wird. Entsprechend hoben Powell et al. (1997) diesen Nachteil auf, indem sie bei Gerste *Pst*I/*Mse*I-Primerkombinationen einsetzten, die mehr Polymorphismen als die *Eco*RI/*Mse*I-Primerkombinationen ergaben und eine gleichmäßigere Verteilung der Marker auf den Kopplungsgruppen zeigten.

An die entstandenen Restriktionsfragmente werden nun sogenannte Adapter gebunden. Diese dienen als Verlängerung der Schnittstellen und als spätere Bindungsstelle der Primer für die PCR. Eine erste Vorselektion der vielen verschiedenen Einzelfragmente liefert die Präamplifikation als dritter Schritt. Die abschließende zweite Amplifikation weist zwei bis vier zusätzliche, selektive Basen pro Primer auf, wobei die restliche Sequenz gleich der Sequenz der Primer im Präamplifikationsschritt ist. Auf diesem Weg entsteht eine Anzahl von ca. 50-100 Fragmenten, die mit Hilfe eines Polyacrylamidgeles aufgetrennt werden.

Die AFLP-Methodik verfügt über viele Vorteile. Die Möglichkeit, verschiedene Restriktionenzyme und selektive Primer auswählen und kombinieren zu können, verleiht der AFLP-Technik eine hohe Flexibilität. Dies erleichtert einerseits eine Optimierung der Methode für verschiedenste Organismen und Genomgrößen (Vos et al., 1995) und bietet andererseits eine fast unbegrenzte Menge an Kombinationsmöglichkeiten bei Untersuchungen. Der hohe Polymorphiegrad der AFLPs übertrifft andere Markersysteme und ermöglicht u.a. das Anreichern von Markern in den Chromosomenkarten, die Feinkartierung, Erstellung von Konsensus-Chromosomenkarten, aber auch die Durchführung von Verwandschaftsstudien (Prins et al., 2001; Srivastava et al., 2001). Weiterhin haben sich die AFLPs als geeignet für die Bestimmung des Umfangs der genetischen Diversität innerhalb und zwischen Populationen erwiesen (Travis et al., 1996; Ellis et al., 1997; Schönfeld, 1998; Caicedo et al., 1999; Palacios et al., 1999; Muluvi et al., 1999; Keiper & McConchie, 2000; Schmidt & Jensen, 2000; Van Der Merve et al., 2000; Renganayaki et al., 2001; Depres et al., 2002; Dodd et al., 2002; Schönswetter et al., 2002; Nybom, 2004). AFLPs treten genomweit auf und können in nahezu beliebiger Anzahl generiert werden.

Jones et al., (1997) überprüften AFLP-Muster in acht unterschiedlichen Labors. Bis auf eine fehlende Bande (von 172) stimmten die Muster vollständig überein. Über eine hohe Reproduzierbarkeit der AFLPs - zwischen 95 und 98 Prozent - berichten auch Savelkoul et al. (1999). Somit ist ihre Reproduzierbarkeit mit der der SSR-Marker vergleichbar; beide sind

den RAPDs deutlich überlegen, SSR-Primerpaare müssen aber für jede Pflanzenart bzw. –gattung neu entwickelt werden.
Um aus diesen Methoden die geeignetste für das jeweilige Objekt und Forschungsziel auszuwählen, müssen verschiedene Kriterien wie Informationsgehalt, Sensitivität sowie die Anwendbarkeit auf das zu untersuchende Objekt betrachtet werden. Außerdem tragen das Vorhandensein der notwendigen Ausstattung, der Grad der Automatisierung sowie die Höhe der anfallenden Kosten (Karp et al., 1997) zu einer Entscheidung bei. Zusätzlich spielen die Durchsatzhöhe und der Zeitaufwand eine Rolle. Unter Betrachtung aller dieser Gesichtspunkte wurde für die vorliegende Arbeit bei *Poa pratensis* das AFLP-Markersystem verwendet.

1.3 Flow-cytometrischer Samen-Test

Die Technik der Durchflusszytometrie (Flowcytometry, FCM) wurde bereits in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelt (Shapiro, 1995). Ihr Hauptanwendungsgebiet lag über mehrere Jahrzehnte im medizinischen Bereich, wo sie insbesondere in der Tumordiagnostik eingesetzt wurde. Seit Anfang der 80er Jahre wird dieses Verfahren zunehmend auch zur Analyse pflanzlichen Materials genutzt. Im Bereich der Pflanzenforschung und Saatgutproduktion liegt der Schwerpunkt auf der Bestimmung des DNA-Gehaltes von Zellen zur Ploidie-, Zellzyklus- und Genomgrößen-Analyse (Dolezel, 1997).
Bisher konnten apomiktische oder sexuelle Pflanzen nur anhand aufwendiger Verfahren, wie morphologische Nachkommenschaftsanalyse und traditionelle Embryosackklassifizierung ermittelt werden. Um aber möglichst früh und schnell bei Pflanzen Aufschlüsse über die Art ihrer Reproduktion zu bekommen, sind effiziente Screening-Methoden notwendig (Matzk et al., 1997). Am IPK wurde mit dem FCSS (*flow cytometric seed screen*, Matzk et al., 2000) eine effiziente Screeningsmethode nach dem Prinzip der Flowcytometrie entwickelt, die umfangreiche Rückschlüsse auf den Kernphasen- und Generationswechsel bei Pflanzen zulässt. Sie ist einsetzbar bei einer Vielzahl sowohl mono- wie auch dikotyledoner Arten. Mit Hilfe dieser Technik können in reifen Samen Unterschiede zwischen dem DNA-Gehalt des Endosperms und des Embryos erfasst werden. Diese lassen detaillierte Rückschlüsse auf die Art der Reproduktion zu, wodurch eine sichere und effiziente Analyse der Apomixis und ihrer Teilkomponenten möglich ist (Matzk et al., 2000).
Je nachdem, ob die Embryosäcke reduziert oder unreduziert vorliegen, oder ob die Eizelle und/oder die Polkerne durch reduzierte oder unreduzierte männliche Gameten befruchtet

wurden, resultieren unterschiedliche DNA-Gehalte im Embryo und Endosperm. Diese können durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Basierend auf dem DNA-Gehalt im Embryo und Endosperm können rein sexuelle, als auch obligat apomiktische und fakultativ apomiktische Individuen unterschieden werden. Der große Vorteil des FCSS liegt in der simultanen Erfassung der Einzelkomponenten Apomeiose, Parthenogenese und Pseudogamie. Die Methode erfordert keine spezifischen Modellsysteme, wie z.B. spezifische Marker, und ist daher bei jeder beliebigen Mutanten- oder anderen Kollektion anwendbar. Durch FCSS können z.B. die Mutanten *FIE*, *FIS* und *MEDEA*, die eine autonome Endospermentwicklung aufweisen (Chaudhury et al., 1997b; Grossniklaus et al., 1998; Ohad et al., 1999), vom Wildtyp unterschieden werden (Matzk et al., 2000).

FCSS beruht auf reifen Samen, die kein teilungsaktives Gewebe in Embryo und Endosperm aufweisen; dies ist für den Nachweis der Apomixis mittels dieser Technik entscheidend. Zur Bestimmung der Art der Samenbildung bei apomiktischen Arten wie *Taraxacum officinale*, die eine obligat autonome Embryoentwicklung aufweist (Falque et al., 1998), sowie bei dem fakultativen Apomikt *Hieracium piosella* (Koltunow et al., 1998) wurde FCSS angewandt. Der durchflusszytometrische Samenscreen kann auch für Untersuchungen an sexuellen Arten verwendet werden, die als Objekte für die Übertragung der Apomixis interessant sind, z. B. *Beta vulgaris* (Maletskii & Maletskaya, 1996), *Oryza sativa* (Liu et al., 1996a), *Zea mays* (Kindinger et al., 1996) und *Medicago sativa* (Barcaccia et al., 1997b).

Frühere Studien beschrieben die Durchflusszytometrie als genaue und reproduzierbare Methode zur Bestimmung des 2C-DNA-Gehaltes der Zellkerne (Galbraith et al., 1983; Arumuganathan & Earle, 1991b; Costich et al., 1991). Der durchflusszytometrisch bestimmte DNA-Gehalt korrelierte mit den mikrodensiometrisch ermittelten Werten (Michaelson et al., 1991). Als einfache und gut geeignete Technik (Heslop-Harrison, 1995) hat sich die Durchflusszytometrie schnell im Bereich der Kulturpflanzen durchgesetzt. Über eine erfolgreiche Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels Durchflusszytometrie berichteten Arumuganathan & Earle (1991a) bei mehr als 100 Kulturpflanzenarten. Auch Studien im Bereich der Gräser berichten über eine erfolgreiche durchflusszytometrische Bestimmung der Ploidiestufen (Keeler et al., 1987; Riordan et al., 1998). Bei *Hosta*-Sorten berichten Zoneweld & Van Iren (2000) über die Bestimmung des relativen DNA-Gehaltes durch Vergleich mit einer Sorte, deren Ploidie bekannt ist.

Als fakultativer, aposporer und pseudogamer Apomikt wird *Poa pratensis* als Modell für genetische Analyse und Manipulation der Apomixis verwendet (Matzk, 1991; Matzk et al., 1997; Barcaccia et al., 1997a). Wie von Matzk et. al. (2005) gezeigt, ist FCSS für diese

Grasart gut geeignet, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung der Art der Samenbildung und des DNA-Gehaltes durchgeführt wurden.

1.4 Berechnung der morphologischen und genetischen Diversität und graphische Darstellung der Ergebnisse

Für die Erfassung der genetischen Diversität von Genbankmaterial wurden zunächst anhand von phänotypischen Merkmalen bzw. AFLP-Markern Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Akzessionen erfasst. Am einfachsten lassen sich diese Unterschiede in Form von binären Variablen beschreiben. Dabei können diese Variablen nur zwei Zustandswerte annehmen (1= Eigenschaft vorhanden, 0= Eigenschaft fehlt). Im Vergleich zweier Individuen ergeben sich vier mögliche Kombinationen:, 1-1 (die Eigenschaft ist bei beiden Individuen vorhanden), 1-0 (die Eigenschaft ist bei Individuum 1 vorhanden, fehlt aber bei Individuum 2.), 0-1 (die Eigenschaft fehlt bei Individuum 1, ist aber bei Individuum 2 vorhanden) und 0-0 (die Eigenschaft fehlt bei beiden Individuen).

Für die Berechnung der Ähnlichkeiten bzw. Distanzen existieren eine Reihe von Methoden, die sich im Prinzip nur durch eine unterschiedliche Gewichtung der einzelnen o.g. Kombinationen unterscheiden. Zu diesen zählen die Berechnung des `Simple-Matching-Koeffizienten`, des Koeffizienten nach Jaccard (1908), nach Sokal & Sneath (1963) sowie nach Dice (1945). Link et al. (1995) empfehlen den Ähnlichkeitskoeffizienten nach Jaccard für die Analyse von dominanten Markerdaten. Dieser Koeffizient bestimmt Ähnlichkeiten mittels gemeinsamen Vorhandenseins der Eigenschaften. Das gemeinsame Fehlen einer Eigenschaft wird nicht mit in die Berechnung einbezogen. Eine genaue Darstellung der einzelnen Formeln sowie deren Ableitung und Hinweise zur Anwendung beschrieben Mucha (1992) und Backhaus et al. (1996).

Mittels der Hauptkoordinatenanalyse kann die in der Distanz- oder Ähnlichkeitsmatrix enthaltene Information auf wenige Dimensionen reduziert und graphisch dargestellt werden. Dabei werden die Genotypen im zweidimensionalen Raum so positioniert, dass der Abstand zwischen zwei Genotypen proportional zu ihrer genetischen Distanz ist. Auf diese Weise können Beziehungen zwischen den verschiedenen Genotypen verdeutlicht werden.

Eine andere Möglichkeit zur Berechnung der Beziehungen zwischen mehreren Genotypen ist die Clusteranalyse und die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse in einem eindimensionalen Phänogramm. Die Clusteranalyse bildet Unterklassen von Einzelgenotypen mit ähnlicher Distanz. Danach werden ähnliche Unterklassen zu neuen größeren Klassen

vereinigt. Das Phänogramm gibt den Prozess dieser Hierarchiebildung wieder. Es existieren mehrere mathematische Ansätze zur Clusteranalyse, die sich nach der Klassifikationsmethode, d.h. nach den Formeln zur Berechnung der Abstände zwischen den Klassen unterscheiden. Verwandtschaftsanalysen auf der Basis molekularer Marker werden in der Regel nach der Average-Linkage-Methode durchgeführt, häufig auch als UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average,* Sneath & Sokal, 1973) bezeichnet. Sie beruht auf der Bestimmung des Abstandes zwischen zwei Klassen aufgrund des Mittelwertes aller paarweiser Distanzen der Fälle innerhalb der Klasse und wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Weitere Berechnungsmethoden, auf die nicht näher eingegangen werden soll, sind die Single-Linkage-Methode, die Methode nach Ward, sowie die Complete Linkage-Methode.

1.5 Populationsgenetische Methoden

Um die Gesamtvariabilität anteilig den einzelnen hierarchischen Einheiten zuordnen zu können – wie es bei einer Analyse der molekularen Varianz mit dem Ziel der Unterteilung der genetischen Populationsstruktur notwendig ist – entwickelten Excoffier et al. (1992) die AMOVA-Methode (*Analysis of molecular Variance*). Hierbei unterteilt eine hierarchische Analyse der Varianz die Gesamtvarianz in Varianzkomponenten, welche z.B. durch Individuen-, Populations- oder Herkunftsunterschiede verursacht werden. Durch vorherige Definition von Populationsgruppen wird eine genetische Struktur definiert, die zu Überprüfung ansteht, und via Permutationen werden die Signifikanz-Niveaus berechnet.
Soll hingegen z.B. der Einfluss der Fundorte oder geographischen Herkunftsregionen auf die Ausprägung der Pflanzenmerkmale untersucht werden, kann mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA) ein parametrischer Test für Mittelwertunterschiede einer Variablen zwischen mehreren Gruppen durchgeführt werden. Dabei vergleicht man die Variabilität innerhalb und zwischen den Gruppen und wird überprüft, ob ein signifikanter Gruppenunterschied besteht.

1.6 Ziel der Arbeit

Die Gräserzüchtung nutzte in den letzten Jahrzehnten überwiegend adaptiertes Material zur Erhaltung und Verbesserung der Qualitätseigenschaften, wodurch die genetische Diversität deutlich eingeschränkt wurde. Somit zwang die Notwendigkeit, neue Resistenzen und

Qualitäten in das bestehende Zuchtmaterial einzubringen, zu einem Rückgriff auf Primitiv- bzw. Wildmaterial z.B. aus Genbanken. Die Sammlung der Genbank des IPK Gatersleben, Außenstelle Nord/Malchow umfasst mehr als etwa 800 *Poa pratensis* Akzessionen. Diese wurde um mehr als 1500 Akzessionen aus anderen Genbanken für diese Arbeit ergänzt, welche aus einer Vielzahl von europäischen Ländern stammen. Um diese „Ökotypen" zu bewahren und langfristig zu sichern, ist es unter anderem sinnvoll, ihren Wert als Ausgangsmaterial für die Züchtung zu erkennen. Das ist aber nur möglich, wenn die Evaluierung nach landwirtschaftlich bedeutsamen Merkmalen erfolgt und entsprechendes Material in Kreuzungsprogramme einheimischer Futterpflanzenzüchter einbezogen wird (Dambroth, 1986; Walther et al., 1997); bisher lagen keine bzw. nicht sehr umfassende Evaluierungsdaten zu diesem Material vor.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war somit die Untersuchung der morphologischen und phänologischen Variabilität der europäischen Sammel-Herkünfte der Genbanken. Dazu wurden Parameter wie Massenbildung, Haupttriebdichte, Pflanzenhöhe, Zeitpunkt des Rispenschiebens, Nachwuchs nach Schnitt etc. erhoben und analysiert.
Weiterer Schwerpunkt war die Anwendung der AFLP-Technik an *Poa pratensis,* um so eine molekulare, umweltunabhängige Erfassung der Variabilität innerhalb der und zwischen den europäischen *Poa pratensis*-Herkünften zu ermöglichen, was wiederum eine genauere Charakterisierung des Genbankmaterials sowie eine sichere Unterscheidung der Genotypen erlaubt.
Schließlich war die zytologische Charakterisierung des Genbankmaterials bezüglich DNA-Gehalt und des Reproduktionsmodus' ein drittes Ziel.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine komplexe Analyse der Art *Poa pratensis* erstellt, bei der morphologische, molekulare und zytologische Untersuchungsergebnisse miteinander verknüpft werden sollten. Die meisten Analysen in dieser Studie wurden an jeweils zwei Generationen durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse können von den Gräserzüchtern direkt zur Auswahl interessanter und als Kreuzungseltern geeigneter Genotypen genutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten 1640 meist europäische *Poa pratensis*-Herkünfte, die von verschiedenen Genbanken weltweit zur Verfügung gestellt worden waren. Neben den europäischen Akzessionen wurden noch zusätzlich für Vergleichszwecke auch in Grönland, in der Mongolei und im asiatischen Teil Russlands gesammelte Akzessionen herangezogen. In den meisten Fällen handelt es sich um Material, das von Genbanken mittels organisierter Sammlungsreisen sowohl auf intensiv als auch extensiv bewirtschafteten Grünlandstandorten zusammengetragen wurde. Auf dem jeweiligen Standort wurden repräsentative Samenproben von verschiedenen Einzelpflanzen mit arttypischen Merkmalen gesammelt. Die zu einer Art gehörigen Samen bilden eine Sammelnummer/Akzession, d.h. jede Sammelnummer umfasst verschiedene, für den beprobten Standort typische *Poa*-Genotypen. Tabelle 1 zeigt die Verteilung nach Herkunftsregion sowie die Anzahl der im gesamten Projekt bearbeiteten Wiesenrispenakzessionen pro Land; diese lagen zwischen einer (Türkei, Portugal, Italien) und 928 (Polen) Akzessionen.

Tabelle. 1: Herkünfte und Anzahl der *Poa pratensis* Akzessionen nach Herkunftsländern und geographischen Regionen.

Herkunftsland	**Anzahl Akz.**
Mitteleuropa	
BEL	2
CSK	25
DEU	116
DNK	43
NLD	50
POL	928
Nordeuropa	
EST	3
FIN	4
GBR	3
ISL	50
LTU	43
NOR	57
RUS	48
SWE	41

Herkunftsland	**Anzahl Akz.**
Südeuropa	
CHE	20
ESP	7
FRA	14
HUN	83
ITA	1
PRT	1
ROM	5
SVN	12
TUR	1
YUG	9
außereuropäisch	
GRL	24
MNG	30
SUN	20
Insgesamt	**1640**

2.2 Bonitur auf züchterisch-relevante Merkmale

In den Jahren 2000-2001 erfolgte eine erste Evaluierung der 1640 *Poa pratensis*-Akzessionen an insgesamt vier Standorten. Die DSV (Boldeburg) evaluierte 400 Akzessionen, die NPZ (Malchow) 300, Saatzucht Steinach (Bornhof) 400 und die Außenstelle Malchow der Genbank des IPK Gatersleben 540 Akzessionen. Von jeder Akzession wurden im März 2000 10 Einzelpflanzen unter Gewächshausbedingungen angezogen. Nach 7-8 Wochen wurden die Jungpflanzen ins Feld gepflanzt. Der Versuch wurde als Blockanlage mit jeweils 10 Einzelpflanzen pro Akzession durchgeführt. Jede Akzessionsparzelle war zweireihig mit einem Einzelpflanzenabstand von 75 cm (Abb.1).

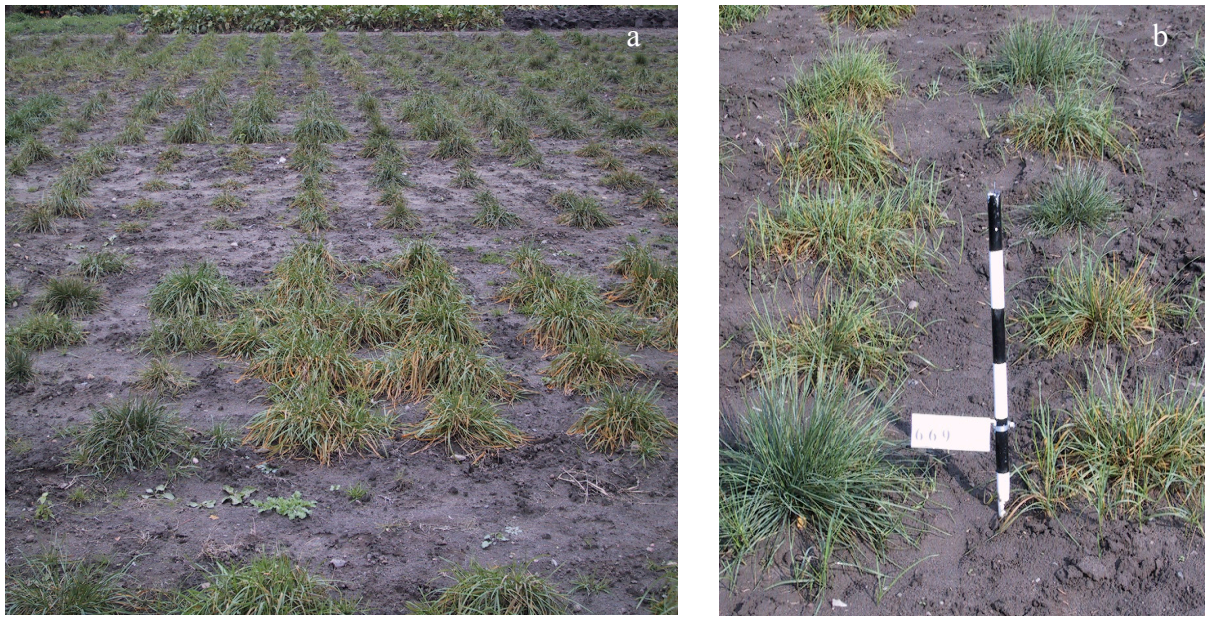


Abbildung 1: *Poa pratensis*-Herkünfte im generativen Stadium: a) Blockanlage und b) Akzessionsparzelle.

Der Boniturzeitraum erstreckte sich über zwei volle Nutzungsjahre, in denen das gesamte Sammlungsmaterial bezüglich 24-27 Merkmale (je nach Standort) bewertet wurde. Bei der Auswahl der Boniturmerkmale wurden die IPGRI-Deskriptoren für Futterpflanzen (Tyler et al., 1985) zugrunde gelegt und mit den für Züchter interessanten Merkmalen vervollständigt. Eine Zusammenfassung der evaluierten Wuchs-, Blatt- und Rispenmerkmale zeigt Tabelle. 2.

Die Sorten `Limousine`, ´Barentin` und `Lato` dienten als Standard für die Bonitur und wurden am Anfang und am Ende der Versuchsanlage sowie nach jeder 100. Akzession

Tabelle 2: Zusammenfassung der bonitierten Merkmale: d-Merkmale nach Deskriptorenliste; z- von Züchtern ausgewählte Merkmale.

Vegetative Merkmale	**Generative Merkmale**
Wuchstyp_d Blattbreite_d Blattfarbe_z Homogenität der 10 EP im vegetativen Stadium_z Masse_d Pflanzendichte_z Ausläuferbildung (-länge und –breite)_z Stand vor Winter (2000 u. 2001)_z Stand nach Winter (2001 u. 2002)_z Frühjahrswachstum_z Massenbildung_d Nachwuchs nach Schnitt_z	Homogenität der 10 EP im generativen Stadium_d Rispenschieben_d Höhe nach Blüte_z
	Krankheitsbefall
	Rost (2000 u. 2001)_d Mehltau (2000 u. 2001)_d Sonstige_d

gepflanzt. Für alle Merkmalsbonituren bis auf Rispenschieben wurde eine neunstufige Boniturskala nach UPOV verwendet (UPOV, 1986). Die Bonitur einer Akzession spiegelte den Durchschnitt über alle 10 Einzelpflanzen wider. Folgender Boniturschlüssel fand Verwendung bei der Bonitur von Krankheiten (Tab. 3).

Tabelle 3: Boniturschlüssel, verwendet beim Erfassen des Resistenzverhaltens.

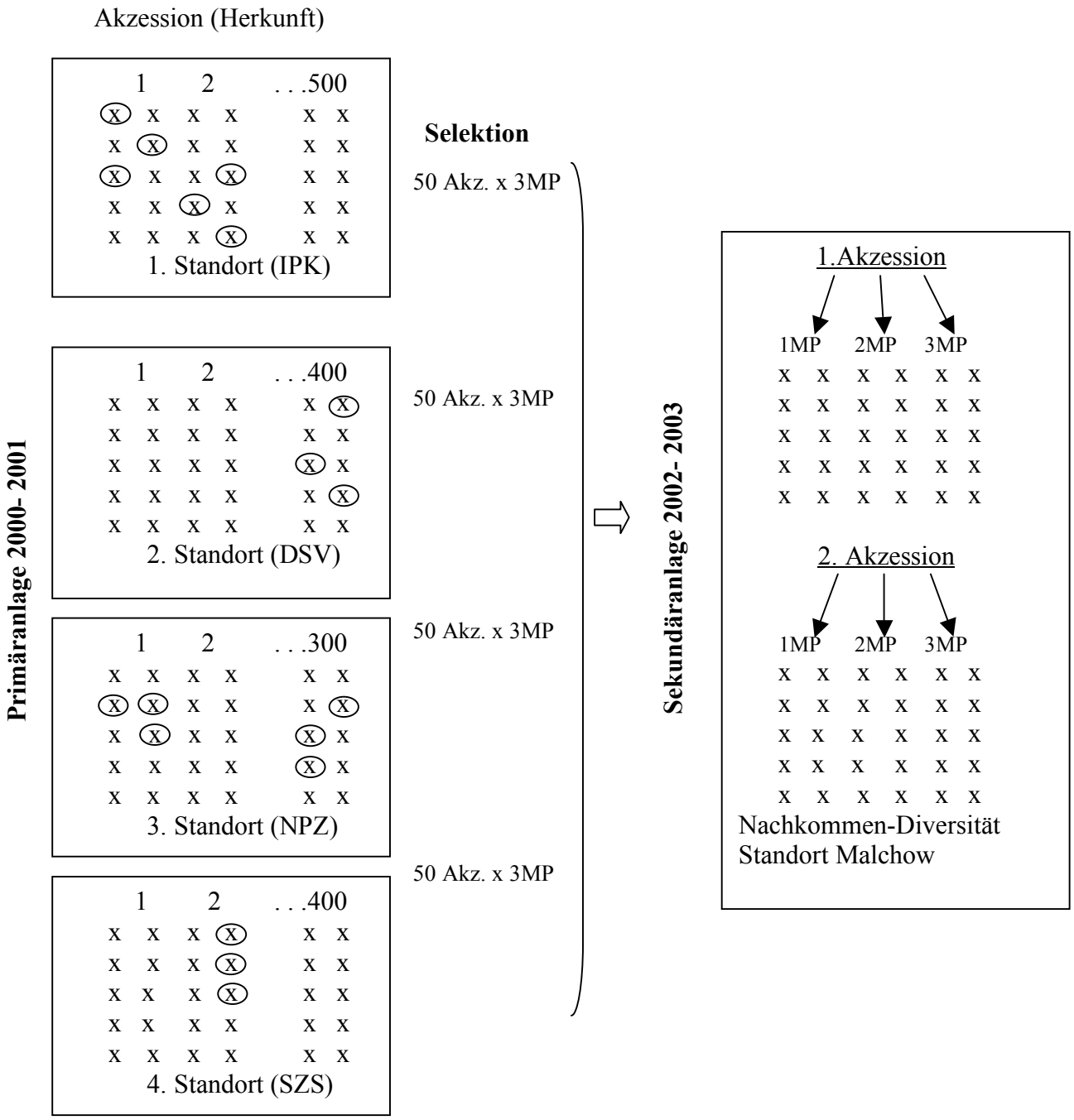
Merkmalsausprägungen	**Boniturnote**
sehr stark	9
stark bis sehr stark	8
stark	7
mittel bis stark	6
mittel	5
gering bis mittel	4
gering	3
ohne bis gering	2
ohne	1

Auch bei den restlichen Merkmalen wurde immer das Maximum der Merkmalausprägung mit einer 9 und das Minimum mit einer 1 bewertet. Weiterhin wurden die genauen Termine des Rispenschiebens in Form der Anzahl der Tage nach dem 1. April festgehalten. Der Zeitpunkt

des Rispenschiebens wurde als erreicht betrachtet, wenn mindestens bei der Hälfte der Pflanzen einer Akzession die erste Rispenspitze erkennbar war.
Alle Genotypen wurden für die Dokumentation in ihrem vegetativen und generativen Stadium fotografiert.
Während der Vegetation wurden an jedem der vier Standorte 50 Akzessionen mit jeweils drei Mutterpflanzen selektiert (Abb.2). In die Selektion wurden sowohl homogene als auch heterogene Akzessionen aus verschiedenen Herkünften einbezogen, um die morphologische Variabilität in dem europäischen Wiesenrispenmaterial zu erfassen. Im Sommer 2001 erfolgte die Ernte, wobei die Samen der selektierten drei Mutterpflanzen getrennt aufbereitet und bei -15°C gelagert wurden. Alle selektierten Mutterpflanzen wurden verklont und in der Sekundäranlage 2002/03 (als Vergleich) zusammen mit den Nachkommenschaften weiter evaluiert.
Um die phänotypische Merkmalskonstanz über Generationen feststellen zu können, erfolgte eine Sekundärevaluierung selektierter Akzessionen aus verschiedenen Generationsstufen. Dazu wurden im Frühjahr 2002 vom Erntegut der Versuchsjahre 2000-2001 Nachkommenschaften unter Gewächshausbedingungen angezogen. Im Juni 2002 wurden die heranwachsenden Pflanzen in eine Sekundäranlage in Malchow ausgepflanzt. Je Akzession standen drei Mutterpflanzen mit je 10 Nachkommen in der Prüfung. Dieser Teil des Feldversuches wird im weiteren als „Nachkommen-Diversität“ bezeichnet.

Die Klone der selektierten 50 Akzessionen am Standort Malchow wurden zusätzlich an den Standorten Løken (Norwegen), Steinach (Deutschland) und Elvas (Portugal) vermehrt (Abb.3). Die dort geernteten Samen wurden an das IPK zurückgeschickt, im Gewächshaus vorgezogen und in eine neue Versuchsanlage gepflanzt. Jeweils 30 Einzelpflanzen einer Akzession wurden nebeneinander gepflanzt, um den Vergleich beim Bonitieren zu vereinfachen.

Auch hier wurden am Anfang, am Ende der Versuchsanlage sowie nach jeder 100. Akzession die Standardsorten verwendet. Dieser Feldversuch wird im weiteren als „Nachkommen-Umwelt" bezeichnet. Das Experiment diente zur Schätzung des Einflusses der Umwelt auf die phänotypische Varianz in dem geprüften Material.



x = aus Samen angezogene Einzelpflanzen;
(x) = für weitere Vermehrung selektierte Mutterpflanzen;
MP = via Klonteile erhaltene Mutterpflanzen.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsanlage „Nachkommen-Diversität“

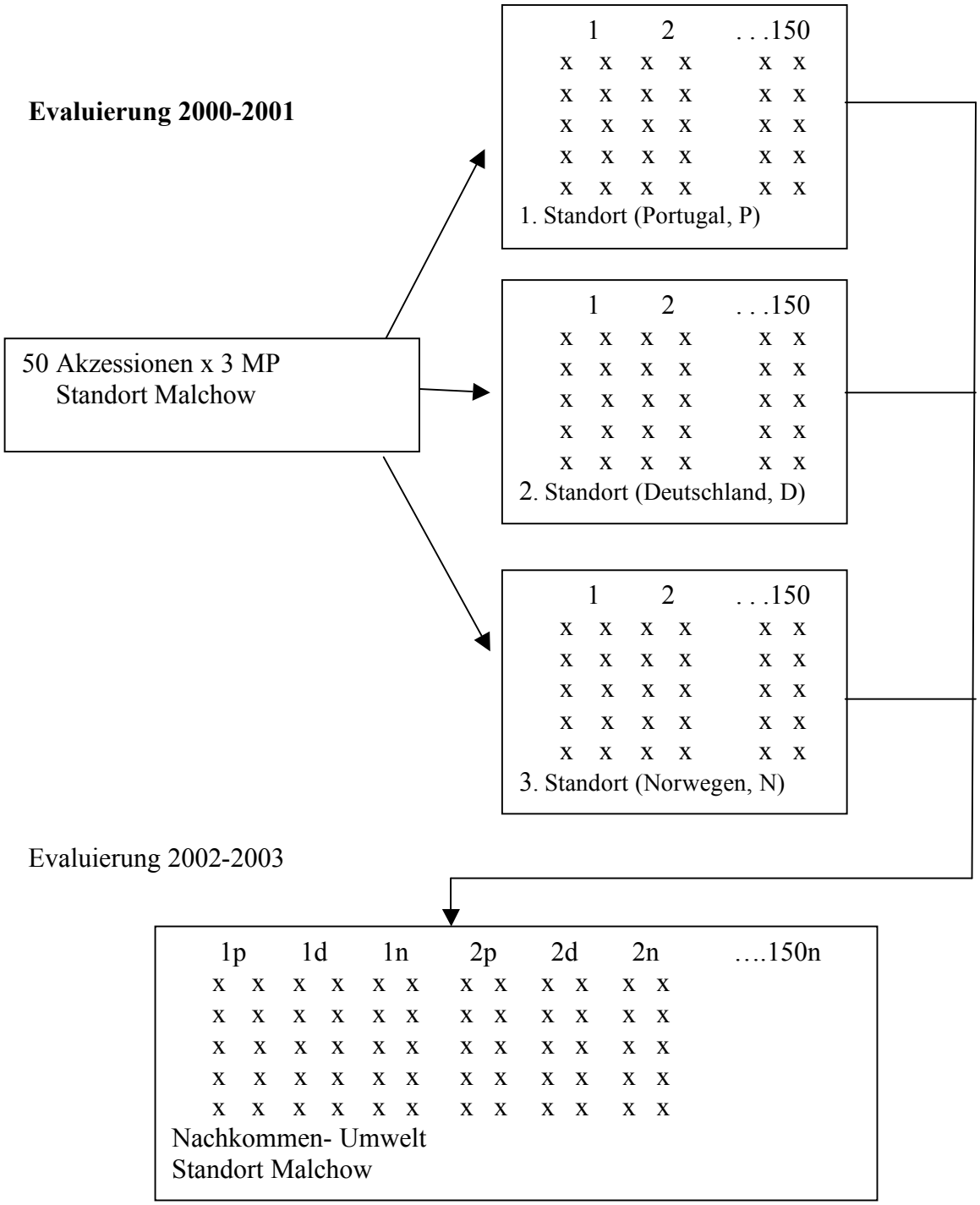


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsanlage „Nachkommen-Umwelt“.

2.3 Molekulare Markeranalysen

2.3.1 DNA-Extraktion und Quantifizierung

Im September 2001 wurden an allen 4 Standorten Klone von allen selektierten Mutterpflanzen der Primäranlage entnommen, in Paletten gepflanzt und unter Gewächshausbedingungen am IPK in Gatersleben erhalten. Nach ca. zwei Wochen wurden die Gräser zurückgeschnitten, um die Bildung von frischem Blattmaterial zu fördern. Von jeder ca. vier Wochen alten Mutterpflanze wurden 50-100 mg junges Blattmaterial entnommen und in 1 ml Röhrchen (*collection tubes*; Mikrotiterplattenformat) überführt. In jedes Röhrchen wurden eins oder zwei Metallkugeln verteilt, um das spätere Mahlen des Materials zu vereinfachen. Die geerntete Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80° C gelagert. Im Oktober/November 2002 erfolgte die Blattentnahme der Nachkommenschaften. Je nach Homo-/Heterogenität innerhalb der 10 Einzelpflanzen wurden sowohl Misch-, als auch Einzelproben geerntet.

Vor der DNA-Extraktion erfolgte das Mahlen der Blätter in der Retsch-Schwingmühle (MM 300, Retsch, Düsseldorf). Die Mahlzeiten betrugen je nach Bedarf 1x-3x 2 min, bis das Material fein genug gemahlen war. Um ein Auftauen zu vermeiden, wurden die Proben zwischen den Mahlvorgängen immer in flüssigen Stickstoff gekühlt.

Die DNA wurde nach Doyle und Doyle (1990) mit einigen Modifikationen im Mikrotiterplattenformat extrahiert. Das gefrorene, gemahlene Blatmaterial wurde in 450 µl Extraktionspuffer in Suspension gebracht und 20-30 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde 430 µl CIA-Lösung (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1) zugegeben und die gesamte Suspension 5 min durch leichtes Schwenken gemischt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation der Proben (10 min bei 6000 rpm und 8°C; Zentrifuge 4K15, Sigma, Osterode). Der Überstand wurde abgenommen, ein zweites mal mit 380µl CIA-Lösung pro Probe versetzt, gemischt und abzentrifugiert. Die letzten beiden Schritte wurden je nach Reinheit des Überstands maximal zweimal wiederholt. Dann wurden 45µl eines 6:5 Mixes von 3 M NaOAc/pH 5,5 und 10 M NH_4OAc in einer neuen Collection tube-Platte mit Hilfe eines Pipetierroboters (MultiPROBE II EX, Packard, Rodgau-Jügensheim) vorgelegt. In diese wurden 380 µl des chloroform-gereinigten Überstandes überführt, und durch 260 µl kalten 2-Propanol erfolgte die Fällung der DNA. Diese wurde abzentrufugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 µl Waschpuffer (70% Ethanol, 10 mM NH_4OAc) mindestens 1x 10 min gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 4500 rpm) wurde der Überstand komplett entfernt und das DNA-Pellet bei 45°C im Heizblock kurz getrocknet. Die

DNA wurde mit 100µl RNaseA-Mix (pro Collection tube-Platte 20ml TE und 400 µl RnaseA (5mg/ml)) pro Probe für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Stunden Schütteln auf dem Thermomixer (MTP, Eppendorf, Hamburg) bei 45° war die extrahierte DNA vollständig gelöst. Mittels einprozentigen, Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gelen konnte die DNA-Konzentration geschätzt werden. Die nach diesem Protokoll isolierte DNA lag in einer für AFLP-Analysen sehr geeigenten Qualität vor; die Quantität war mehr als ausreichend.

Die exakte DNA-Konzentration wurde fluorometrisch bestimmt. Dafür wurde eine 1:5 DNA-Verdünnung verwendet (8 µl DNA-Lösung und 32 µl TE (s.Anhang, A1); erstellt mittels Pipetierroboter). Zu den 10µl der verdünnten Proben wurden jeweils 90 µl 1 x TNE- Puffer (s. Anhang, A2) und 110 µl Hoechst-Farbstofflösung (13 ml 1 x TNE und 4.5 µl Hoechst 33258) versetzt. Zweimal 100 µl je Probe wurden in eine black well-Platte transferiert (Greiner, Frickenhausen) und in einem Fluorometer gemessen (FLx800, Bio-TEK, Bad Friedrichshall). An Hand von sieben Lambda-DNA-Mengenstandards (Konzentrationen 800 ng/µl, 400 ng/µl, 200 ng/µl, 100 ng/µl, 50 ng/µl, 25 ng/µl, 5 ng/µl) und einer Nullprobe wurde eine Eichkurve erstellt, die als Standard beim Messen diente.

Der verwendete Hoechst 33258-Farbestoff interagiert hoch spezifisch mit doppelsträngiger DNA und bindet kaum an RNA, weshalb etwaige RNA-Verunreinigungen keine Auswirkung auf die DNA-Quantifizierung hätten; außerdem gibt es keine Interferenzen mit Stoffen wie z.B. CTAB. Somit ermöglicht die fluorometrische Methode im Vergleich zu spektrophotometrische Messtechniken eine wesentlich präzisere DNA-Konzentrationsbestimmung; eine zusätzliche Präzision lieferte die dreifache Messwiederholung. Im Anschluss wurden alle DNA-Proben auf eine einheitliche Konzentration von 20 ng/ml verdünnt und die Korrektheit der Verdünnungen auf Agarose-Gelen überprüft.

2.3.2 AFLP-Analysen

Die AFLP-Methode beginnt mit dem Verdau von genomischer DNA mit zwei unterschiedlich oft schneidenden Restriktionsenzymen (`four-´und `six-base cutter´). An die erzeugten Schnittstellen werden Adapter ligiert, deren bekannte Sequenz Ausgangspunkt für die Amplifizierung der DNA-Fragmente mittels PCR ist. Für eine erste Vervielfältigung des gesamten Adapter-ligierten DNA-Gemisches werden Primer benutzt, die zur Adapter-Sequenz komplementär sind. Bei einer zweiten, selektiven PCR werden Primer mit

zusätzlichen selektiven Nukleotiden am 3`Ende eingesetzt, so dass nur noch ein Teil der gesamten DNA amplifiziert wird. Hierbei ist einer der selektiven Primer fluoreszenz-markiert, wodurch die DNA-Fragmente von automatischen Fragmentanalysesystemen detektiert werden können.

Das AFLP-Protokoll folgte hauptsächlich dem von Vos et al. (1995) beschriebenen Verfahren mit Modifikation nach Dehmer (2001). Die genomische DNA wurde mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *MseI* verdaut. Die verwendeten Enzymkonzentrationen, Inkubationszeiten und Temperatur wurden in Vorversuchen optimiert. Alle für die AFLP-Technik durchgeführten Reaktionen erfolgten im Thermocycler (GeneAmp 9700, Applied Biosystems, Darmstadt).

Die Restriktionsansatz (Anhang/Tabelle I) wurde für 7 Stunden bei 37°C inkubiert, mit anschließender Enzymdeaktivierung für 15 min bei 70°C. Um die Vollständigkeit der Restriktion beurteilen zu können, wurden 4,5 µl der restringierten DNA auf einem einprozentigen Agarose–Gel aufgetrennt. An die entstandenen DNA-Fragmente wurden spezifische *Pst*I- und *Mse*I- Adapter (Anhang/Tabelle II) ligiert. Hierzu wurden 7,5 µl von dem Restriktionsansatz entnommen und dann eine Ligation angesetzt. Je Restriktionsatz wurden 6,7 µl Ligationsmix (Anhang/Tabelle III) zugegeben und 120 min bei 22°C inkubiert. Der Ansatz wurde 1:10 verdünnt, 3,5 µl davon dienten als Ausgangs-DNA für die Präamplifikation. Als Primer für die PCR dienten Oligonukleotide, welche komplementär zu der Adaptersequenz sind (Anhang/Tabelle IV). Hierbei wurden Primer mit einer selektiven Base (*Pst*I+1, *Mse*I+1) eingesetzt. Die Präamplifikation wurde entsprechend dem Protokoll in Anhang/Tabelle V angesetzt, das verwendete PCR-Profil findet sich in Anhang/Tabelle VI. Nachfolgend wurden die Prämplifikationsprodukte auf einem 1,5% Agarose-Gel kontrolliert. Die erzeugten Fragmenten dienten wieder als Vorlage-DNA für eine selektive Amplifikation mit Hilfe der selektiven Oligonukleotid-Primer. Neben der komplementären Sequenz der Adapter besitzen sie am 3´-Ende noch bis zu vier weitere, variable Basen, was die Anzahl der erzeugten Fragmente so weit reduziert, dass bei der automatischen Fragment-Auftrennung klar erkennbare Banden auftreten. In Anhang/Tabelle VII sind die Sequenzen der verwendeten Primern aufgeführt.

Da die DNA nach der Präamplifikation zu hoch konzentriert vorlag, um sie in der selektiven Amplifikation zu verwenden, wurden die Proben 1:50 verdünnt. Die einzelnen Komponenten der selektiven Amplifikation und ihre Konzentrationen sind im Anhang (Tabelle VIII) aufgeführt. Die selektive +3/+4 Amplifikation wurde mit dem in Anhang/Tabelle IX aufgelisteten PCR-Programm durchgeführt.

Die multifluoreszierende Fragment-Abnalyse – d.h. die Kombination und Analyse mehrerer PCR-Reaktionen in der selben Gel-Bahn durch Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe je Reaktion - wurde mit einigen Modifikationen nach dem vom Hersteller beschriebenen Protokoll durchgeführt (Applied BioSystems; Informationen zur Automatischen DNA-Sequenzierung und Fragmentanalyse mit den ABI PRISM-Systemen 310, 373 und 377). Die *Pst*-Primer wurden entweder mit 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) als blaufluoreszierendem, mit NED als gelbfluoreszierendem, oder mit HEX als grünfluoreszierendem Farbstoff markiert. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte durch die Verwendung eines internen, 6-carboxy-X-rhodamin-(ROX-)markierten Längenstandards (ET900-R, Amersham Pharmacia). Vor dem Gelauftrag wurden jeweils 2.0 µl der 6-FAM-, 2.0µl der HEX- und 2,8 µl der NED-markierten Proben zusammenpipettiert, 2 µl davon mit 2µl Ladepuffer/Standard-Mix (s.Anhang, A3) versetzt und für 2 min bei 95°C denaturiert. Die AFLP-Fragmente wurden auf einem ABI Prism 377 Sequenzierautomaten (Applied Biosystems) in einem 0.2 mm-starken, denaturierenden 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. Anhang, A4; Laufstrecke 36 cm; Laufzeit 5,5 h bei 2,8 kV; Matrix D). Die Auswertung dieser Gele erfolgte mit den Software-Programmen GelProcessor 1.0, GeneScan 3.7 (beide Applied Biosystems) und BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien)

2.4 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden optische Eigenschaften wie Lichtstreuung oder Fluoreszenz von in Lösung suspendierten Partikel, z.B. Zellkernen, nach Anfärbung gemessen. Dabei wird in einem hydrodynamischen System ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, der die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Kerne an einer definierten Position (hydrodynamische Fokussierung) vorbeiführt und dabei jeden einzelnen Zellkern mittels Laser- oder UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Der Farbstoff DAPI (4‘,6-Diamidino-2-Phenylindol) wurde erstmals von Stohr et al. (1977) und Otto (1977) in der Durchflusszytometrie für die Bestimmung des DNA-Gehaltes verwendet. DAPI bindet DNA-spezifisch an Adenin- und Thymin-Basen und eignet sich beispielsweise zur Bestimmung des Ploidiegrades. Sein Anregungsoptimum liegt bei 350 nm und sein Emissionsoptimum bei 480 nm. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird durch ein Linsensystem gesammelt, mit Hilfe dichroischer Spiegel und optischer Filter aufgetrennt und anschließend von optischen Sensoren erfasst. Das so erzeugte analoge Signal wird digitalisiert und durch einen Computer verarbeitet. Das Messergebnis wird in einem Histogramm dargestellt, in dem die

Peak-Positionen den relativen DNA-Gehalten der gemessenen Zellkernen entsprechen. Die Messungen in dieser Arbeit wurden mit Durchflusszytometer (Partec, Münster) durchgeführt.

2.4.1 Ermittlung der Art der Samenbildung mittels durchflusszytometrischem Samentest

Der FCSS (Matzk et al., 2000) ermöglicht die Ermittlung des Reproduktionssystems mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Da sich die DNA-Gehalte der Zellkerne vom Endosperm und vom Embryo aufgrund ihrer unterschiedlicher Ploidie unterscheiden, sind Rückschlüsse auf die Art der Samenbildung möglich.

Zur Prüfung der Fortpflanzungswege wurden reife Samen von 200 *Poa pratensis*-Einzelpflanzen verschiedener europäischer Herkünfte untersucht. Diese wurden aufgrund ihrer Homo-/Heterogenität so selektiert, dass die Variabilität im europäischen *Poa*-Samlungsmaterial abgedeckt war. Die untersuchten Herkünfte stammen aus 23 europäischen Ländern, von denen zwei bis vier Akzessionen mit jeweils drei Einzelpflanzen (je 30 Samen pro Einzelpflanze als Mischprobe) analysiert wurden. Für die Isolierung der Zellkerne wurden die 30 reifen Samen in einer Glaspetrischale auf ein Stück Sandpapier gelegt, einige Male mit einem weiteren Stück Sandpapier gerieben und sofort mit 2 ml der eiskalten DAPI–Pufferlösung Ma IV (Matzk et al., 2000) in Suspension gebracht. Der Puffer dient der Unterbindung des DNA-Abbaues durch Enzyme und der Anfärbung der Zellkerne. Danach wurde die Suspension in Messröhrchen gefiltert (30 µm-Filter) und die Probe ca. 2 Stunden bis zur Messung zum Anfärben auf Eis aufbewahrt. Die Messungen wurden mit einem Ploidy Analyser durchgeführt (Partec). Bei sexueller Samenbildung werden auf dem Histogramm zwei Peaks erwartet: ein sehr hoher, der die Zellen im Embryo repräsentiert, und ein kleiner, die Zellen im Endosperm repräsentierend. Viel höhere Zellzahlen im Embryo im Vergleich zum Endosperm (nur Aleuron) erklären den Unterschied in der Peakhöhe. Das Ergebnis einer Messung geht aus der Abb. 4 hervor.

Bei diesem Histogramm zeigt die x-Achse die Fluoreszenzkanäle als Maß für den relativen DNA-Gehalt, die y-Achse die Anzahl der in einem Kanal gemessenen Zellkerne. Das Rauschen (Debris) ist die Gesamtheit der Störsignale, die von bei der Präparation entstandenen Zellfragmenten verursacht werden. Als Standards beim Messen wurde die sexuelle *Poa*-Sorte ´Jori´ genutzt, welche immer einen 2C-Embryo- und einen 3C-

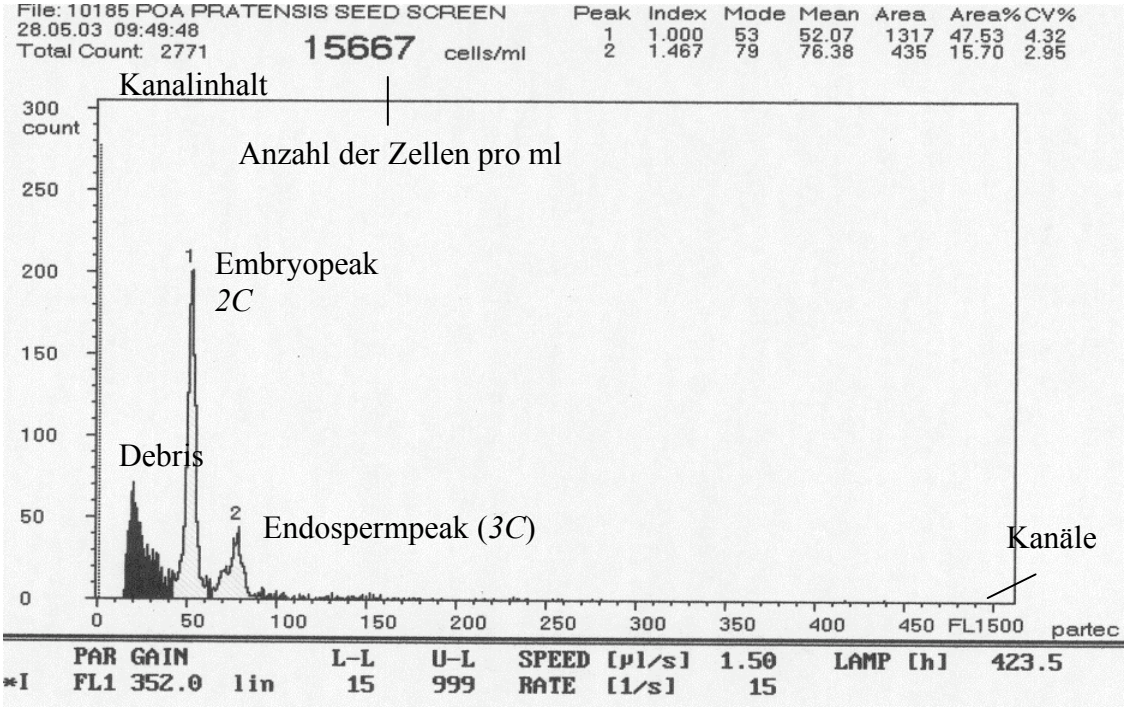


Abbildung 4: Aufbau eines Histogrammes: C-DNA-Gehalt im Embryo;
in Klammern: DNA-Gehalt im Endosperm.

Endosperm-Peak bildet. Der Standard wurde nach jeder 20. Probe sowie bei veränderten Geräteeinstellungen extern gemessen. Die erhaltenen Peaks können je nach DNA-Menge (Position auf der x-Achse) dem Embryo oder dem Endosperm zugeordnet werden.

Abb.5 erläutert die möglichen Reproduktionswege bei *Poa pratensis*. Der durch Meiose entstandene Embryosack ist reduziert und hat eine diploide Zentralzelle sowie eine haploide Eizelle. Nach einer doppelten Befruchtung mit einer reduzierten Spermazelle entstehen die B_{II}-Hybriden. Wenn nur die Zentralzelle befruchtet wird und die Eizelle sich autonom entwickelt (Parthenogenese) entstehen die M_I-Pflanzen. Darüber hinaus können Embryosäcke aus somatischen Zellen gebildet werden, die in der Nähe der Embryosackmutterzellen liegen. Die Eizellen bedürfen keiner Befruchtung, so dass die Embryonen parthenogenetisch entstehen. Das Endosperm von aposporen Embryosäcken entwickelt sich nur, wenn die Zentralzelle befruchtet wurde (Pseudogamie). Ohne diese „pseudogame Befruchtung“ sind parthenogenetische Embryonen nicht lebensfähig. Auf diese Weise entstehen die mutteridentischen M_{II} Pflanzen. Nach einer doppelten Befruchtung der aposporischen Embryosäcke hingegen bilden sich die B_{III} Hybriden.

Die angezeigten Reproduktioswege sind bei Untersuchung von Einzelsamen festzustellen. Da in dieser Arbeit Mischproben von 30 Samen pro Pflanze untersucht wurden und die

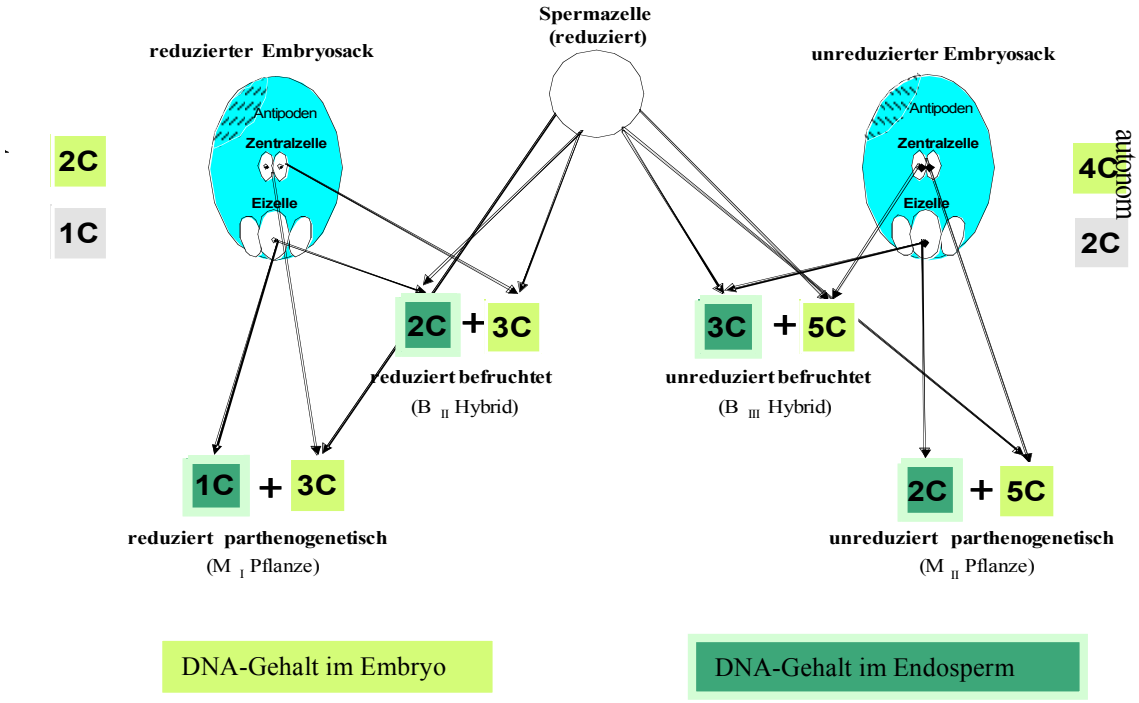


Abbildung 5: Reproduktionswege bei *Poa pratensis*.

Samenbildung an ein und derselben Pflanze auf verschiedene Weise zustande kommen kann (Spillane et al., 2001), wurden die oben genannten Reproduktionswege in Kombinationen festgestellt. Einen Überblick über die möglichen Klassen bei Mischprobenuntersuchung und den entsprechenden Reproduktionswegen in Einzelpflanzen zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Unterschiedliche Reproduktionswege nach Prodanovic et al. (2002).

Weg	*FCSS : C-wert des Embryos + (Endosperm)* Mischproben	Einzelsamen	Fortpflanzung
1.	2C + (3C)	2C + (3C)	obligat sexuell
2.	2C + (5C)	2C + (5C)	obligat apomiktisch
3.	2C + (3C) + (5C)	2C + (3C) ; 2C + (5C)	fakultativ sexuell und apomiktisch
4.	2C + 3C + (5C)	2C + (3C); 2C + (5C); 3C + (5C)	fakultativ sexuell, apomiktisch und B_{III} -Hybrid
5.	3C + (5C)	3C + (5C)	obligater B_{III} -Hybrid
6.	1C + (3C)	1C + (3C)	obligat M_I
7.	1C + 2C + (3C)	1C + (3C) ; 2C + (3C)	fakultativ sexuell und M_I
8.	1C + 2C + (3C) + (5C)	1C + (3C); 2C + (3C); 2C + (5C)	fakultativ sexuell, apomiktisch und M_I
9.	1C + 2C + 3C + (5C)	1C + (3C); 2C +(3C); 2C+(5C); 3C+(5C)	fakultativ sexuell, apomiktisch, M_I und B_{III}

2.4.2. Untersuchungen zur Bestimmung des Ploidiegrades

Ein Einsatzgebiet der Durchflusszytometrie ist die Bestimmung des Ploidiegrades. Dafür wird der relative DNA-Gehalt ermittelt, um dann durch den Vergleich mit einem Standard bekannter Ploidiestufe Aufschluss über den Ploidiestatus der unbekannten Probe(n) zu erhalten.

Die Ermittlung des Ploidiegrades wurde an Blattmaterial durchgeführt. Um Jungblätter mit möglichst geringem Zeitaufwand zu bekommen, wurden Wurzeln von 200 Mutterpflanzen und jeweils 10 Einzelpflanzennachkommenschaften pro Mutterpflanze ausgegraben (insgesamt 2200 Einzelpflanzen) und in Pikierkisten gepflanzt. Die unter Gewächshausbedingungen gewachsenen jungen Grastriebe wurden für die Analyse verwendet. Pro Pflanze wurden bis zu 100 mg junge Blätter geerntet. Diese wurden in einer Glaspetrischale mit einer Rasierklinge in 3 ml DAPI-Pufferlösung Ma IV zerhackt (s. Anhang, A5). Die Suspension wurde gefiltert und zur Färbung ca. 2 h auf Eis gelagert. Als Referenzprobe bekannter Ploidiestufe dienten Blätter der Sorte ´Lato`, welche nach jeder Akzession (1 Mutterpflanze und 10 Nachkommenschaften) gemessen wurden. Die Zellen dieser Sorte sind immer tetraploid. Bei höherem DNA-Gehalt als Lato wird der Peak der zu untersuchenden *Poa*-Herkünfte rechts von dem Peak der Kontrollsorte liegen (Abb. 6a), bei niedrigerem DNA-Gehalt links davon (Abb. 6b). Beispielweise weist die tetraploide Pflanze einen Peak auf Position 50 der X-Achse auf, für eine octoploide Pflanze der gleichen Art wird ein Peak auf Position 100 erwartet, eine hexaploide Pflanze würde einen mittleren Peak zeigen, also auf Kanal 75.

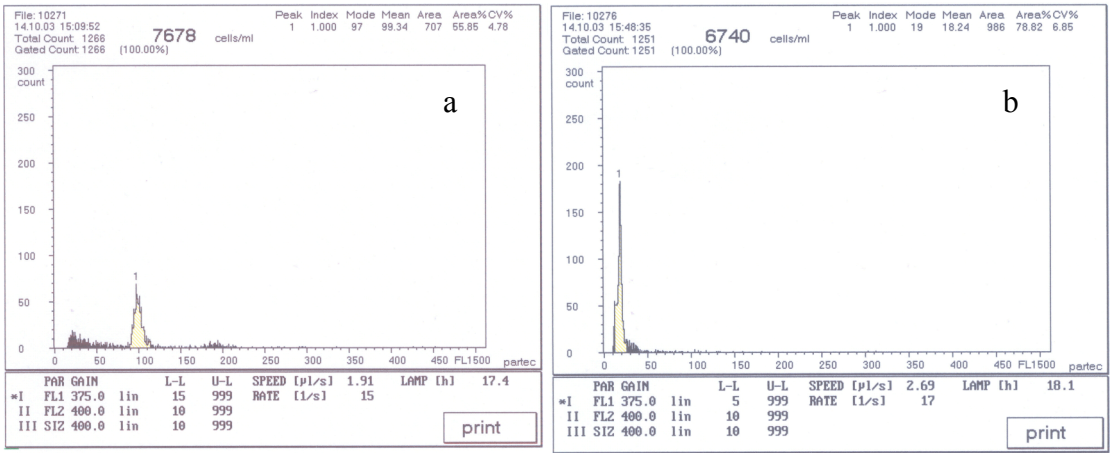


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Auswertung des Ploidiegrades.

2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

2.5.1 Morphologisch-phänotypische Daten

Um einen ersten Überblick über die Struktur der gesamten morphologisch-phänotypischen Variabilität zu erhalten, wurde mit Hilfe des Programmpaketes *Statistica* (Version 6.0) eine Faktor- bzw. Haupt-Komponentenanalyse (Principal Component Analyse, PCOA) durchgeführt. So wurden Faktoren detektiert, die die Variabilität der Herkünfte widerspiegeln. In Abhängigkeit vom Faktor, an dem sie näher liegen, konnten die Akzessionen in Gruppen eingeteilt werden, wobei die Faktorladung die Ähnlichkeiten zwischen den Akzessionen einer Gruppe bestimmt. Je höher die Faktorladung ist, desto sicherer gehört die Akzession zu der entsprechenden Gruppe (Sokal & Sneath, 1963).
Um mögliche Unterschiede zwischen den Akzessionen verschiedener Herkünfte und hinsichtlich der Gesamtheit ihrer morphologisch-phänotypischen Merkmalsausprägungen festzustellen, wurden alle Akzessionen nach ihren Herkunftsländern gruppiert und die jeweiligen Häufigkeiten der einzelnen Boniturnoten für die Akzessionen aus einem Land berechnet. Die Länder, aus denen weniger als neun Akzessionen vorlagen, wurden wegen mangelnder Aussagekraft nicht in die Analyse mit einbezogen. Mittels NTSYSpc (Version 2.11a) wurden die Distanzen nach Nei (1972) ermittelt. Um die Beziehung zwischen den Akzessionen aus den einzelnen Ländern entsprechend der vorhandenen phänotypischen Abstände darzustellen, wurde die Clustermethode ”Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average” (UPGMA) ausgewählt.
Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (Statistica 6.0) wurde der Einfluß der Ausprägung jedes einzelnen Merkmals auf die Gruppierung der Ökotypen untersucht. Dafür wurde die GLM-Prozedur (general lineal model) eingesetzt.

2.5.2 Daten zur Art der Samenbildung

Häufigkeiten der vom Flowcytometer detektierten Reproduktionsweg-Kombinationen wurden für die Akzessionen aus jedem Land berechnet, nachdem ein Vergleich der Länder vorgenommen wurde.

2.5.3. Daten zur Ploidiestufe

Die Unterschiede in den DNA-Gehalten der Akzessionen aus zwei aufeinander folgenden *Poa pratensis*-Generationen wurden mittels eines t-Tests auf Signifikanz geprüft. Die Variabilität der DNA-Gehalte innerhalb eines Landes wurde mit dem klassischen Variabilitätskoeffizienten ermittelt (Beziehung zwischen der Standardabweichung und Mittelwert), um so Ergebnisse von Versuchen oder Merkmalen mit stark unterschiedlichen Mittelwerten vergleichen zu können. Über eine Korrelationsanalyse wurde geprüft, ob die Ploidie einen Einfluss auf die Ausprägung der bonitierten Merkmale aufweist.

2.5.4 Molekulare Daten

Die ermittelten AFLP-Fragmente wurden in eine binäre Matrix überführt. Dabei erhält eine Akzession eine “1”, wenn das betreffende Fragment vorhanden bzw. eine “0” wenn das Fragment abwesend ist. Mit dem Computerprogramm NTSYSpc 2.11a wurden die genetischen Ähnlichkeiten zwischen den Akzessionen nach Jaccard (1908), und die Distanzen nach Nei (1972) berechnet. Diese wurden in UPGMA-Phänogrammen (Sneath & Sokal, 1973) graphisch dargestellt. Die Rangkorrelationen und die dreidimensionale graphische Darstellung wurden mittels der Software BioNumerics durchgeführt.
Für die Untersuchung auf Herkunftsebene wurden die Akzessionen des gleichen Herkunftslandes zusammengefasst. Die genetische Diversität innerhalb und zwischen den Herkunftsländern wurde über die mittlere Diversität in den Populationen und die Gesamtdiversität nach Nei (1973) ermittelt. Auf die gleiche Weise wurde die Variabilität innerhalb und zwischen den geographischen Gebieten erfasst. Die Berechnungen wurden mit dem Programm *Popgene* (Version 1.32) durchgeführt.

2.5.5 Korrelationen zwischen den Datensätzen

Beim Vergleich der morphologischen und molekularen Datensätze, welche als Distanzmatrices vorliegen, wurde ein Manteltest mit dem von Adam Liedloff entwickelten Programm *Mantel* (Version 2.0) durchgeführt. Die daraus resultierende Korrelation ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen den morphologischen und molekularenDistanzen.

Durch Ermittlung/Berechnung der Korrelationskoeffizienten wurde separat für jedes Merkmal getestet, ob es ein Zusammenhang zwischen der Merkmalausprägung und die DNA-Gehalt der untersuchten Herkünfte vorliegt.
Eine Berechnung der Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt und den molekularen Daten war nicht möglich, weil der Anzahl durchflusszytometrisch untersuchter Elternakzessionen pro Herkunftsland zu gering war; andererseits wurden keine Nachkommenschaften mit molekularen Marker untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Feldversuche

3.1.1 Morphologisch-phänotypische Diversität

Nachdem an allen Akzessionen der vier Standorte der Primäranlagen die gleichen Merkmale erfasst worden waren (Evaluierung 2000-2002), wurden sie in eine erste Faktoranalyse einbezogen, um einen Überblick über die Struktur des gesamten Datensatzes zu erhalten sowie über die Faktoren, die diese Struktur beeinflussen. Es wurden fünf Faktoren detektiert, die die Variabilität der Herkünfte bestimmen. In Hinsicht auf die Faktoren, bei denen sie große Faktorladungen zeigten, konnten die Akzessionen in drei Gruppen eingeteilt werden.
In der folgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse für jeden Züchter bzw. Standort zusammengefasst. Es war festzustellen, dass der erste Faktor die Genotypen, die von der Saatzucht Steinach evaluiert wurden, in einer Gruppe einschliesst. Der zweite Faktor gruppierte die Herkünfte, die bei der DSV evaluiert wurden. Mit einer signifikanten Faktorladung über 0.7 zeigten diese Herkünfte klare Zugehörigkeit zu zwei Gruppen. Zusammen erklärten beide Faktoren 81% der gesamten Variation. Ohne eine signifikante Faktorladung zu erreichen, wurden die meisten in Malchow (am IPK bzw. von der NPZ) evaluierten Akzessionen von einem dritten Faktor kombiniert. Die Ergebnisse zeigen eine klare Differenzierung der Akzessionen in Abhängigkeit vom Züchter bzw. Evaluierungsstandort.
Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte man, wenn die Analyse innerhalb eines Herkunftslandes durchgeführt wurde. Da die polnischen Akzessionen die größte Anzahl des an allen vier Standorten evaluierten Materials darstellten, wurden die Ergebnisse der Faktoranalyse für diese extra zusammengefasst. Es wurde eine Hauptkomponenten-Analyse durchgeführt und

Tabelle 5: Ergebnisse der Faktoranalyse für die Ausgangsakzessionen, evaluiert an vier Standorten.

Züchter / Standort	Anzahl Akzessionen	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
SZS / Steinach	401	376*	-	5#
DSV / Lippstadt	334	-	273*	53#
NPZ / Malchow	299	-	94*	245#
IPK / Malchow	538	23*	6*	308#
gesamte Variation		41%	40%	14%

* Ladungswert zum entsprechenden Faktor > 0.7; # Faktorladung 0,4

die Ähnlichkeiten zwischen den Akzessionen polnischer Herkunft zweidimensional dargestellt. Als Komponenten dienten die ersten zwei Faktoren, die den größten Teil der Variation erklären (Abb. 7 A-D). Die Analyse zeigte, dass die polnischen Genotypen aufgrund ihrer phänotypischen Merkmale sehr nah verwandt waren. Die Hauptkomponenten-Analyse gruppierte die Populationen in vier Untergruppen, wobei mittels ANOVA eine hohe Signifikanz (p=0.00) zwischen diesen nachzuweisen ist. Die erste Gruppe bilden die am IPK evaluierten polnischen Herkünfte (Abb. 7A). Daneben findet sich die NPZ-Gruppe der NPZ (Abb. 7B). Deutlich abweichend sind die restlichen zwei Gruppen mit den von der DSV (Abb. 7C) bzw. der SZS (Abb. 7D) evaluierten Akzessionen. Somit wurde bestätigt, dass die Gruppierung nur vom Boniturerfasser bzw. Standort abhängig ist.

Um Unterschiede zwischen den Herkünften bezüglich der natürlichen morphologisch-phänotypischen Variabilität zu ermitteln, wurden die weiteren Analysen der Boniturnoten der Primäranlage 2000/2002 für alle vier Standorte separat durchgeführt. So konnte die oben genannte Züchter-/Standort-Wirkung ausgeschaltet werden.
Als Nächstes wurde geprüft, ob die Akzessionen verschiedener geographischer Regionen anhand ihrer phänotypischen Ausprägungen zu unterscheiden sind. Die morphologischen Distanzen zwischen den Herkünften eines Landes wurden nach Nei (1972) ermittelt. Vier nach Standort getrennte UPGMA-Clusteranalysen auf der Basis dieses Koeffizienten ergaben stets geographische Gruppierungen der Ökotypen, obwohl an allen vier Standorten Akzessionen aus verschiedenen Länder evaluiert wurden (Abb. 8 A-D).

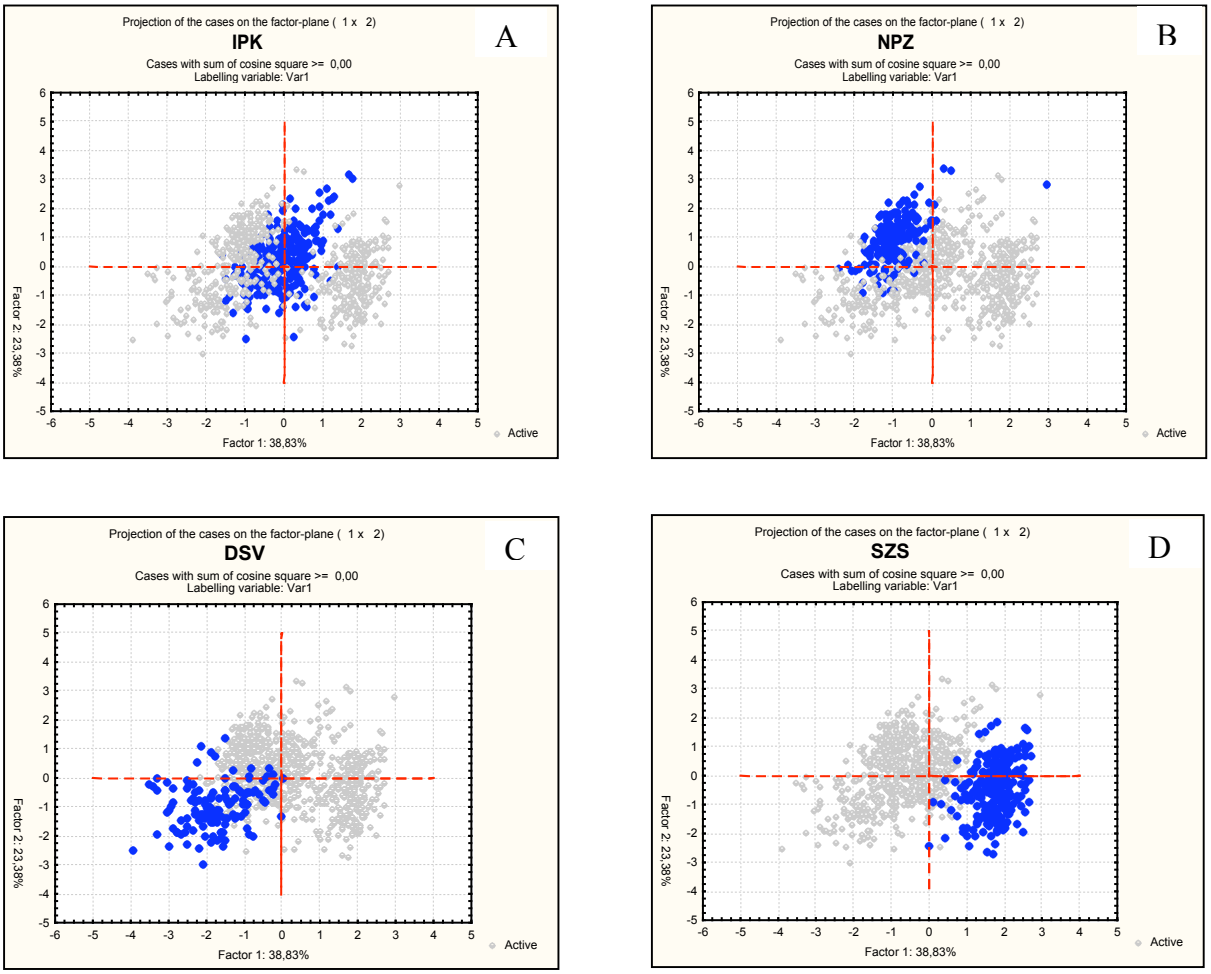


Abbildung 7: Hauptkomponenten-Analyse der 928 Akzessionen polnischer Herkunft, evaluiert von: A) IPK (282 Akzessionen), B) NPZ (198 Akzessionen), C) DSV (191 Akzessionen), D) SZS (257 Akzessionen).

Das Phänogramm, das die am IPK evaluierten Akzessionen umfasst (Abb. 8A) trennte die 512 Akzessionen aus acht Ländern in drei separate Gruppen. Eine Gruppe enthält hauptsächlich Akzessionen aus südeuropäischen Ländern (Schweiz und Slowenien) und zeigt einen Distanzkoeffizienten von 0,2. Die zweite Gruppe im Phänogramm, die Material aus mitteleuropäischen Ländern (Dänemark und Polen) umfasst, zeigt kleinere Distanzen. Die nordeuropäischen Länder (Island, Norwegen, Schweden) sind in einem anderen Cluster gruppiert. Als nicht zu Europa gehörig clustern die 12 grönländischen Akzessionen separat. Diese zeigen die größte Distanz (0,37) zu allen anderen Ländern.

Die von der NPZ evaluierten Ökotypen stammen aus drei Ländern (Abb. 8B). Die Nachbarländer Deutschland und Polen clustern zusammen. Eine große Distanz dazu (0,32) zeigen die 30 mongolischen Herkünfte.

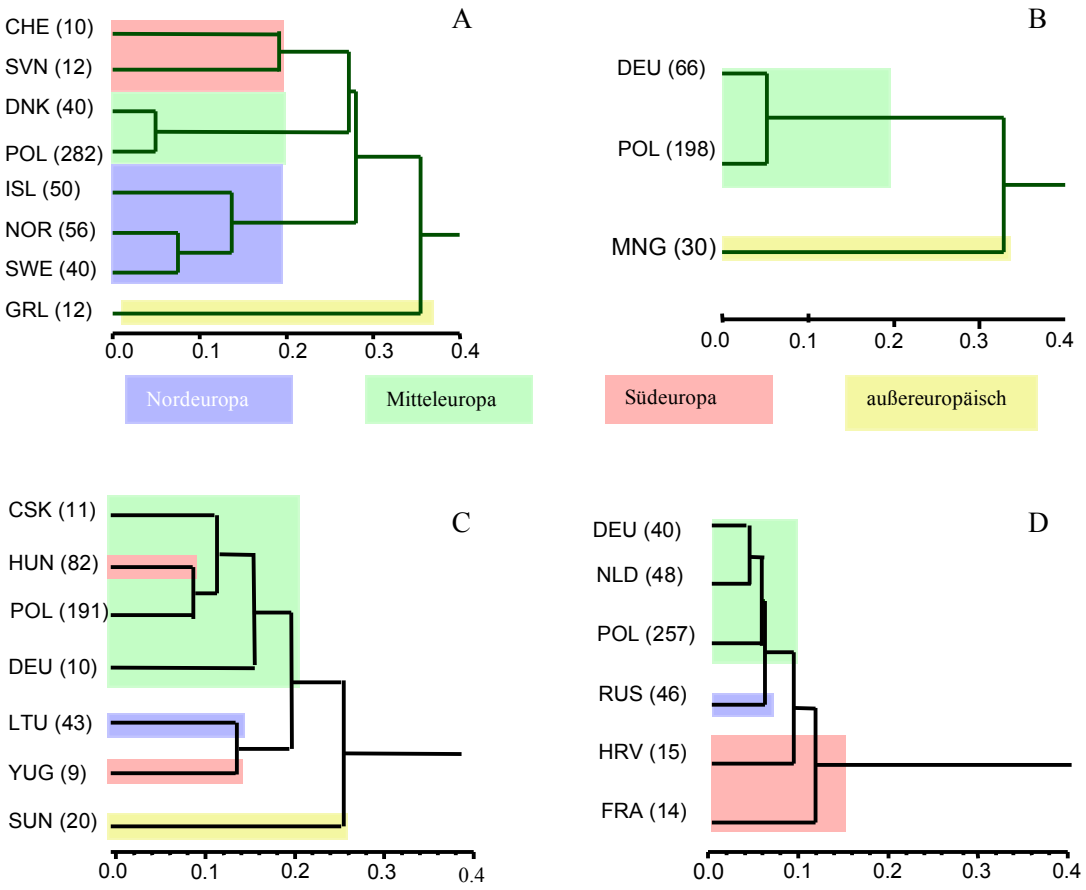


Abbildung 8: UPGMA-Phänogramme von 1583 europäischen *Poa pratensis*-Ökotypen, basierend auf der Auswertung von 24 morphologisch-phänotypischen Merkmalen; Evaluierungsdaten von IPK (A), NPZ (B), DSV (C) und SZS (D); die Zahlen in Klammern entsprechen der Anzahl evaluierter Akzessionen.

Die meisten Akzessionen, die von der DSV evaluiert wurden (Abb. 8C), stammen aus Mitteleuropa und gruppieren entsprechend. Eine Ausnahme in dieser Gruppe bilden die aus Ungarn stammenden Akzessionen. Entgegen den Erwartungen bildet das jugoslawische Material mit Akzessionen aus Litauen eine Untergruppe. Separat clustern nur sowjetische Herkünfte, was mit Hinsicht auf das litauische Material überrascht.

Auch die von der SZS evaluierten Herkünfte (Abb. 8D) bilden zwei Gruppen im Phänogramm. Kleinere Distanz weisen Polen, Deutschland, die Niederlande und Russland auf. Separat, mit höherer Distanz gruppieren die Akzessionen aus den beiden Südländern Kroatien und Frankreich.

Des Weiteren wurde geprüft, ob möglicherweise auch bei den Nachkommenschaften ein Zusammenhang zwischen den morphologischen Merkmalen und den Regionen festzustellen ist, aus denen die Herkünfte stammen. Die morphologisch-phänotypische Beschreibung der selektierten Nachkommenschaften bezieht sich auf 26 evaluierte Merkmale. Auch auf der

Nachkommenebene bestätigt sich die Gruppierung nach geographischen Gebieten (Abb. 9). Die Akzessionen bilden drei Gruppen, die Süd-, Mittel- und Nordeuropa entsprechen. Hierbei fällt auf, dass die norwegischen und die litauischen Akzessionen mit den mitteleuropäischen Herkünften gruppieren, und die aus der Slowakischen Republik sich in der Südgruppe anordnen. Wie bei den Eltern clustern die Nachkommenschaften mongolischer Genotypen separat und weisen die größte Distanz zum europäischen Material auf.

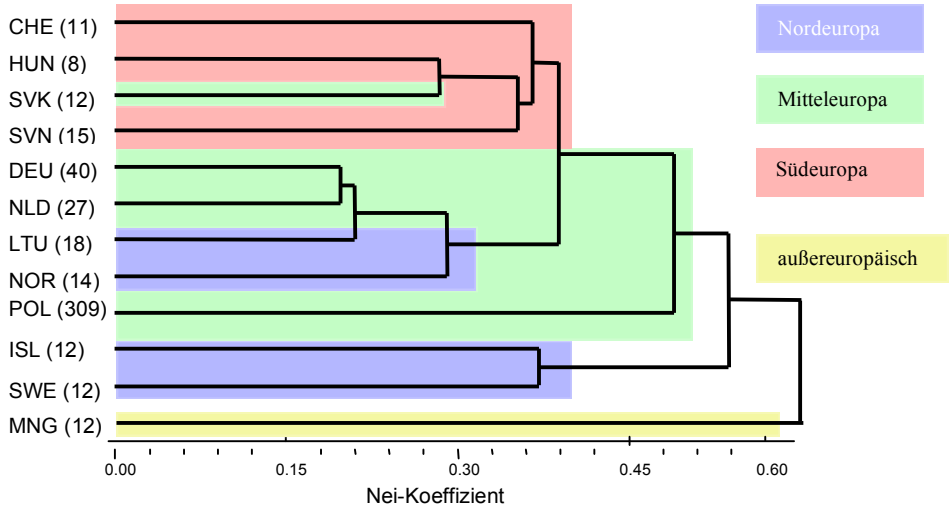


Abbildung 9: UPGMA-Phänogramm der Nachkommenschaften von 504 europäischen *Poa pratensis*-Ökotypen, basierend auf der Auswertung von 26 morphologischen Merkmalen (Evaluierungsdaten 2002-2004; Standort Malchow).

Im Folgenden wurde geprüft, welche der bonitierten Merkmale die geographische Zuordnung der Herkünfte signifikant beeinflussen. Als für die Eltern repräsentativ wurde die Gruppierung der am IPK-Malchow evaluierten Genotypen betrachtet, da hier Vertreter aller drei geographischen Großregionen Europas (Nord-, Mittel-, und Südeuropa), sowie ein nichteuropäisches Land (Mongolei) vertreten sind. Nach Zuordnung der 512 Genotypen zu den vier im Phänogramm gebildeten Clustern wurde eine Einwege-ANOVA durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Beim Ausgangsmaterial war festzustellen, dass eine Großzahl der bonitierten Merkmale die Differenzierung der Ökotypen signifikant beeinflussen. Bei 21 von 26 bonitierten Merkmalen trat eine signifikant unterschiedliche Ausprägung in Abhängigkeit von der geographischen Herkunft auf. Lediglich bezüglich der Merkmale Ausläuferbildung 2000, Blattfarbe 2001 und 2001a, Homogenität im generativen Stadium 2001, Höhe nach Blüte 2001 und Massebildung 2001 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den geographischen Gruppen festgestellt werden.

Tabelle 6: ANOVA p-Werte unter Berücksichtigung aller geographischen Gebiete (Süd-. Mittel-, Nordeuropa und Grönland/Mongolei) und aller erhobenen Merkmale bei *Poa pratensis* – Ausgangsmaterial und Nachkommenschaften. Daneben sind die Mittelwerte nach geographischen Gebieten angegeben; NE - Nordeuropa; ME - Mitteleuropa; SE - Südeuropa; a-zweite Bonitur; n.v.- nicht vorhanden; fettgedruckt: signifikante Merkmale.

Merkmal	**p-Wert** (Eltern)	**Mittelwerte Eltern**				**p-Wert**	**Mittelwerte Nachkommen**			
		NE	**ME**	**SE**	GRL		**NE**	**ME**	**SE**	MNG
Rost 2000	**0,02**	8,7	8,2	8,8	8,9	0,11	7,5	5,8	5,4	7,3
Rost 2000a	**0,00**	5,0	3,9	6,6	5,7	**0,01**	3,6	5,5	5,3	4,2
Blattbreite 2000	**0,03**	5,7	6,1	5,0	7,0	0,10	4,8	5,4	5,0	6,1
Blattfarbe 2000	**0,02**	5,4	5,0	5,2	7,0	0,37	6,6	5,7	5,4	5,5
Masse 2000	**0,03**	5,0	6,1	4,1	4,5	0,31	4,0	4,5	4,4	6,0
Homogenität im vegetat. Stadium 2000	**0,01**	6,0	7,2	5,4	6,5	**0,01**	8,5	8,6	8,5	8,3
Pflanzendichte 2000	**0,03**	6,0	6,3	4,6	5,2	0,33	7,3	6,3	6,1	7,7
Ausläuferbildung 2000	0,39	5,8	6,3	6,0	5,7	0,15	4,5	5,0	5,5	5,2
Stand vor Winter 2000	**0,03**	2,7	4,3	3,5	3,5	n.b.	4,7	5,7	6,2	3,4
Stand vor Winter 2000	**0,02**	2,1	3,3	2,9	2,9	**0,01**	2,4	4,2	4,2	3,6
Stand nach Winter 2001	**0,01**	2,2	3,5	3,6	2,3	**0,00**	2,4	4,2	4,2	3,6
Masse vor Rispenschieben 2001	**0,02**	2,9	4,8	4,6	3,6	0,26	4,7	5,7	6,0	5,2
Blattfarbe 2001	0,08	2,9	5,0	6,2	3,7	0,20	6,6	5,7	5,4	5,5
Blattfarbe 2001	0,90	5,4	5,3	5,7	6,8	-	-	-	-	-
Homogenität im generat. Stadium 2001	0,91	7,7	7,6	7,9	8,5	0,31	8,5	8,9	7,7	8,2
Ausläuferbildung 2001	**0,05**	4,7	6,3	6,5	3,9	0,41	4,4	5,8	6,5	5,5
Zeitpunkt Rispenschieben 2001	**0,01**	37,1	36,3	33,5	37,6	0,09	32,2	36,1	32,1	31,3
Halmtriebdichte 2001	**0,02**	5,2	7,0	6,4	6,2	0,13	7,2	6,0	5,8	4,5
Rost 2001	**0,02**	7,2	6,0	7,0	7,6	0,44	6,7	6,4	6,5	8,2
Mehltau 2001	**0,17**	7,5	7,0	7,3	7,3	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Krankheiten 2001	**0,01**	3,7	3,8	4,4	4,5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Höhe nach Blüte 2001	0,08	5,9	7,8	7,9	5,5	0,15	74,8	86,4	95,4	94,2
Nachwuchs nach Schnitt 2001	**0,05**	4,2	5,1	4,3	4,5	0,09	7,0	6,9	5,8	6,8
Massebildung 2001	0,08	4,0	5,0	4,3	4,7	0,25	5,8	5,6	5,0	5,3
Stand vor Winter 2001	**0,00**	2,8	4,1	4,3	3,6	0,09	2,8	3,9	3,6	2,7
Stand nach Winter 2002	**0,01**	2,7	4,5	4,1	3,0	**0,04**	2,0	3,0	3,6	3,0
Frühjahrswachstum 2002	**0,02**	2,1	3,3	3,4	2,1	0,44	3,5	4,2	4,6	3,9

Trotz der elternähnlichen geographischen Gruppierung der Nachkommenschaften detektierte eine Varianzanalyse im Gegensatz zu den Eltern eine viel niedrigere Anzahl von Merkmalen, die signifikante Unterschiede zwischen den geographischen Gebieten zeigen. Lediglich fünf der 26 Merkmale (Rost 2000a, Homogenität im vegetativen Stadium 2000, Stand vor Winter 2000a, Stand nach Winter 2001 und 2002) beeinflussen die Gruppierung der Nachkommenschaften signifikant. Bei keinem der geprüften Merkmale konnte anhand der Merkmalsmittelwerte eine klare Tendenz für die geographischen Regionen festgestellt werden.
Beim Vergleich der in den Jahren 2000/02 erzielten Eltern-Ergebnisse mit den Nachkommenschaftsdaten der Jahre 2002/04, zeigte sich, dass bei den Nachkommenschaften der Unterschied zwischen den Genotypen aus den verschiedenen geographischen Regionen bezüglich der Ausprägung ihrer morphologischen Merkmale abgenommen hat.

3.1.2 Umwelt

Die Evaluierungsdaten der Nachkommenschaften von je drei Einzelpflanzen von 57 am IPK evaluierten *Poa pratensis*-Akzessionen, die verklont und in drei verschiedenen Umwelten vermehrt worden waren (Süddeutschland, Norwegen und Portugal), wurden zusammen mit den Daten der Originalpflanzen mittels UPGMA-Analyse untersucht. Dieser Vergleich der phänotypischen Gruppierung der Akzessionen beider Evaluierungsgenerationen ist in Abbildung 10 dargestellt.

Hierbei ergaben sich bezüglich der Gruppen ähnliche Ergebnisse: sowohl bei den Eltern als auch bei den Nachkommenschaften liegen die Akzessionen aus den nordeuropäischen Ländern (Island, Norwegen, Schweden) nebeneinander im Phänogramm, wobei bei den Eltern auch die slowenischen Akzessionen in der nördlichen Gruppe clustern. Eine exaktere Differenzierung der Herkünfte aus den süd- und mitteleuropäischen Ländern war anhand der phänotypischen Merkmale nicht möglich. Insgesamt zeigten die grönländischen Herkünfte bei Eltern und Nachkommenschaften die größte Distanz zum europäischen Material auf. Auch ein Manteltest bestätigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Nei-Distanzmatrices der Eltern und denen der Nachkommenschaften ($r = 0,54$; $p = 0,02$; Berechnung mit 1000 Permutationen).

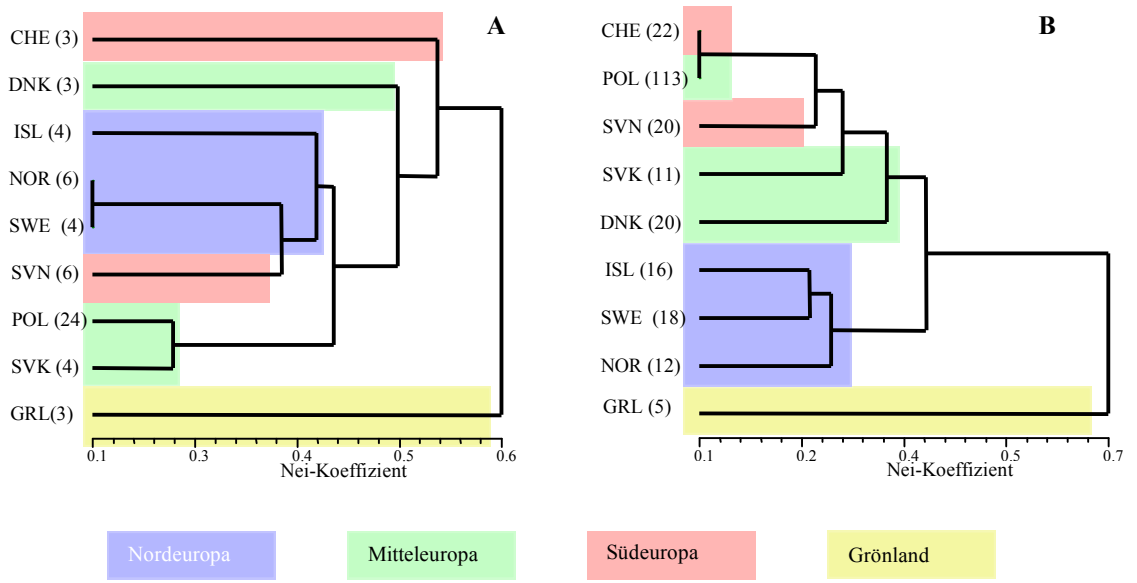


Abbildung 10: UPGMA-Phänogramme von 57 europäischen *Poa pratensis*-Ausgangsakzessionen und deren Nachkommenschaften, basierend auf der Auswertung von 21 bzw. 24 morphologischen Merkmalen (Evaluierungsdaten Eltern 2000/2002 (A) und Nachkommen 2002/2004 (B)); Die Zahlen in Klammern entsprechen der Anzahl der evaluierten Akzessionen pro Land.

Danach wurde geprüft, ob die geographischen Gruppierungen in beiden Evaluierungsperioden von den gleichen Merkmalen verursacht werden. Da die Elternpflanzen in drei Umwelten vermehrt wurden, wurde auch getestet, ob die drei Vermehrungsumwelten einen Einfluss auf die Merkmalsausprägungen der Nachkommenschaften zeigt. Erneut wurden die Herkünfte in vier Gruppen eingeteilt: Süd-, Mittel-, Nordeuropa und Grönland. Für die Varianzanalyse wurde ein GLM (general linear model) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Je zwei Bonituren für Stand vor und nach Winter sowie Masse vor Rispenschieben, Rost 1. Jahr, Ausläuferbildung und Höhe nach Blüte zeigten bei den Eltern als auch bei den Nachkommenschaften signifikante Unterschiede zwischen den geographischen Gebieten.

Anhand der zweiten Rostbonitur des ersten Jahres und Zeitpunkt Rispenschieben waren die geographischen Regionen in beiden Generationen nicht zu unterscheiden. Dies war mit den Merkmalen Homogenität im vegetativen Stadium, Halmtrieb- und Pflanzendichte, Massenbildung und Nachwuchs nach Schnitt nur beim Ausgangsmaterial möglich. Im Gegensatz dazu ermöglichen eine der Rostbonituren, Blattfarbe und –breite, Homogenität im generativen Stadium und Frühjahrswachstum keine signifikante Differenzierung der Regionen bei den Eltern, während dieses bei den Nachkommenschaften möglich war. Die mehrfachen

Bonituren für Rostresistenz und Masse lieferten keine klare Aussage über die Differenzierung in den geographischen Gruppen.

Tabelle 7: GLM p-Werte unter Berücksichtigung aller geographischen Gebiete (Süd-, Mittel-, Nordeuropa und Grönland) und aller erhobenen Merkmale bei *Poa pratensis*– Ausgangsmaterial und -Nachkommenschaften; fettgedruckt: signifikante Werte.

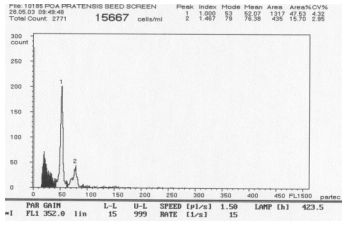
Prüfmerkmal	p-Wert Eltern	p-Wert Nachkommen-schaften	p-Wert Vermehrungss-standort
Rost 1.Jahr	**0,00**	**0,00**	0,52
Stand vor Winter 1.Jahr	**0,00**	**0,02**	0,32
Stand nach Winter 1.Jahr	**0,00**	**0,05**	1.00
Masse vor Rispenschieben	**0,05**	**0,02**	0,93
Ausläuferbildung	**0,04**	**0,04**	0,59
Stand vor Winter 2.Jahr	**0,00**	**0,02**	0,66
Stand nach Winter 2.Jahr	**0,01**	**0,00**	0,70
Höhe nach Blüte	**0,02**	**0,02**	0,77
Rost 1.Jahr	0,13	0,47	0,64
Zeitpunkt Rispenschieben	0,34	0,04	0,45
Masse	**0,00**	0,88	0,45
Homogenität im vegetat. Stadium	**0,02**	0,70	0,76
Pflanzendichte	**0,02**	0,08	0,55
Nachwuchs nach Schnitt	**0,00**	0,91	0,85
Massebildung	**0,00**	0,82	0,94
Halmtriebdichte	**0,02**	0,75	0,71
Rost 2.Jahr	0,25	**0,00**	0,38
Blattfarbe	0,55	**0,01**	1,00
Blattbreite	0,92	**0,01**	0,50
Homogenität im generativen Stadium	0,65	**0,03**	0,76
Frühjahrstwachstum	0,08	**0,00**	0,89

Die Varianzanalyse ergab keine signifikanten Einflüsse der Vermehrungsstandorte der Elternklone auf die Ausprägung der geprüften Merkmale bei deren Nachkommenschaften.

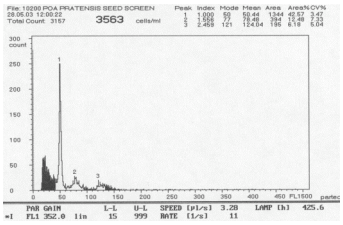
3.2 Ermittlung der Samenbildung

Als Ergebnis der Untersuchung der Samen-Mischproben von 110 *Poa pratensis*-Akzessionen wurden sechs der neun möglichen Reproduktionstypen festgestellt (Abb.11; vgl. Tabelle 4/Material und Methoden). Die Typen obligat apomiktisch (2C+(5C)), obligat meiotisch parthenogenetisch (1C+ (3C)) und apomeiotisch sexuell (3C+ (5C)) wurden nicht gefunden.

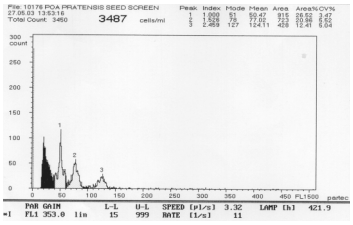
Um einen Vergleich der Herkünfte bezüglich des Vorkommens der obengenannten Reproduktionstypen zu ermöglichen, wurden die Häufigkeiten dieser Typen für die Akzessionen in einem Land ermittelt. Die Länder mit weniger als drei untersuchten



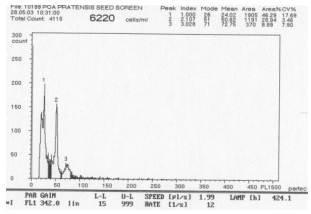
2C+ (3C)



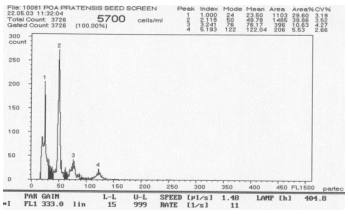
2C+ (3C)+ (5C)



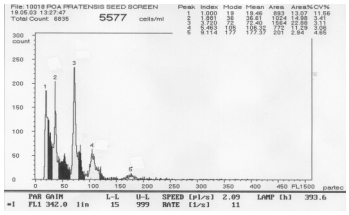
2C+ 3C+ (5C)



1C+ 2C+ (3C)



1C+ 2C+ (3C)+ (5C)



1C+ 2C +3C+ (5C)

Abbildung 11: Mit Hilfe des Durchflusszytometers festgestellte Reproduktionswege bei 110 *Poa pratensis*-Akzessionen verschiedener Herkunftsregionen mit Angabe der DNA-Gehalte im Embryo; in Klammern: DNA-Gehalte im Endosperm.

Akzessionen wurden in den Vergleich nicht einbezogen. In Abb.12 sind die Länder in zwei geographischen Großregionen - Süd- und Mittel- bzw. Nordeuropa - kombiniert und die Verteilung der unterschiedlichen Reproduktionstypen graphisch dargestellt.

Festzustellen war, dass in den europäischen Großregionen die Kombination apomiktisch und sexuell, die als fakultativer Apomikt bezeichnet wird, am häufigsten anzutreffen ist. Rein sexuelle Typen (blau) wurden in Süd- und Mitteleuropa gefunden, während diese in nordeuropäischen Ländern nicht auftreten. Die Kombination apomiktisch und reduziert parthenogenetisch (dunkelrot) ist verstärkt in Nordeuropa zu finden. In fast allen untersuchten Ländern vorkommend, jedoch mit niedriger Häufigkeit, ist die Kombination sexuell und pathenogenetisch (gelb). Selten kommen in den untersuchten Ländern die beiden Kombinationen apomiktisch und unreduziert befruchtet, sowie apomiktisch, reduziert parthenogenetisch und unreduziert befruchtet vor (grau).

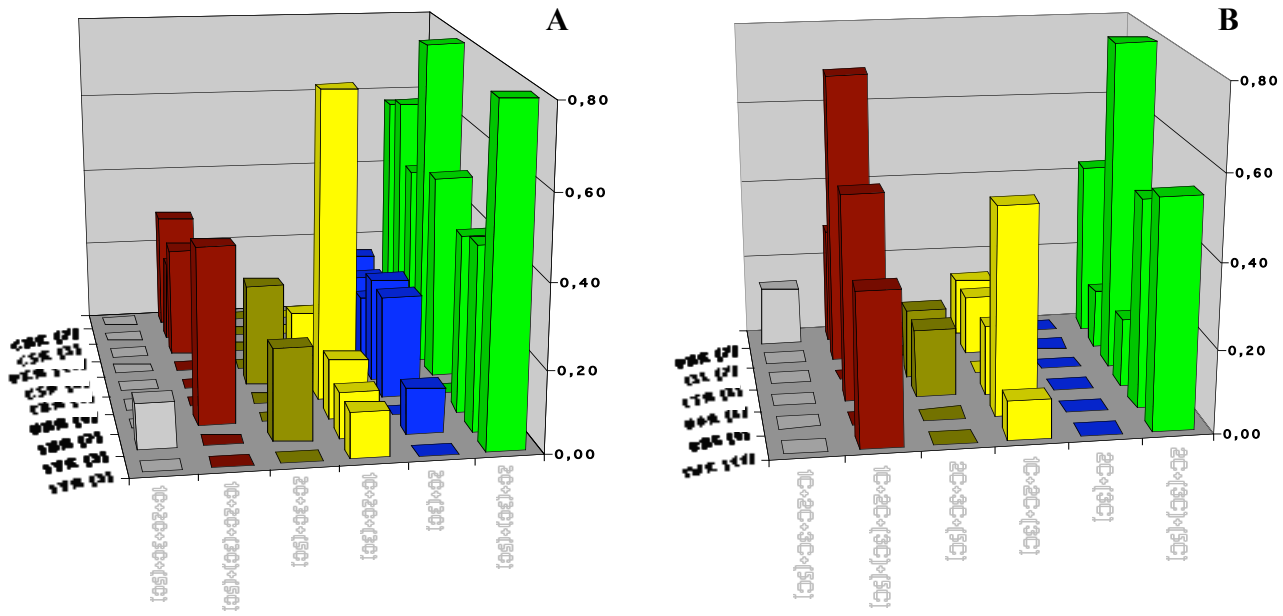


Abbildung 12: Verteilung der sechs Reproduktionstypen in 100 *Poa pratensis*-Herkünften in: A- Süd- und Mitteleuropa, B- Nordeuropa. Die unterschiedlichen Farben entsprechen verschiedenen Kombinationen von Reproduktionswegen: grün - apomiktisch und sexuell (MII+ BII); blau - obligat sexuell; gelb-sexuell und parthenogenetisch (BII+ MI); oliv - apomiktisch und unreduziert befruchtet (MII+ BII?+ BIII); dunkelrot - apomiktisch und reduziert parthenogenetisch (MII+ BII?+ MI); grau - apomiktisch, reduziert parthenogenetisch, unreduziert befruchtet (MII+ BII+ BIII).

3.3 Ermittlung der Ploidiestufen

Abbildung 13 zeigt einen Überblick über die mittleren DNA-Gehalte bzw. Ploidiestufen aus den Evaluierungen, die mit Hilfe eines Durchflußzytometers an 188 Originalelternklonen und deren 1947 Nachkommenschaften durchgeführt worden waren.

Festzustellen ist, dass die Akzessionen in drei Gruppen unterteilt werden könnten. Die erste Gruppe umfasst Akzessionen, bei denen die Nachkommenschaften höhere DNA-Gehalte im Vergleich zu deren Eltern nachweisen (Dänemark, Litauen, Spanien und Türkei). Eine andere Gruppe bilden die Herkünfte, bei denen die Eltern und Nachkommenschaften einen fast gleichen DNA-Gehalt zeigen (Jugoslawien, Polen, Russland, Sowjetunion, Tschechoslowakei und Ungarn). Eine dritte Gruppe bilden die Herkünfte aus Deutschland, den Niederlanden und der Schweiz, bei denen die Eltern einen höheren DNA-Gehalt im Vergleich zu den Nachkommenschaften nachweisen.

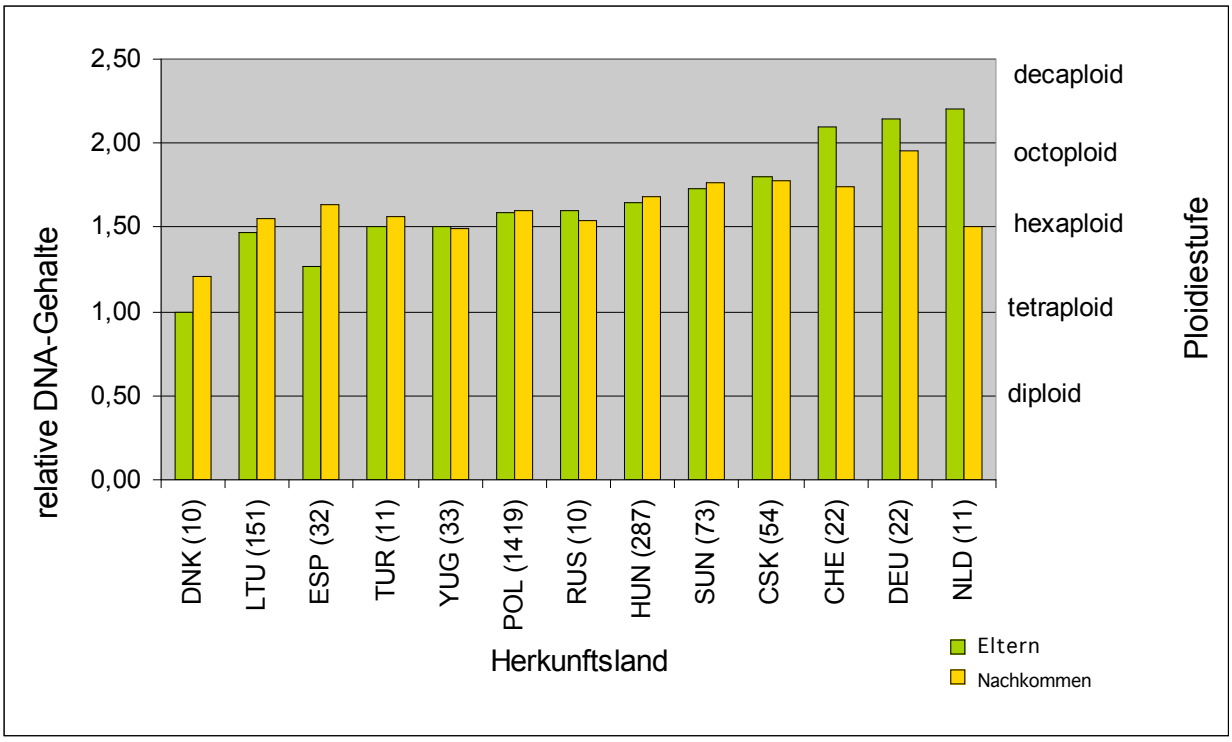


Abbildung 13: Darstellung der relativen DNA-Gehalte bzw. -Ploidiestufen in den europäischen *Poa pratensis*-Herkünften - Ausgangsmaterial (2000/02) und Nachkommenschaften (2002/04); Zahlen hinter den Ländercodes: Anzahl der untersuchten Akzessionen.

Die Korrelationen, die berechnet wurden, um einen möglichen Zusammenhang in den Veränderungen des DNA-Gehaltes von einer Generation zur anderen festzustellen, sind in Abb. 14 dargestellt.

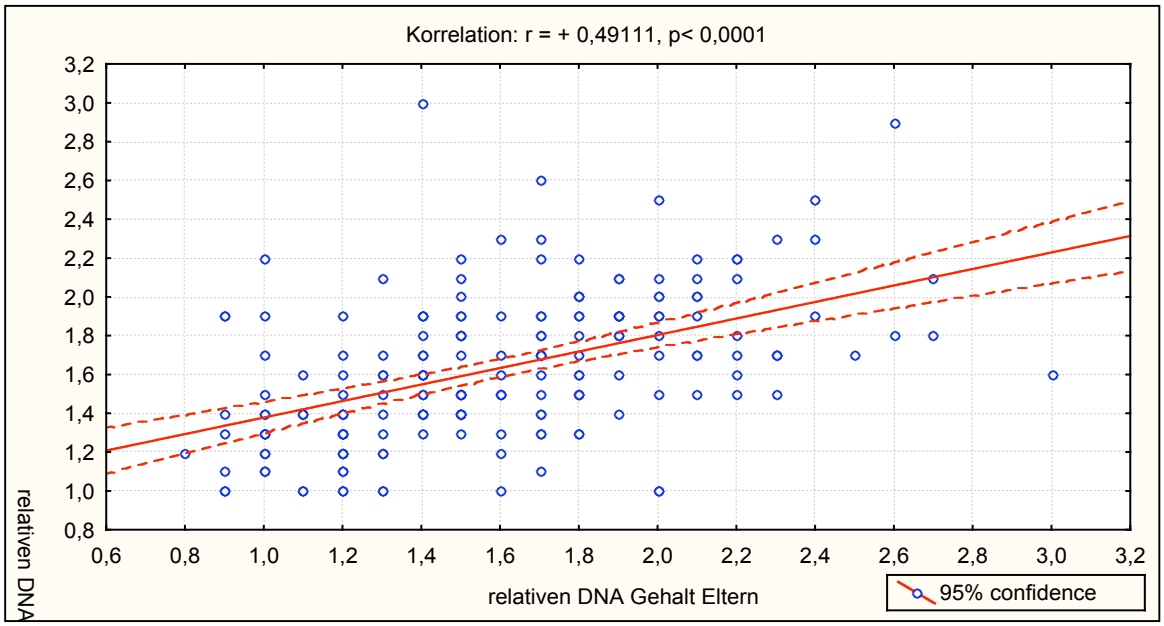


Abbildung 14: Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt der *Poa pratensis*-Akzessionen von Eltern- und Nachkommen-Generation.

Es zeigte sich, dass die relativen DNA-Gehalte der Eltern positiv mit denen der Nachkommenschaften korrelieren, woraus ein signifikanten Koeffizient von 0,49 resultiert. Da dieser Koeffizient relativ niedrig ist, wurde geprüft, ob die Unterschiede in der Ploidie zwischen beiden Generationen signifikant sind. Deshalb wurden die relativen DNA-Gehalte der Eltern mit denen der Nachkommenschaften mittels eines t-Tests separat für jedes Land auf Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse und die Mittelwerte, geordnet nach Herkunftsländern, sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Mittelwerte des DNA-Gehaltes der europäischen *Poa pratensis*-Akzessionen über zwei Generationen und 13 Herkunftsländer. Der t-Test/P-Wert ergibt die Differenzen zwischen beiden Evaluierungsperioden.

Herkunftsland	Eltern		Nachkommen		P (t-Test)
	n	MW	n	MW	
CHE	2	2.10	20	1.74	-
CSK	4	1.80	50	1.77	0,92
DEU	2	2.15	20	1.96	0,45
DNK	1	1.0	9	1,21	-
ESP	3	1.27	29	1.64	0,14
HUN	24	1.65	263	1.67	0,74
LTU	14	1.47	137	1.55	0,50
NLD	1	2.20	10	1.50	-
POL	125	1.58	1294	1.59	0,74
RUS	1	1.60	9	1.54	-
SUN	7	1.72	66	1.76	0,81
TUR	1	1.50	10	1.59	-
YUG	3	1.50	30	1.49	0,97

Für die Länder, aus welchen nur eine bzw. zwei Elternakzessionen vorhanden waren, wurde der t-Test nicht durchgeführt. Bei den restlichen europäischen Ländern waren die Unterschiede beim DNA-Gehalt der Herkünfte zwischen beiden Generationen relativ gering. Die nichtsignifikanten p-Werte des t-Tests deuten darauf hin, dass die Generation keine wesentliche Wirkung auf die Ploidie zeigt.

Um mögliche Unterschiede in der Variabilität des DNA-Gehaltes innerhalb eines Landes zu ermitteln, wurden Variationskoeffizienten erfasst. Die niedrige Anzahl von Elternakzessionen pro Herkunftsland erlaubte dabei jedoch keine Erfassung der Variabilität für beide Generationen. Deshalb wurde der Variationskoeffizient nur für die Nachkommenschaften aus einem Land berechnet und in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Variationskoeffizienten des DNA-Gehaltes für die europäischen *Poa pratensis*-Akzessionen über 13 Herkunftsländer (ermittelte Werte für Nachkommenschaften-Generation).

Herkunftsland	Anzahl Pflanzen	Variationskoeffizient
CHE	20	0,27
CSK	50	0,27
DEU	20	0,16
DNK	9	0,36
ESP	29	0,24
HUN	263	0,25
LTU	137	0,30
NLD	10	0,22
POL	1294	0,30
RUS	9	0,17
SUN	66	0,20
TUR	10	0,17
YUG	30	0,21

Es wurden Variationskoeffizienten von 0,16 bis 0,36 ermittelt. Eine höhere Variabilität im DNA-Gehalt fällt bei den Herkünfte aus nordeuropäischen Ländern Dänemark und Litauen, aber auch bei den Akzessionen aus Polen auf. Die geringsten Koeffizienten wurden für die Herkünften aus Deutschland, Russland und der Türkei festgestellt.

3.4 Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und morphologischen Merkmalen

Alle Akzessionen, deren DNA-Gehalt ermittelt wurde, wurden auch in 22 phänotypischen Merkmalen über zwei Generationen evaluiert. Über eine Korrelation wurde geprüft, ob die Ploidie einen Einfluss auf die Ausprägung bonitierter Merkmale aufweist. Die Korrelationskoeffizienten wurden separat für jedes Merkmal berechnet (Tab. 10).
Die morphologisch-phänotypischen Merkmale ließen auffallend geringe Korrelationen mit dem DNA-Status erkennen. Trotzdem war bei sechs Merkmalen eine gesicherte Beziehung zu finden. Positiv förderte der DNA-Gehalt die Blattmerkmale (Breite und Farbe), Zeitpunkt Rispenschieben und Massebildung. Die Korrelation der allgemeinen Krankheiten und Stand nach Winter ergab einen gesicherten negativen Zusammenhang. Bei den restlichen Merkmalen waren die Korrelationen mit dem DNA-Status nicht signifikant.

Tabelle 10: Korrelation der phänotypischen Merkmale mit dem DNA-Gehalt. Fettgedruckte Werte sind signifikant bei $p < 0,05$.

Merkmal	Korrelationskoeffizient zu relativen DNA-Gehalt
Rost 1.Jahr	0,04
Masse 1.Jahr	0,02
Homogenität der 10 EP im vegetat. Stadium	-0,11
Pflanzendichte	-0,05
Ausläuferbildung	-0,04
Stand vor Winter 1. Jahr	-0,02
Stand nach Winter 2.Jahr	-0,04
Massenbildung vor Rispenschieben	-0,12
Blattfarbe	**0,15**
Blattbreite	**0,13**
Homogenität im generativen Stadium	-0,08
Ausläuferanzahl	-0,11
Zeitpunkt Rispenschieben	**0,13**
Halmtriebdichte	0,07
Rost 2.Jahr	-0,06
Krankheiten allgemein	**-0,17**
Höhe nach Blüte	-0,06
Nachwuchs nach Schnitt	-0,09
Massebildung 2. Jahr	**0,13**
Stand vor Winter 2. Jahr	0,05
Stand nach Winter 3. Jahr	**-0,17**

3.5 AFLP-Untersuchungen bei *Poa pratensis*

Insgesamt wurden 493 *Poa pratensis*-Einzelindividuen mit dem Ziel analysiert, die genetische Variabilität der Art anhand von Akzessionen aus 19 verschiedenen europäischen Ländern sowie aus der Mongolei und Grönland zu untersuchen.. In Vorversuchen wurden die optimalen Reaktionsbedingungen (Konzentrationen, Temperaturprofil, u.a.) für die AFLP-Analyse eingestellt und die Auswahl der Primer vorgenommen. Bei allen 183 Eco/Mse-Primerkombinationen (PKs), die unter unterschiedlichen PCR-Bedingungen getestet wurden, zeigten sich zahlreiche Amplifikationsprodukte, aber keine PK hatte sich bezüglich Bandenzahl, Intensität und Verteilung der Fragmente als optimal erwiesen. Aus den 247 Pst/Mse-Primerkombinationen wurden neun selektiert und auf Reproduzierbarkeit an 46

DNAs von acht Akzessionen getestet (zwei bis vier DNAs/Einzelpflanzen pro Akzession). Von diesen erwiesen sich fünf Primerkombinationen als sehr geeignet für die weiteren AFLP-Analysen. Insgesamt amplifizierten diese fünf PKs bei der Untersuchung aller Akzessionen 182 reproduzierbare Banden, wobei 29 bis 50 Fragmente pro Primerkombination mit einer Größe von 75 bis 484 bp nachgewiesen wurden (Tab. 11).

Tabelle 11: Anzahl und Größe der von den verwendeten PKs detektierten Fragmente.

Primerkombination	Auswertebereich in bp	Fragmentanzahl
P35M68.01	76-427	50
P40M75.04	75-400	33
P40M77.02	79-484	31
P44M48.01	83-438	29
P44M77.02	82-386	39
ausgewertete AFLP-Banden gesamt:		182

Von den AFLP-Daten der 493 Individuen wurde eine binäre Matrix für jede der eingesetzten PK erstellt und die genetischen Distanzen nach Nei 1972 berechnet, ebenso eine Gesamtdistanzmatrix für alle fünf PKs. Die Korrelationen zwischen den Distanzmatrices der einzelnen PKs wurden mittels Manteltest berechnet (Tab. 12).

Tabelle 12: Paarweiser Vergleich der Distanzmatrices der fünf analysierten Primerkombinationen. Fettgedruckte Korrelationen sind signifikant bei den entsprechenden p-Werten.

Primer-kombination	P35M68.01		P40M75.04		P40M77.02		P44M48.01	
	r	p	r	p	r	p	r	p
P35M68.01								
P40M75.04	0,24	0,12						
P40M77.02	0,23	0,12	0,45	0,0086				
P44M48.01	0,41	0,02	0,76	0,0001	0,27	0,07		
P44M77.02	0,30	0,06	0,67	0,0003	0,66	0,0002	0,59	0,001

Es stellte sich heraus, dass die meisten PKs bei Korrelationskoeffizienten zwischen 0,23 und 0,76 signifikant miteinander korreliert sind. Die niedrigste Korrelationen zeigt das Primerpaar P35M68.01, welches nur mit P44M48.01 eine Signifikanz erreicht.

3.5.1 Untersuchungen basierend auf *Poa pratensis*-Einzelpflanzen

Anhand der ausgewählten Primerkombinationen wurde getestet, in welchem Maße die einzelnen *Poa pratensis*-Genotypen miteinander verwandt sind. Die Berechnung der genetischen Ähnlichkeit wurde mit dem Koeffizienten nach Jaccard durchgeführt und mittels UPGMA-Clusteranalyse graphisch dargestellt (siehe Anhang, Abb. I bzw. Ausschnitt in Abb.15). Der Jaccard-Koeffizient variierte von 0,65 bis 1, und wie aus Abbildung 15 zu

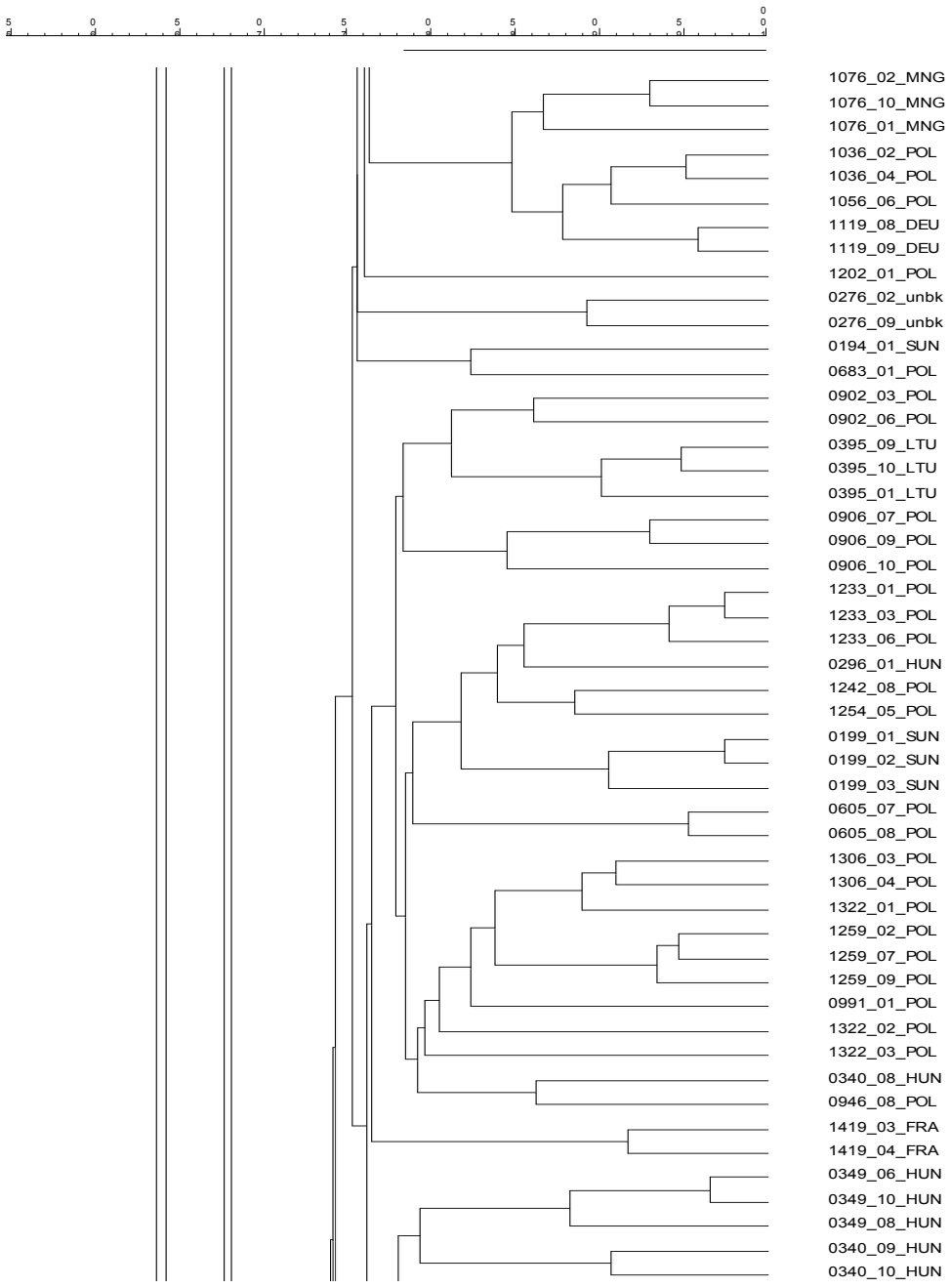


Abbildung 15: Jaccard-Ähnlichkeiten zwischen den europäischen Genbankakzessionen (Ausschnitt aus dem Gesamtphänogramm).

ermitteln ist, wurden die aus dem gleichen Land stammenden Akzessionen nur teilweise in gemeinsame Cluster gruppiert, was für eine hohe Variabilität innerhalb der verschiedenen Länder spricht. Bei genauerer Betrachtung der meist drei analysierten Einzelpflanzen einer Akzession ist erkennbar, dass diese in mindestens 60% der Fälle komplett bzw. in mindestens 76% der Fälle mit der Mehrzahl ihrer Einzelpflanzen zusammengruppieren (Tabelle 13); lediglich bei 10% (drei EPs betrachtet) bzw. 24% der Akzessionen (zwei EPs betrachtet) sind sämtliche Einzelpflanzen separiert.

Tabelle 13: Überblick über die Clusterung der zu den gleichen Akzessionen gehörigen Einzelpflanzen.

untersuchte EP/Akzession	Anzahl Akzessionen	Akzessionen mit $EP_{geclustert}$		Akzessionen mit $EP_{teilgeclustert}$		Akzessionen mit $EP_{ungeclustert}$	
		Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
1	29	_	_	_	_	_	_
2	50	38	76%	_	_	12	24%
3	118	71	60%	35	30%	12	10%

Um einen besseren Überblick über die molekulare Diversität und eine mögliche Strukturierung nach Großregionen bzw. nach Materialstatus zu erhalten – in dem Phänogramm war dies wegen der hohen Anzahl der darin enthaltenen Akzessionen bzw. Einzelpflanzen nicht möglich – wurden die Länder in vier Gruppen eingeteilt und ihre nach Jaccard ermittelten genetischen Ähnlichkeiten in Abb. 16 in drei Dimensionen graphisch dargestellt. Es wurde jedoch erkennbar, dass die Ähnlichkeiten zwischen den Einzelpflanzen keine klare Struktur nach geographischen Großregionen erkennen liessen, auch das gezüchtete Material erlaubte keine eindeutige Gruppenbildung.

3.5.2 Untersuchungen auf Herkunftsebene – Gendiversität innerhalb und zwischen den Ländern

Als Maß für die molekulare Variabilität innerhalb der Länder wurde über eine Zusammenfassung der Einzelpflanzen einer Herkunft die Gendiversität *h* nach Nei (1972) innerhalb der Herkunftsländer ermittelt. In Tabelle 14 sind die Anzahl untersuchter Genotypen und Akzessionen, die Gendiversität und die polymorphen Loci für die einzelnen

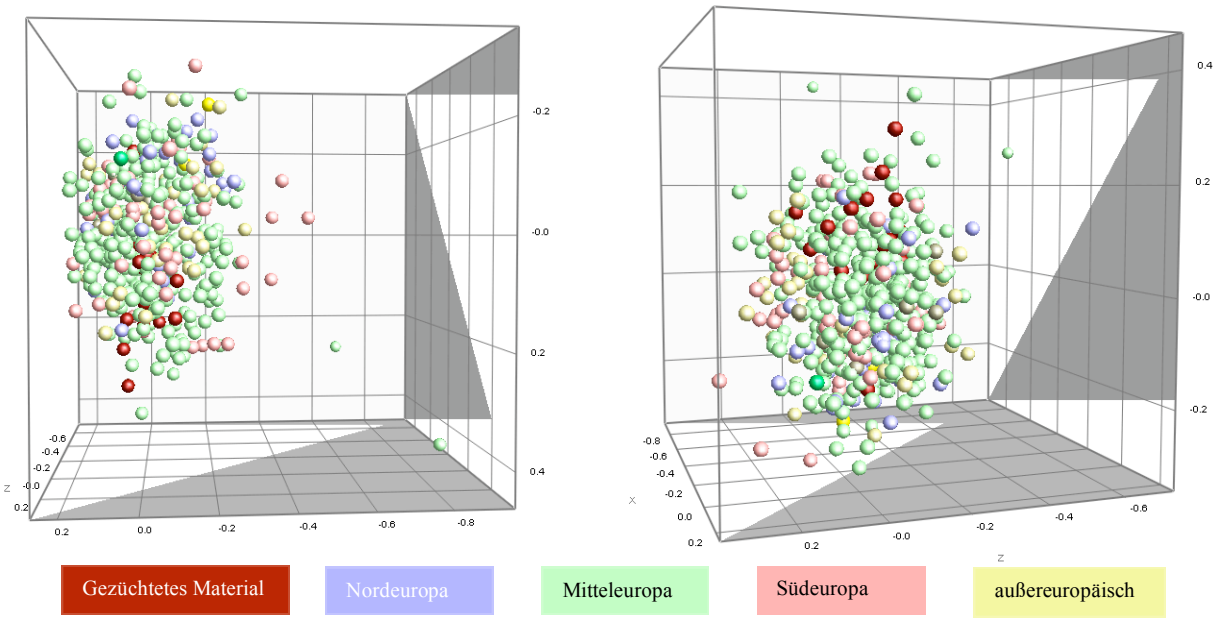


Abbildung 16: Dreidimensionale Darstellung der genetischen Ähnlichkeiten zwischen 493 untersuchten Individuen, ermittelt mit fünf AFLP-Primerkombinationen; farbig unterlegt: geographische Großregionen bzw. Materialstatus.

Tabelle 14: Gendiversität *h* nach Nei (1973) für *Poa pratensis*-Genotypen aus 16 Herkunftsländern. Angegeben sind die Anzahl untersuchter Genotypen und Akzessionen sowie der Anteil polymorpher Loci für jedes Land.

Herkunft	Anzahl Akzessionen	Anzahl Genotypen	Diversität nach Nei	Std.abw.	% polymorphe Loci
CSK	8	15	0,24	± 0,22	60,44
DEU	17	46	0,31	± 0,19	78,02
DNK	3	9	0,22	± 0,22	55,40
ESP	5	12	0,22	± 0,22	54,50
FRA	2	6	0,15	± 0,21	35,16
GBR	1	3	0,10	± 0,18	23,63
GRL	3	8	0,14	± 0,20	33,52
HUN	8	22	0,27	± 0,21	63,19
ISL	2	5	0,11	± 0,19	25,82
LTU	6	18	0,21	± 0,22	48,90
MNG	4	12	0,24	± 0,22	58,24
POL	106	259	0,34	± 0,16	89,56
RUS	6	15	0,18	± 0,21	46,70
SUN	16	24	0,29	± 0,20	70,33
SVK	4	12	0,21	± 0,21	49,45
SVN	8	14	0,24	± 0,21	59,89

Herkunftsländer aufgelistet. Die Länder mit weniger als drei untersuchten Genotypen blieben bei der statistischen Beurteilung der Ergebnisse unberücksichtigt.

Wie zu ersehen ist, unterscheiden sich die einzelnen Länder hinsichtlich ihres Polymorphiegrades. Der Anteil polymorpher Banden variierte zwischen 24% in Großbritannien und 89% in Polen. Die geringste Gendiversität innerhalb eines Landes wurde für das Material aus Großbritannien mit h = 0,10 ermittelt, wobei der Materialumfang hier auch deutlich eingeschränkt war. Eine ähnliche Gendiversität (0,15-0,18) wurde für das aus Russland und Frankreich stammende Material festgestellt. Mit 78-89% polymorphe Loci besaßen die Akzessionen aus Deutschland und Polen die größte Gendiversität (0,31-0,34). Hier wurden große Standardabweichungen festgestellt, welche die hohe Diversität zwischen den Populationen aus einem Land bestätigten.

Um die Unterschiede zwischen den Ländern zu erfassen, sollten die Häufigkeiten der Allele für jedes Land ermittelt werden. Anhand dieser Daten wurde eine Berechnung der genetischen Distanz nach Nei (1972) durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse in einem UPGMA-Phänogramm zeigt Abb. 17.

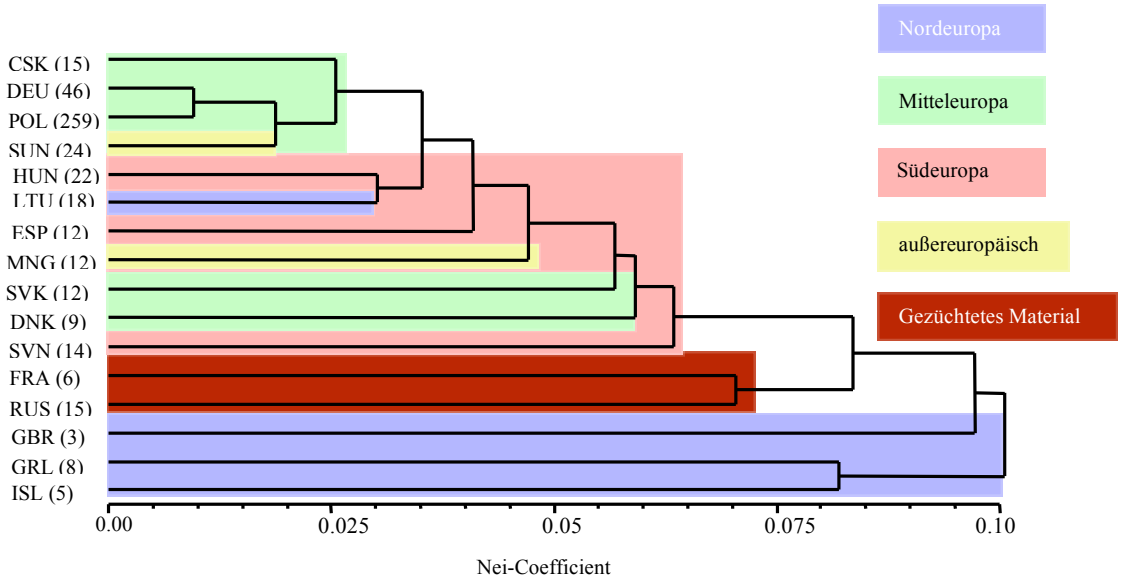


Abbildung 17: UPGMA-Phänogramm von nach Herkunft kombinierten *Poa pratensis*-Genotypen, basierend auf der genetischen Distanz nach Nei (1972) und Auswertung von fünf Primerkombinationen; in Klammern: Anzahl der untersuchten Akzessionen pro Land; farbig unterlegt: geographische Großregionen bzw. Materialstatus.

Die Auswertung der 182 DNA-Fragmente zeigt eine Gruppierung der nördlichen ‚Inselländer' - Grönland, Großbritannien, Island - mit einer großen Distanz zu den kontinentalen Herkünften. Aus Frankreich und Russland stammendes, gezüchtetes Material stellte eine zweite Gruppe dar. Ein drittes Cluster umfasste das Material aus den Nachbarnländern Deutschland, Polen und Tschechoslowakei, aber auch sowjetische Akzessionen. Das südeuropäische Material bildet im Phänogramm keine separate Gruppe, zudem sind neben den Südländern auch Akzessionen aus Mitteleuropa (Dänemark und Slowakische Republik), Nordeuropa (Litauen) sowie der Mongolei zwischen der mitteleuropäischen und der Inselgruppe angeordnet.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt man, wenn die Ähnlichkeiten nach der Rangkorrelation-Methode berechnet werden. In Abbildung 18 sind die Verhältnisse zwischen den Ländern dreidimensional dargestellt.

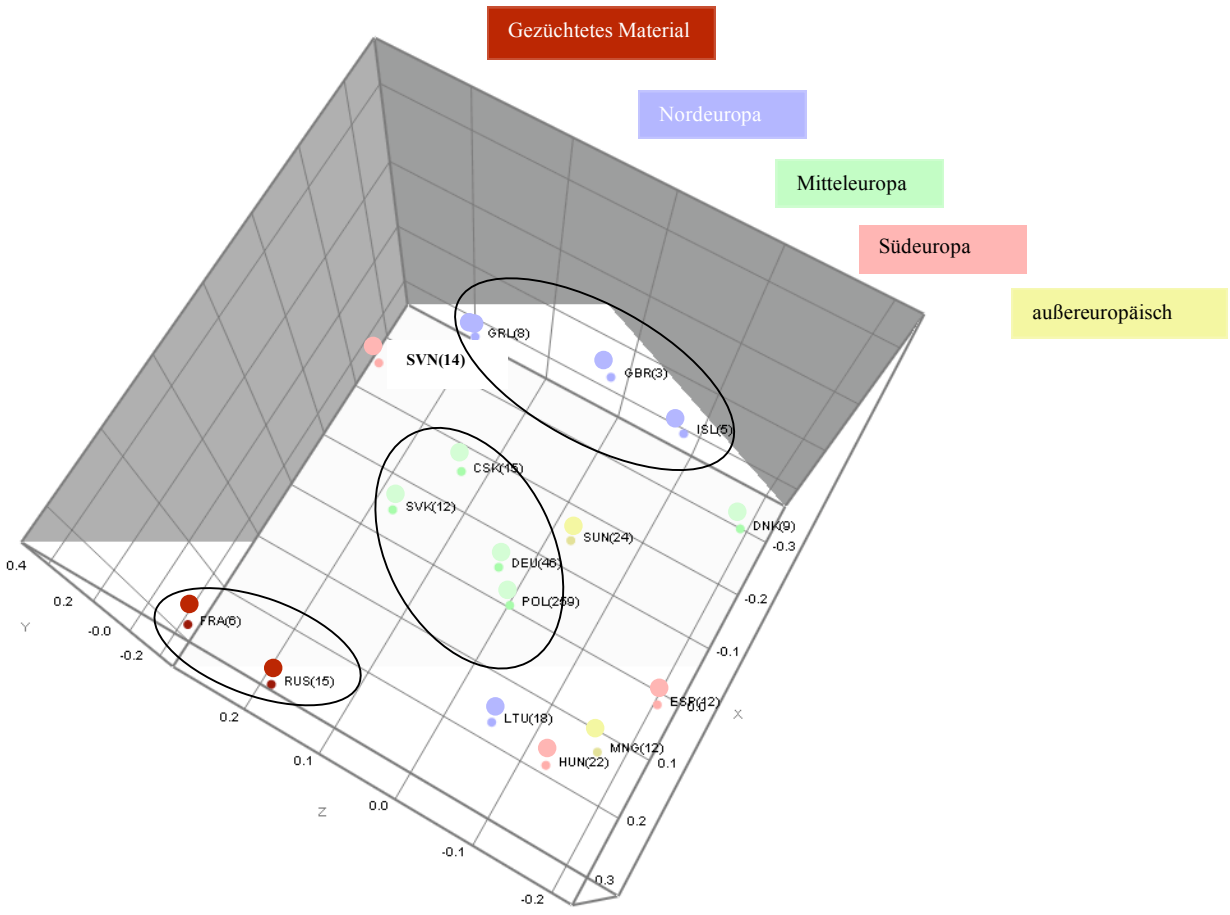


Abbildung 18: Dreidimensionale Darstellung der nach Herkunftsländer kombinierten Genotypen, basierend auf der Rank-Correlation-Methode und Auswertung mit fünf Primerkombinationen; in Klammern: Anzahl der untersuchten Akzessionen pro Land; farbig indiziert: geographische Großregionen bzw. Materialstatus.

Auch hier finden sich die Inseln und das gezüchtete Material in zwei separaten Gruppen wieder. Nebeneinander sind die mitteleuropäischen Länder Deutschland, Polen, Tschechoslowakei und Slowakische Republik platziert. Die restlichen Herkünfte wurden nicht oder unvollständig nach geographischen Großgebieten gruppiert. Darüber hinaus konnte beim Vergleich der untersuchten Ländern kein länderspezifisches AFLP-Fragment gefunden werden.

3.5.3 Hierarchische Populationsstrukturen bei *Poa pratensis*

Die Verteilung des Grades der genetischen Variabilität auf verschiedenen hierarchischen Ebenen wurde über die Variationskomponenten H_t, H_s, und D_{st} nach Nei (1973) ermittelt. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der Analyse von 466 *P. pratensis*-Individuen (neun Genotypen mit unbekannter Herkunft, zwei aus Rumänien, einer aus Kroatien, sowie die 15 russischen Herkünfte wurden nicht in die Analysen der ursprünglich 493 Genotypen mit einbezogen). Entsprechend der Herkunft und der morphologischen Gruppierung der Akzessionen wurden vier geographische Großgebiete definiert. Die Variabilität sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Ländern eines Gebietes, sowie innerhalb und zwischen den geographischen Gebieten wurde berechnet.
Wegen der großen Anzahl der untersuchten polnischen Genotypen, die die Variation beeinflussen könnte, wurde die Analyse der mitteleuropäische Gruppe zweimal durchgeführt (mit den bzw. ohne die aus Polen stammenden Akzessionen; Tab.15).
Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Größe der Gesamtvariation und der Anzahl der untersuchten Genotypen festgestellt. Die hohe Anzahl der polnischen Herkünfte bewirkt nur geringe Unterschiede in der Gesamtvariation. Genau so geringfügig wurden die Anteile dieser Variation innerhalb und zwischen den mitteleuropäischen Ländern beeinflusst. Die höchsten Werte der Gesamtvariation wurden für die Länder aus Südeuropa und Asien ermittelt. In allen geographischen Regionen trugen die Unterschiede innerhalb der Länder den größten Anteil zur Gesamtvarianz bei (61 % in Nordeuropa, 90 % in Asien). Der Anteil der Variation zwischen den Ländern einer Region liegt somit zwischen 10 und 39%.
Auf der Ebene der geographischen Regionen liegen Unterschiede zwischen den Regionen ca. 6% und Unterschiede innerhalb einer Region fast 94% der Gesamtvariation zu Grunde.

Tabelle 15: Verteilung der molekularen Varianz für 466 *Poa pratensis*-Genotypen aus 14 Ländern und vier geographischen Großgebieten.

Geogr, Großgebiet (Länder)	Anz. Geno-typen	Gesamt-variation (H_t)	Anteil Variation zwischen den Ländern (D_{st})	Anteil Variation innerhalb der Länder (H_s)
Nordeuropa (GBR, GRL, ISL, LTU)	34	0,23	39,1%	60,9%
Mitteleuropa (CSK, DEU, DNK, SVK)	83	0,26	13,8%	86,2%
Mitteleuropa (CSK, DEU, DNK, SVK + POL)	342	0,31	16,1%	83,9%
Südeuropa (ESP, FRA, HUN, ROM, SVN,)	54	0,29	34,5%	65,5%
Asien (MNG, SUN)	36	0,30	10,0%	90,0%
Regionen (Nord-, Mittel-, Südeuropa, Asien)	466	0,34	5,9%	94,1%

3.6 Zusammenhang zwischen AFLP- und morphologischen Daten

Der folgende Teil der Auswertung sollte überprüfen, inwieweit die beobachteten genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern mit den Unterschieden in der Morphologie übereinstimmen. Die separate Auswertung der morphologisch-phänotypischen Merkmale (Evaluierung 2000/2002) verlangte einen nach den vier Evaluierungsstandorten getrennten Vergleich mit den AFLP-Daten. Bei der morphologischen Evaluierung wurden die 10 Einzelpflanzen einer Akzession mit einer Boniturnote bewertet. Die AFLP-Analyse wurde an drei Einzelpflanzen pro Akzession und nicht an allen Ausgangsakzessionen durchgeführt. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Anzahlen morphologisch und molekulargenetisch untersuchter Pflanzen bzw. Akzessionen. Die Anzahl Einzelpflanzen und Akzessionen pro Herkunftsland ist in Tabelle 16 getrennt nach Evaluierungsstandorten aufgelistet.

Beim Vergleich der Ergebnisse der morphologisch-phänotypischen Beschreibung mit denen der AFLP-Analyse wurden alle aufgelisteten Akzessionen und Einzelpflanzen betrachtet. Je Evaluierungsstandort wurden morphologische und molekulargenetische Nei-Distanzmatrices erstellt und der statistische Zusammenhang zwischen diesen mit Hilfe eines Mantel-Tests geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Anzahl der *Poa pratensis*-Akzessionen und Einzelpflanzen, welche morphologisch und molekulargenetisch untersucht wurden, aufgelistet nach Evaluierungstandorten; [1)] Anzahl Einzelpflanzen (Morphologie) immer das zehnfache der Akzessionsanzahl.

Standort	Herkunftsland	Anz. Akzessionen (morphologisch)[1)]	Anz. Akzessionen (AFLP)	Anz.Einzelpflanzen (AFLP)
DSV	CSK	11	1	2
	HUN	81	8	22
	LTU	43	6	18
	POL	194	20	49
	SUN	20	3	9
IPK	DNK	40	3	9
	GRL	12	3	8
	ISL	50	2	5
	POL	282	23	53
	SVK	8	4	12
	SVN	12	8	14
NPZ	DEU	66	4	12
	MNG	30	4	64
	POL	198	24	28
SZS	DEU	40	3	9
	FRA	14	2	6
	POL	257	27	76
	RUS	46	5	15

Tabelle 17: Manteltest-Korrelationen aus dem Vergleich der morphologisch-phänotypischen und molekulargenetischen Analysen, getrennt für die vier Evaluierungsstandorte. Die fettgedruckten Korrelationen sind signifikant bei den entsprechenden p-Werten.

Standort	r	p
DSV	**0,86**	0,038
IPK	**0,81**	0,003
NPZ	0,94	0,500
SZS	-0,23	0,325

Die Manteltestverrechnung ergab signifikante Übereinstimmungen zwischen den morphologisch-phänotypischen und den molekularen Distanzmatrices. Bei drei Evaluierungsstandorten (IPK, NPZ, DSV) entsprach die beobachtete morphologische

Ländergruppierung der auf den AFLP-Daten basierenden Gruppierung. Hier wurden Korrelationen zwischen 0,81 und 0,94 festgestellt, wobei der Zusammenhang für zwei Standorte (IPK, DSV) signifikant gesichert war. Die höchste Korrelation zwischen den Distanzmatrices wurde bei dem von der NPZ evaluierten Material festgestellt. Da die Phänogramme für diesen Standort sich aus nur drei Ländern zusammensetzten, konnte diese Korrelation keine Signifikanz erreichen.
Die bei der SZS evaluierten Akzessionen zeigten eine negative, vergleichsweise schwache Korrelation, da die Distanzen nach den phänotypischen Merkmalen zu einer anderen Gruppierung der Länder führten als nach den molekularen Distanzen der AFLPs.

Einen Zusammenhang zwischen AFLP-, morphologisch-phänotypischen Daten und dem DNA-Gehalt konnte nicht geprüft werden. Einerseits wurde der DNA-Gehalt an einer geringeren Anzahl Elternakzessionen pro Herkunftsland bestimmt, anderseits lagen für die Nachkommenschaften keine AFLP-Daten vor.

4 Diskussion

4.1 Morphologisch-phänotypische Feldevaluierungen der Primär- und Sekundäranlage

Im Rahmen einer Primärevaluierung waren 27 Merkmale an mehr als 1600 Akzessionen an vier Evaluierungsstandorten ermittelt worden, um die morphologisch-phänotypische Variabilität in der *Poa pratensis*-Genbankkollektion zu erfassen.
Die erste Analyse der Daten zeigt eine Differenzierung nach Evaluierungsstandorten, obwohl die Genotypen nach dem gleichen Schema gepflanzt, behandelt und bonitiert worden waren. Auch bei Betrachtung nur eines Herkunftslandes (Polen) traten standort-spezifische Untergruppen auf (Abb. 7). Diese Differenzierung kann mit den unterschiedlichen Bedingungen an den vier z.T. mehr als hundert Kilometer von einander entfernt liegenden Evaluierungsstandorten in Verbindung stehen (alle jedoch in der selben Region Deutschlands). Hier sind unterschiedliche Witterungsbedingungen, Fruchtfolge, Bodenbearbeitung und -zusammensetzung, Nährstoff- sowie Konkurrenzbedingungen zu nennen, welche durch Auswirkung auf die Entwicklung der Pflanzen Schwankungen in den Merkmalsausprägungen hervorrufen können. Es ist aber auch zu berücksichtigen, dass trotz

eines übereinstimmenden Bonitur-Schemas die exakten Benotungen von Boniteur zu Boniteur variieren können.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass zumindest die hier ermittelten Unterschiede zwischen den Herkünften auf eine starke Standort- bzw. Boniturerfasserwirkung zurückzuführen sind, was eine Zusammenstellung der Gesamtevaluierungsdaten der Primäranlage nicht gestattet. Insofern – auch über die drei mitgeführten Standardsorten war keine Angleichung möglich - wurde die Analyse der Boniturnoten für alle vier Standorte getrennt durchgeführt.

Die separat für jeden Standort ermittelten Ergebnisse der morpologisch-phänotypischen Evaluierung zeigen, dass bei Betrachtung aller bonitierten Merkmale zusammen eine Gruppierung der Genotypen nach geographischen Großgebieten vorliegt (Nord-, Mittel- und Südeuropa). Diese Gruppierung ist für alle vier Standorte repräsentativ, obwohl an jedem Standort Akzessionen aus verschiedenen Herkunftsländern evaluiert wurden. Die größten morphologisch-phänotypischen Distanzen waren am Standort Malchow/IPK zu ermitteln (0,36), da hier Vertreter aller drei geographischen Großregionen sowie Grünland evaluiert wurden (Abb. 8 A). Die dementsprechend kleinsten morphologischen Distanzen wurden bei der SZS festgestellt (0,12; Abb. 8 D); hier stammte das evaluierte Material aus Herkunftsländern mit kleineren geographischen Distanzen.

Bei den von der DSV evaluierten Genotypen (Abb. 8 C) bildete das litauische Material mit den Akzessionen aus Jugoslawien eine Untergruppe, was mit Hinsicht auf das sowjetische Material überraschte (dieses gruppierte separat). Nach einer Nachfrage über die genauere Herkunft der sowjetischen Akzessionen wurde festgestellt, dass vier Nummern aus Armenien und die restlichen 16 aus Aserbaidschan stammten. Da diese beiden Länder im asiatischen Teil der früheren Sowjetunion liegen, war die große Distanz zu dem litauischen Material zu erklären.

In Übereinstimmung hiermit zeigten Helgadottir & Snaydon (1986) bei phänotypischen Untersuchungen an geographisch getrennten Populationen von *Poa pratensis* (und *Agrostis capillaris)*, dass bei fast allen gemessenen Parametern eine deutliche Variation vorliegt. Die größten Unterschiede ergaben sich dabei aufgrund klimatischer Unterschiede zwischen britischen und isländischen Populationen. Auch die Größe der Variation war nach diesen Untersuchungen an den einzelnen Standorten deutlich verschieden. Auch konnte Neuffer (1989) zeigen, dass sich auch Familiengruppen in *Capsella*-Populationen in wesentlichen Merkmalen wie Blühzeit, Wuchshöhe und Rosettendurchmesser unterschieden; die Anpassungsfähigkeit der weit verbreiteten Art *Capsella bursa-pastoris* scheint somit im

höchsten Maße von verschiedenen lokalen Ökotypen beeinflusst zu werden (Steinmeyer & Wöhrmann, 1985).

Bei den Nachkommenschaften (Sekundärevaluierung) wurden ähnliche geographische Gruppierungen beobachtet. Die Tatsache, dass sich drei (Litauen, Norwegen, Slowakische Republik) von insgesamt 12 untersuchten Ländern nicht in dem ‚entsprechenden' geographischen Cluster befanden (Abb. 9), dürfte vor allem daran liegen, dass die Ausgangsakzessionen der Primärevaluierung frei abgeblüht waren. Da *Poa pratensis* ein Fremdbefruchter ist, sind zufällige Kreuzungen zwischen den Genotypen anzunehmen, was zu der nicht mehr so klaren Differenzierung der Nachkommenschaften geführt haben könnte.
Eine Bestätigung dieser Vermutung zeigten die Ergebnisse der ANOVA-Analyse. Mit dieser wurde geprüft, welche der bonitierten Merkmale die geographische Zuordnung der Herkünfte signifikant beeinflussten. Da es sich beim Ausgangsmaterial meist um originale Genbankakzessionen handelt, zeigten die meisten Merkmale (21 von 26) signifikant unterschiedliche Ausprägungen in den verschiedenen geographischen Großregionen. Bei den Nachkommenschaften dagegen beeinflussten nur fünf der 26 ermittelten Merkmale die Gruppierung der Herkünfte signifikant. Auch bei Betrachtung der Mittelwerte der ermittelten Homogenitätsmerkmale (Homogenität im vegetativen bzw. generativen Stadium) wurde eine stärkere Ausprägung bei den Nachkommenschaften im Vergleich zu den Elternakzessionen festgestellt, was eine Ausprägungsangleichung der bei den Nachkommenschaften betrachteten Merkmale vermuten läßt.

Mit diesen Ergebnissen konnte am Beispiel von *Poa pratensis*-Genbankmaterial gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen morphologisch-phänotypischen Merkmalen und den geographischen Großregionen vorliegt, aus denen die Akzessionen stammten. Dieser Zusammenhang wurde an die selektierten Nachkommenschaften weitergegeben, aber mit einer niedrigeren Anzahl signifikanter Merkmale. Dies bedeutet, dass der Unterschied zwischen den Genotypen aus den verschiedenen geographischen Regionen bei den Nachkommenschaften im Vergleich zu den Eltern bezüglich der Ausprägung ihrer morphologischen Merkmale abgenommen hat.

4.2 Einflüsse der Umwelt auf die Merkmalsausprägung

Im Allgemeinen folgten die morphologisch-phänotypischen Merkmale in beiden Generationen - 150 verklonte und in drei verschiedenen Umwelten (Deutschland, Norwegen

und Portugal) vermehrte Einzelpflanzen (je drei Pflanzen von 50 selektierten Akzessionen) - einem geographischen Muster, was auch durch die relativ hohe Übereinstimmung zwischen beiden Distanzmatrices im Manteltest zum Ausdruck kommt ($r = 0,54$, durch $p = 0,02$ abgesichert).

Jedoch zeigten die signifikanten Ausprägungen der Merkmale eine erhebliche Variation zwischen beiden Generationen. Durch ANOVA wurde festgestellt, dass die ähnliche geographische Gruppierung der Eltern im Vergleich zu den Nachkommenschaften nicht von den gleichen Merkmalen verursacht wird. Die Tatsache, dass bei keinem der ermittelten Merkmale ein gesicherter Einfluss des Vermehrungsstandortes der Elternklone auf die Ausprägung der Nachkommenschaftsmerkmale gefunden wurde, bestätigte die Vermutung, dass die unterschiedlichen Ausprägungen der Merkmale in beiden Generationen auf die zufälligen Bestäubungen zwischen den freiabgeblühten Eltern zurückzuführen sind. Durch diese Kreuzungen ist der Effekt der drei Umwelten auf die Merkmalsausprägungen der Nachkommenschaften nicht erkennbar.

Im Vergleich zur oben diskutierten Gesamt-Primäranlage (Kapitel 4.1) fällt mit 14 von 21 eine niedrigere Anzahl der Elternmerkmale auf, die eine gesichert unterschiedliche Ausprägung nach geographischen Regionen zeigte. Hier jedoch beruht die phänotypische Gruppierung auf der Zusammensetzung aus einer wesentlich niedrigeren Anzahl an Genotypen (50 Akzessionen bzw. 150 Genotypen pro Standort), während im Gegensatz dazu in der Primäranlage je 400 Akzessionen bzw. 4000 Genotypen an den vier Standorten bewertet wurden.

In dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass der geringere Anteil an regionenspezifischer Variabilität in den Merkmalsausprägungen der Nachkommenschaften durch die freien Kreuzungen unterschiedlicher Elterngenotypen verursacht wurde. Dieser Anteil ist gewichtig im Vergleich zur Abhängigkeit der Merkmale von den Umwelten, in denen die Eltern vermehrt wurden. Insgesamt war jedoch in beiden Generationen ein geographisches Muster in der morphologisch-phänotypischen Gruppierung der Herkünfte zu erkennen.

4.3 Ermittlung der Art der Samenbildung

Die Ergebnisse bezüglich der Ermittlung der Reproduktionswege und deren Zusammenhang mit den Herkünften untersuchter Akzessionen via Durchflusszytometrie zeigen, dass im ausgewählten Set (110 Akzessionen verschiedener Herkunft, Mischproben aus 30 Samen je Akzession) sechs Reproduktionstypen vorkommen. Hierbei bestätigte sich die Kenntnis, dass in der selben *Poa pratensis*-Pflanze unterschiedliche Fortpflanzungswege vorliegen können.

Auch Barcaccia et al. (1997a) berichten über eine große Variation in der Reproduktion bei *Poa pratensis*; das reproduktive Verhalten schwankte von nahe obligat parthenogenetisch bis komplett sexuell.

Zur Apomixis gibt es eine Reihe von allgemeinen Übersichtsarbeiten (Nygren, 1967; Nogler, 1984; Asker & Jerling , 1992; Mogie, 1992; Naumova, 1993); andere betreffen die molekularen Mechanismen (Carman, 1997; Bicknell et al., 2000; Noyes & Rieseberg, 2000; Grossniklaus et al., 2001) oder die Problematik apomiktischer Sippen für den Naturschutz (Gregor & Matzke-Hajek, 2002). Jedoch wird die Frage nach dem Umwelteinfluss (Nogler, 1984; Quarin, 1986) und der genetischen Kontrolle der Apomixis immer noch diskutiert. Im Gegensatz zu früheren Annahmen einer monogenen Kontrolle (Savidan, 1980; Voigt & Burson, 1983; Leblanc et al., 1995; Bicknell & Borst, 1996) weisen die neuen Studien polygene Modelle für eine unabhängige Kontrolle der Komponenten Apomeiose und Parthenogenese auf (Noyes & Rieseberg, 2000; Matzk et al., 2001).

Durch intraspezifische Kreuzungen zwischen Genotypen mit verschiedenen genetischen Hintergründen wurde bereits für *Poa pratensis* festgestellt, dass die Apomixis von fünf Genen kontrolliert wird (Matzk et al., 2005). Dieses Modell bestätigt den komplexen Charakter der Apomixis und begründet die in dieser Arbeit festgestellte Variabilität in der Art der Samenbildung der untersuchten *Poa pratensis*-Akzessionen.

Es wurden keine obligat meiotisch-parthenogenetischen und apomeiotisch-sexuellen Typen gefunden. Bei Matzk et al. (2005) traten diese obligat sexuellen und obligat apomiktischen Typen zwar auf, aber nur in sehr geringer Häufigkeit. Eine Erklärung dafür ist, dass die Embryosäcke, die durch Meiose entstehen und sich parthenogenetisch entwickeln, zu einem niedrigen Chromosomensatz tendieren. Entgegengesetzt neigen die durch Apomeiose entstandenen und sich durch Befruchtung entwickelnden Embryosäcke zur höheren Chromosomenzahl. Untersuchungen bei *Poa pratensis* zeigten, dass die Genotypen mit weniger als 18 und mehr als 154 Chromosomen keine Samen mehr bilden (F. Matzk, pers. Mitt.). Entsprechende Änderungen des Erbguts führen zur Sterilität, infolgederer solche Typen nicht stabil bleiben können und nach mehreren Generationen im Zuchtprozess verloren gehen würden. Insofern sollten solche Akzessionen mit Vorsicht in den Züchtungsprogrammen verwendet werden – dies trifft hier auf die Akzessionen zu, die zwar nicht obligat sexuell bzw. obligat apomiktisch sind, bei denen aber in der Samenmischprobe rein sexuelle bzw. apomiktische Typen nachzuweisen waren.

Der Vergleich der Häufigkeiten, mit denen die Reproduktionstypen in den Akzessionen aus den verschiedenen Ländern vorkommen, zeigte Unterschiede in der Verteilung der rein

sexuellen Typen nach geographischen Regionen. Diese Typen wurden in Süd- und Mitteleuropa gefunden, während sie in nordeuropäischen Ländern nicht bzw. kombiniert mit Apomikten auftraten. Die Kombination apomiktisch und reduziert parthenogenetisch war hingegen verstärkt in Nordeuropa zu finden.
In der Literatur wird die nördliche Verbreitung von Pflanzenarten, bei denen Apomixis auftritt, hauptsächlich auf deren Bestäubungsunabhängigkeit zurückgeführt. Die Pseudogamie kann für eine Pflanze von Vorteil sein, da erstere eine erfolgreiche Samenproduktion sichert, falls die Befruchtung nicht erfolgen kann (F. Matzk, pers. Mitt.). Eine andere Aussage ist, dass bei verschiedenen Pflanzenarten die nördlichen Populationen durch Einwanderung aus dem Süden entstanden sind (Reese, 1958). Die Embryoentwicklung ohne Befruchtung ergäbe mehr Konkurrenzvorteile der Apomikten im Vergleich zu den sexuellen Typen, dadurch könnten sich diese im Norden schneller verbreitet und etabliert haben.
Allerdings sind diese Befunde für Apomikten der Art *Poa pratensis* nicht zutreffend, da ihre Embryonen ohne eine Befruchtung der Zentralzelle nicht lebensfähig sind. Daher dürfte der Konkurrenzvorteil der *Poa*-Apomikten im Norden nicht auf der Bestäubungsunabhängigkeit, sondern auf dem Vorhandensein von genotypisch besser angepassten Material unter den Apomikten beruhen, welches durch schnellere Etablierung und muttergleiche Vermehrung in nachfolgenden Generationen eine Maximierung des Populationswachstums der entsprechenden Genotypen erzielen kann.

4.4 Untersuchungen zur Ploidiestufe

Bei der Bestimmung des relativen DNA-Gehalts an 188 Ausgangsakzessionen und an 1947 Nachkommenschaften derselben Ausgangsakzessionen wurde eine hohe Variation im DNA-Gehalt festgestellt, was mit den Befunden vorangegangener Untersuchungen an *Poa pratensis* übereinstimmt (Huff et al, 1993; Barcaccia et al., 1997a; Eaton et al., 2004).
Beim Vergleich des DNA-Gehalts der Eltern mit dem der Nachkommen wurden Unterschiede bei sieben von 13 untersuchten Ländern festgestellt. Die Signifikanz konnte bei fünf von diesen Ländern wegen der zu niedrigen Anzahl an untersuchten Elternakzessionen nicht geprüft werden. Die festgestellten Unterschiede lassen kein geographisches Muster erkennen und könnten auf die verschiedenen Reproduktionswege bei *Poa pratensis* zurückzuführen sein. Eine andere Ursache könnte die Befruchtung durch Bestäuber mit verschiedenen Ploidiestufen sein, was beim freien Abblühen der Ausgangsakzessionen nicht auszuschließen ist. Die festgestellten Unterschiede waren bei der hohen Heterozygotie, Polyploidie und der Aneuploidie bei *Poa pratensis* zu erwarten.

Bei Betrachtung der Variabilität des DNA-Gehaltes nach Herkünften wurden höhere Variationskoeffizienten für polnische Akzessionen, aber auch in Material aus Dänemark und Litauen festgestellt. Die hohe Variabilität in den polnischen Herkünften könnte durch ihre extrem hohe Anzahl im Vergleich zu den Herkünften aus den anderen Ländern begründet sein. Die festgestellte hohe Variabilität in den nördlicheren Herkunftsländern stimmte mit den Ergebnissen der Ermittlung der Art der Samenbildung überein. In Nordeuropa war die Kombination apomiktisch und reduziert parthenogenetisch im Vergleich zu den mittel- und südeuropäischen Herkünften verstärkt zu finden. Beide Reproduktionswege führen zur Polyploidie, welche zur Variabilität im DNA-Gehalt führt. Dass Apomixis eine Voraussetzung für die Polyploidie ist, wurde für einige Arten wie z. B. *Taraxacum*, *Hieracium*, *Eragrostis*, *Antennaria* berichtet (Carman, 1997). Für die *Taraxacum*-Populationen berichten Van Der Hulst et al. (2003) zudem, dass die Apomikten verstärkt in Nordeuropa zu finden waren und triploide sowie noch höhere Ploidiestufen aufwiesen.

4.5 Zusammenhang DNA-Gehalt - morphologisch-phänotypische Merkmale

Für jedes morphologisch-phänotypische Merkmal wurde durch Berechnung der Korrelation separat überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Merkmalsausprägung und der Ploidiestufe vorliegt, und ob sich daraus eine zuverlässige Bestimmung der Ploidie ableiten lässt.

Studien bei anderen Gräsern, z.B. *Festuca arundinacea* (Ceccarelli et al., 1992) und *Dactylis glomerata* (Creber et al., 1994), berichteten, dass die Ploidie intraspezifisch mit geographischer Verbreitung, Höhenverbreitung und Jahresmitteltemperatur korrelierte. Speckmann & Dijk (1972) hingegen untersuchten eine niederländische *Poa pratensis*-Kollektion und konnten keine Korrelationen zwischen morphologischen Merkmalen und Chromosomenanzahl bzw. DNA-Gehalt feststellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Korrelationen zwischen DNA-Gehalt und den morphologisch-phänotypischen Merkmalen sind gering. Trotzdem lassen die Ergebnisse einige Zusammenhänge erkennen. Es wurde eine signifikant positive Beziehung zwischen dem DNA-Gehalt, den Blattmerkmalen (Breite und Farbe), Zeitpunkt Rispenschieben und Massenbildung festgestellt. Ähnliche Ergebnisse berichten Sugiyama et al. (2002), die positive signifikante Korrelationen zwischen dem DNA-Gehalt und der Größe der Blätter bei *Lolium perenne* schilderten. Diese Korrelationen waren unter der Annahme zu erwarten, dass mit der Zunahme des DNA-Gehaltes eine Erhöhung der Zellgröße (Stebbins, 1971) bzw.

allgemein „Gigantismus“ (Müntzing, 1936) zu stande kommt. Daneben sind eine Verlängerung des minimalen mitotischen Zellzyklus’, der Meiose, der Rate und Dauer der DNA-Synthese sowie letztendlich der minimalen Generationszeit festzustellen (Bennett, 1972), was die Korrelation des Zeitpunkts Rispenschieben mit dem DNA-Gehalt erklären könnte. Insgesamt sind jedoch die Korrelationen zwischen DNA-Gehalt und Blattbreite bzw. –farbe, Massenbildung und Zeitpunkt Rispenschieben zu gering, um damit gesicherte Rückschlusse auf die Ploidie der Pflanzen machen zu können.
Des weiteren wurde ein negativer Zusammenhang der Ploidie mit Krankheitsbefall und Stand nach Winter festgestellt. Da diese zwei Merkmale zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt wurden und der gesicherte Zusammenhang mit der Ploidie nicht immer festzustellen war, soll dies hier nicht weiter diskutiert werden.

4.6 AFLP-Untersuchungen bei der Wiesenrispe

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten fünf Primerkombinationen lieferten insgesamt 182 auswertbare Banden. Die Bandenanzahl - je nach Primerkombiantion zwischen 29 und 50 Banden bei jeweils sieben selektiven Basen - liegt im oberen Bereich der bei dieser Methode erwarteten Größenordnung. Baker (2000) gibt an, dass durchschnittlich 20-40 verwendbare Banden pro AFLP-Primerkombination erreicht werden. Renganayaki et al. (2001) werteten bei ihrer AFLP-Charakterisierung von *Poa arachnifera*-Genotypen 12 bis 50 Banden pro Primerkombination aus (je sechs selektive Basen). Larson et al. (2001) beschrieben mittlere Bandenzahl von 39 AFLP-Fragmenten pro Primerkombination bei *Poa secunda* bzw. 52 bei *Poa fendleriana*, welche ebenfalls auf sechs selektive Basen beruhten. In Untersuchungen an Deutschem Weidelgras wurden mit Hilfe von drei Primerkombinationen insgesamt 72 informative Banden generiert verwendet (Peakall et al., 1995a). In der selben Art untersuchte Kalb (2004) anhand von drei *Pst*I/*Mse*I-Primerkombinationen mit vier bis sechs selektiven Nukleotiden je zwei Ramsche von 84 Abstammungen bzw. Genbankakzessionen; dabei konnte sie aufgrund der gemeinsamen Gruppierung stets die Ramsche der selben Abstammung identifizieren.
Die hohe Reproduzierbarkeit der AFLP-Analysen konnte durch das übereinstimmende Auftreten der *Poa*-Bandenmuster in den Wiederholungen bestätigt werden; dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein (Vos et al., 1995; Jones et al., 1997; Zhang et al., 1999; Hawthorne, 2001; Nissim et al., 2004).

Bezüglich der Anzahl an zu verwendenden Primerkombinationen zeigten Cambrell et al. (2003), dass schon nur eine geeigntete Primerkombination die Zuordnung verschiedener Populationen möglich macht. Andere Untersuchungen zur genetischen Diversität erfolgten mit drei bis fünf AFLP-Primerkombinationen und 165 bis 765 polymorphen Banden (Sharma et al., 2000; Cresswell et al., 2001; Ubi et al., 2001; Gilbert et al., 2002; Nissim et al., 2004). Somit bewegen sich auch die hier angewandten fünf Primerkombinationen in diesem Rahmen, wobei aufgrund der teilweise nicht sehr hohen Korrelationen zwischen ihnen (23%-76%) eine Redundanz ausgeschlossen werden kann, jede Primerkombination trägt insofern zusätzliche Informationen zum Gesamtbild bei.

4.6.1 Untersuchungen an *Poa pratensis*-Einzelpflanzen

Die mittels Jaccard-Koeffizient detektierten genetischen Ähnlichkeiten variieren bei den hier untersuchten 493 *Poa pratensis*-Individuen von 0,54 bis 1,0. Vergleichbare Ähnlichkeitswerte berichten Studien an den anderen fremdbefruchtenden Gräsern (Roldan-Ruiz et al., 2000 bei *Lolium perenne*; Larson et al., 2000 bei *Pseudoroegneria spicata*; Larson et al., 2001 bei *Poa sandbergii*; Karaca et al., 2002 bei *Cynodon*; Wu et al., 2004 bei *Cynodon dactylon* var. *dactylon*).

Die zumindest teilweise und in mehr als drei Vierteln der Fälle auftretende gemeinsame Gruppierung der bis zu drei Einzelpflanzen einer Akzession im UPGMA-Phänogramm zeigte, dass trotz der genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Herkünften der Großteil in sich ähnlich ist und von anderen Akzessionen abgegrenzt werden kann. Jedoch deutete die nur ansatzweise zu beobachtende Anordnung von Akzessionen aus dem gleichen Herkunftsland nebeneinander und somit das Fehlen von separaten Länder- bzw. Großregion-Gruppen (sowohl im Phänogramm als auch in der Hauptkoordinaten-Analyse) darauf hin, dass bereits innerhalb der Länder relativ hohe Diversitäten vorliegen und keine weitere Struktur der Verwandtschaftsverhältnisse erkennbar ist.

4.6.2 Gendiversität innerhalb und zwischen den Ländern, Populationsstrukturen

Bei der Zusammenfassung der Akzessionen nach Herkunftsländern und dem separat ermittelten Anteil polymorpher Banden je Land wurden erwartungsgemäß Unterschiede festgestellt, wobei in den einzelnen Ländern 24-90% der ausgewerteten Banden polymorph waren. Dies zeigt eine gute Übereinstimmung mit Ergebnissen bei anderen windbestäubenden

Gräsern. Renganayaki et al. (2001) untersuchten die genetische Diversität von *Poa arachnifera*-Genotypen und stellten 23-85% polymorphe Banden fest. Für *Lolium perenne* ermittelten Bolaric & Posselt (1999) Polymorphiegrade von 88% für Ökotypen und 95% für Sorten. Studien bei insektenbefruchtenden Arten berichteten über einen niedrigeren Anteil der polymorphen Fragmente. So beschrieben Martin et al. (1997) die genetische Variabilität in einer spanischen *Erodium paularense*-Populationen und fanden, dass 44% bis 51% der Fragmente polymorph sind. Bei *Allium aaseae* als weiterer, insektenbefruchter Art stellten Smith & Pham (1996) fest, dass 40-63% der Banden polymorph waren.

Die Gendiversität *h* nach Nei (1973), die neben dem Anteil polymorpher Banden als Parameter für die genetische Diversität jedes Landes ermittelt wurde, reichte bei Betrachtung einzelner Herkunftsländer von 0,10 in Großbritannien bis 0,34 in Polen bei einer durchschnittlichen Diversität von 0,22. Dies stimmt gut mit Beobachtungen von Mengistu et al. (2000) überein. Sie untersuchten 1357 *Poa annua*-Individuen aus 47 Populationen und stellten via RAPD-Analysen eine mittlere Gendiversität von 0,24 fest, wobei diese von 0,11 bis 0,29 variierte. Bei Isozymanalysen des Deutschen Weidelgrases wurden Gendiversitätsgrade von h = 0,27 (Charmet et al., 1993), 0,30 (Loos, 1994) und 0,23 (Fernando et al., 1997) geschätzt.

Schoen & Brown (1991) untersuchten die genetische Diversität in acht selbstbefruchtenden und neun fremdbefruchtenden Arten und fanden eine mittlere Gendiversität von h = 0,12 (min h = 0,01, max. h = 0,29) für Selbstbefruchter und h = 0,26 (min h = 0,17, max. h = 0,33) für fremdbefruchtenden Arten.

Bei den in eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnissen ist eine etwas geringere Gendiversität in den nördlichen Inselnländern zu beobachten (0,10-0,14), was einer geringeren Allelvariation entspricht. Ähnliches wurde in der Literatur z.B. für Baumarten beschrieben: Zanetto & Kremer (1995) interpretierten die Muster der geographischen Variation von *Quercus*-Allelfrequenzen als Ergebnis der postglazialen Wanderung. Leonardi & Menozzi (1995) untersuchten 20 Populationen von *Fagus sylvatica* auf Enzym-Polymorphismen und stellten höhere Allelvariation in den Südpopulationen fest. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die nördlichen Populationen durch Einwanderung aus dem Süden entstanden waren. Storme et al. (2004) analysierten *Populus nigra*-Akzessionen aus neun Forst-Genbanken und berichteten über größere Variabilität in in südeuropäischen Regionen gesammeltem Material.

Eine andere Erklärung könnte die Beeinflussung der Insel-Genpools durch Inzucht sein, welche zu einer Zunahme der Anzahl homozygoter Individuen führt. Solche Beeinflussung wurde schon früh bei Kulturpflanzen (Neal, 1935; Wright, 1977) und später auch bei einigen Wildpflanzen nachgewiesen (Schemske, 1983; Ganders & Ritland, 1987; Schoen & Brown, 1991). Obwohl der Grad der Inzuchtdepression von den Umwelteinflüssen (Barrett & Kohn, 1991) und dem Lebenszyklus der Pflanzen (Charlesworth et al., 1987; Husband & Schemske, 1996; Byers & Waller, 1999) abhängig ist, leiden die kleineren, isolierten Populationen oft an größeren Inzuchtdepressionen (Hamrick & Godt, 1989; Fischer & Matthies, 1998; Menges & Dolan, 1998; Booy et al., 2000). Somit könnte die niedrigere Gendiversität der Inselländer im Vergleich zu der höheren in Süd- und Mitteleuropa erklärt werden. Auch die apomiktische Vermehrung von *Poa pratensis*, welche in den nördlichen Ländern stärker verbreitet ist, könnte eine zusätzliche Homogenität in den Populationen ausgelöst haben.
Die Beurteilung einer Tendenz der pro Land ermittelten Gendiversität wird durch die großen Unterschiede in der Anzahl an untersuchten Einzelpflanzen bzw. Akzessionen pro Herkunftsland erschwert, was zu zufallsbedingten Ergebnissen geführt haben könnte. Es ist zu berücksichtigen, dass die Standardabweichungen bei Berechnung der Gendiversitätswerte meistens größer waren als die für das Land festgestellte Gendiversität. Dies macht offensichtlich, dass eine hohe genetische Diversität zwischen den Individuen aus dem gleichen Herkunftsland vorliegt.

Bei der Erfassung der zwischen den Ländern vorhandenen Diversität, die durch die Kombination der Genotypen nach Herkunftsländern, Ermittlung der Allel-Häufigkeiten für jedes Land sowie den Vergleich miteinander erfolgte, zeigten sowohl im Phänogramm als auch in der dreidimensionalen Datstellung (bzw. mit den beiden zugrunde liegenden Auswerteverfahren) herkunftsbedingte Übereinstimmungen bei den AFLP-Gruppierungen (Abb. 17 und 18): die Inselländer Großbritannien, Grönland und Island lassen sich von dem kontinentalen Material abgrenzen. Auch dies könnte vor allem daran liegen, dass durch die geographische Isolation die Möglichkeiten für einen Genaustausch relativ gering sind.
Das im Phänogramm gemeinsam gebildete, separate Cluster der Herkünfte aus Frankreich und Russland könnte auf eine gemeinsame Zuchtgeschichte zurückzuführen sein. Die Akzessionen wurden auf Masse für Futtersorten gezüchtet, hatten aber keine Sortenzulassung erreicht. Die genetischen Unterschiede dieser Akzessionen im Vergleich zum Genbankmaterial könnten durch den Selektionsprozess hervorgerufen worden sein. So analysierten Nissim et al. (2004) die genetische Diversität in sieben *Anemone coronaria*-

Wildpopulationen aus Israel im Vergleich mit Individuen der Sorte „Mona-Lisa“. Die Autoren fanden die höchste genetische Distanz zwischen dem Wildmaterial und den Genotypen der Sorte. Auch Kölliker et al. (1998) finden eine klare Differenzierung von *Festuca pratensis*-Sorten von den Naturpopulationen.

Die beobachtete Phänogramm-Gruppierung von sowjetischen Akzessionen mit Akzessionen aus den zentraleuropäischen Ländern Deutschland, Polen und Slowakische Republik ist vermutlich durch die Sammlungs- und Vermehrungshistorie bedingt: bei einer entsprechenden Nachfrage wurde festgestellt, dass diese Akzessionen von einer tschechischen Expedition im asiatischen Teil der Sowjetunion gesammelt worden waren. Danach wurden diese mehrmals in der tschechischen Genbank vermehrt und dort gelagert. Bei diesen Zwischenvermehrungen waren die Pflanzen frei abgeblüht, wobei die Möglichkeit für einen Genaustausch mit den hauptsächlich einheimischen (= tschechischen) Genotypen bestand – was die Clusterung der sowjetischen und tschechischen Herkünfte in derselben Gruppe erklärt.

Das Cluster aus südeuropäischem Material ist weniger eindeutig, da hier neben den südeuropäischen Herkünften auch Akzessionen aus der Slowakischen Republik, Dänemark, Litauen sowie der Mongolei eingeschlossen sind. Die Ähnlichkeiten in der genetischen Struktur zwischen den mongolischen und den europäischen Akzessionen könnten das Ergebnis von deren Zwischenvermehrung in Deutschland sein: Nach einer Sammlungsreise im Sommer 1971, während der diese Akzessionen in der Mongolei als Pflanzen gesammelt worden waren, erfolgte die Verteilung des Materials zwischen den Genbankstandorten Gülzow und Gatersleben zur Vermehrung und Untersuchung. Dabei könnte ein Genaustausch stattgefunden haben.

Sowohl das aufgrund der geographischen Herkunft unerwartete Gruppieren der ungarischen mit den litauischen Herkünften als auch das der Akzessionen aus Dänemark mit der Südgruppe könnte auf zweierlei Gründe zurückzuführen sein. Zum einen könnten die geringeren genetischen Unterschiede als erwartet mit einem nicht auszuschließenden Pflanzen- oder Samenaustausch zwischen den betroffenen Ländern erklärt werden. Zum anderen kann die zufällige Auswahl des Sortiments an zu untersuchenden Genotypen einen entscheidenden Einfluß auf die Analyse gehabt haben (Knaak, 1996). Bei Analyse der genetischen Diversität in den zwei fremdbefruchtenden Grasarten *Lolium perenne* und *Agrostis curtisii* stellten Warren et al. (1998) fest, dass die genetische Distanz bei *Agrostis curtisii* mit steigenden Abstand zwischen den Regionen zunahm. Dagegen konnte dieser Zusammenhang bei *Lolium perenne* nicht festgestellt werden. Eine Erklärung der Autoren war der hohe Genaustausch durch den menschlichen Einfluss, da diese Grasart größere

landwirtschaftliche Bedeutung hat. Aber auch bei *Poa sandbergii* wurde eine sehr geringe Differenzierung zwischen den Populationen festgestellt. Die Autoren berichteten über hohen Genaustausch zwischen Populationen, die in einem Abstand von 600 km gesammelt worden waren (Larson et al., 2001). Dabei gibt es für die einzelnen Arten jedoch kaum genaue Informationen, in welchem Ausmaß die Bestäubung über bestimmte Distanzen Effekte zeigt. Somit ist auch die Wirksamkeit des Genflusses bei den einzelnen Arten in den meisten Fällen unbekannt. Es läßt sich somit oft nicht mit Sicherheit sagen, ob und wie stark die natürlichen Populationen voneinander isoliert sind.

Generell wurden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hinsichtlich der genetischen Populationsstruktur durch Studien an anderen Arten mit Hilfe verschiedener Markersystemen bestätigt: Mit Hilfe von AFLPs differenzierten Wu et al. (2004) aus elf Ländern bzw. von vier Kontinenten stammende *Cynodon dactylon*-Akzessionen. Zeid (2003) untersuchte 79 aktuelle Elite-Inzuchtlinien der Fababohne (*Vicia faba* L.) aus Asien, Europa und Nordafrika und berichtete, dass das Muster der genetischen Ähnlichkeiten zwischen den Gruppen von Inzuchtlinien diese entsprechend ihrer geographischen Herkunft gruppierte. Anhand von sieben RAPD-Markern differenzierten Huff et al. (1993) vier Populationen des Büffelgrases *Buchloe* aus Mexiko und Texas. Ebenfalls mit RAPD-Markern unterschieden D'ennequin et al. (1997) die europäischen und tropischen Herkünfte von 34 *Allium cepa* Akzessionen. Okada (2002) untersuchte die genetische Diversität und Populationsstruktur in 60 *Ranunculus japonicus*-Populationen aus Südwestjapan und stellte hohe signifikante Korrelationen zwischen den geographischen Distanzen und der genetischen Struktur fest. Zhao et al. (2005) untersuchten die Diversität in zwei großen Kollektionen von *Brassica rapa*-Akzessionen verschiedener Herkunft und berichteten, dass trotz morphologischer Unterschiede innerhalb der Region – welche keine Gruppierung (auch keine regionenspezifische) erlaubten - das AFLP-basierte Phänogram ostasiatische von europäischen Herkünften trennte.

Verantwortlich für die Größe und Verteilung der genetischen Variation einer Art sind die geographische Verbreitung, die Lebensform, Mechanismen der Samenausbreitung und die Befruchtungssysteme (Hamrick et al., 1979; Loveless & Hamrick, 1984). Aus dem Vergleich des Datenmaterials von Untersuchungen der Variation von Isoenzymen verschiedener Pflanzenarten konnten allgemeine Zusammenhänge zwischen der Größe der genetischen Variation und der Ökologie von Arten abgeleitet werden (Hamrick & Godt, 1989; Hamrick 1991). Im Durchschnitt verteilte sich bei Pflanzen 78% der Variation innerhalb der Populationen und nur 22% zwischen den Populationen. Genetisch variable Arten haben in der

Regel auch hohe Variationen innerhalb von Populationen, jedoch geringere Variationen zwischen Populationen. Arten mit insgesamt geringerer Variation haben dagegen im Allgemeinen geringere Variation innerhalb und größere Variation zwischen Populationen.
In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung des Grades der genetischen Variabilität bei der Wiesenrispe, deren Pollenausbreitung durch Wind geschieht, auf verschiedenen hierarchischen Ebenen untersucht. Entsprechend der Herkunft und der morphologischen Gruppierung der Akzessionen wurden vier geographische Großgebiete definiert. Die für *Poa pratensis* festgestellten Variationswerte innerhalb als auch zwischen den einzelnen Ländern eines Gebietes, sowie innerhalb und zwischen den geographischen Großregionen befinden sich in der erwarteten Größenordnung und entsprechen dieser für windbestäubte, langlebige und genetisch variable Arten.

So lässt sich auf der Ebene der geographischen Regionen die Gesamtvariation zu 6% auf Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen und zu 94% auf Unterschiede innerhalb einer Region zurückführen. In allen geographischen Regionen tragen die Unterschiede innerhalb der Länder den größten Anteil der Gesamtvarianz (zwischen 60% in den Nordländern und 90% in Asien). Der Anteil der Variation zwischen den Ländern einer Region liegt zwischen 10% und 39%. Aufgrund der genetischen Struktur von Fremdbefruchterpopulationen sind sowohl *Poa pratensis*-Sorten als auch -Ökotypen als heterogene Populationen zu betrachten. Wegen ihrer Heterogenität haben die genetischen Unterschiede auf der Individuenebene den größten Einfluß auf die genetische Variabilität (Hamrick & Godt, 1989). Dieser Sachverhalt wurde von Allard & Bradshaw (1964) als eine Anpassung der Populationen an die extrem variablen Umweltbedingungen erklärt.
Bei anderen Grasarten decken sich die hier festgestellte Größenordnung mit den in der Literatur vorliegenden Angaben. So z.B. fanden Kölliker et al. (1998), dass sich 71% der Gesamtvariation innerhalb und 20% zwischen *Festuca pratensis*-Populationen aus einer Region verteilten. Der Anteil der Variation zwischen den Regionen betrug nur 9%. Mengistu et al. (2000) berichteten, dass 87% der Variation innerhalb und nur 2% zwischen den *Poa annua*-Populationen einer Region entstanden. Der Anteil der Variation zwischen den Regionen belief sich auf 8%. Bei *Hordeum spontaneum* lag mit 75% ein großer Teil der Variation innerhalb der Populationen, gefolgt von 24,5% zwischen den Populationen einer Region und 0,5% zwischen den Regionen (Baum et al., 1997). Huff et al. (1993) berichteten für das fremdbefruchtenden Gras *Buchloe dactyloides*, dass 70-80% der Gesamtvarianz innerhalb der Populationen festzustellen war.

Es ist bekannt, dass die Selbstbestäuber die größte Variation zwischen den Populationen aufweisen, gefolgt von tierbestäubten und windbestäubten Arten (Govindaraju, 1988; Hamrick & Godt, 1989; Wingender, 2000; Sun & Wong, 2001); kurzlebige Pflanzen haben eine größere Variation zwischen den Populationen als Langlebige (Hamrick & Godt, 1989; Hamrick, 1991). Im Detail konnten z.B. Wolff et al. (1994) bei zwei *Plantago*-Arten den Zusammenhang von genetischer Variation und dem Befruchtungssystem der Arten darstellen. Bei der stark selbstbefruchtenden Art *Plantago major* zeigten sich innerhalb von Populationen geringe, aber zwischen Populationen große Unterschiede. *Plantago coronopus* mit gemischtem Befruchtungssystem wies ein intermediäres Verhalten auf. Scacchi et al. (1991) untersuchten drei *Cephalanthera*-Arten mit verschiedenen Befruchtungssystemen und stellten ebenfalls Unterschiede in der genetischen Variation fest. Gabrielsen et al. (1997) berichteten über einen höheren Anteil genetischer Variation innerhalb von skandinavischen *Saxifraga oppositifolia*-Populationen und erklärten diesen mit dem höheren Grad der sexuellen Reproduktion. Reisch (2001) untersuchte Populationen von *Saxifraga paniculata* und *Sesleria albicans* und stellte überwiegenden Genaustausch bei der windbefruchtenden *Sesleria*-Art fest. Während bei dem insektenbefruchtenden *Saxifraga paniculata* der Anteil der Variation innerhalb der Populationen 39% beträgt, sind dies bei *Sesleria albicans* 61%. Viel niedriger ist die molekulare Variation zwischen den Gruppen bei dem Windbefruchter (5%) gegenüber 28% bei der insektenbefruchtenden Art. Trotzdem sind die *Sesleria*-Populationen zueinander ähnlicher als die von *Saxifraga*.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse bezüglich der hierarchischen Populationstruktur bei *Poa pratensis*, dass eine scharfe Differenzierung der Populationen aus den nord-, mittel- und südeuropäischen Regionen aufgrund der Verteilung der molekularen Variation in den für einen Fremdbefruchter erwarteten Grenzen nicht möglich ist. Ein möglicher Grund ist die weite Verbreitung und die Windbestäubung in der Art *Poa pratensis*, was eine Differenzierung erschwert.

4.7 Zusammenhang zwischen morphologisch-phänotypischen und AFLP-Daten

Die nur separat nach Evaluierungsstandorten auswertbaren morphologisch-phänotypischen Daten erschweren einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen der AFLP-Analyse. Hinzu kommt, dass die morphologisch-phänotypische Charakterisierung auf Akzessionsebene an 10 Einzelpflanzen durchgeführt wurde, während bei der AFLP-Analyse eine bis drei Einzelpflanzen pro Akzession untersucht wurden. Durch diese unterschiedlichen Anzahlen an

feld- bzw. DNA-charakterisierter Akzessionen ist ein Ergebnis-Vergleich nur bedingt zulässig. Betrachtet man die Evaluierungsstandorte nach Zusammenfassung der Akzessionen bzw. Einzelpflanzen nach Herkünften je Evaluierungsstandort sowie nach Ermittlung und Vergleich der morphologischen und genetischen Distanzmatrices getrennt, folgen die genetischen Distanzen aufgrund der AFLP-Bandenfrequenzen gleichen geographischen Gruppierungsmustern wie die phänotyp-basierten Distanzen. Neben den hohen Korrelationen zwischen den morphologisch-phänotypischen und den AFLP-Distanzmatrices an drei von vier Evaluierungsstandorten (Tab. 17) gruppieren beide Verfahren außerdem die untersuchten Herkünfte nach geographischen Gebieten, was einen Arealeffekt in der genetischen Populationsstruktur vermuten läßt. Die gleiche Gruppierung der Länder deutet darauf hin, dass die festgestellten morphologisch-phänotypischen Merkmalsausprägungen genetisch bedingt und nicht nur auf die hohe Anpassungsfähigkeit bzw. Plastizität der Art *Poa pratensis* zurückzuführen sind.

Bei Gesamtbetrachtung aller mit Hilfe von AFLPs untersuchten Akzessionen ist eine Gruppierung nach geographischen Herkunftsgebieten nicht mehr vollständig gegeben. Hierbei bleibt aber unklar, inwieweit bzw. ob die nach den morphologisch-phänotypischen Merkmalen ermittelte geographische Gruppierung vollständig bleiben würde, wenn alle Akzessionen der Primärevaluierung zusammenfassbar gewesen wären. Ebenso kann nicht geklärt werden, ob die ermittelten Merkmalsausprägungen im Feld genetisch fixiert sind bzw. inwiefern die Umweltbedingungen, unter denen die Populationen herangezogen wurden, einen Einfluss auf die Merkmalsausprägungen der einzelnen Herkünfte hatten. Szczepaniak et al. (2002) studierten die morphologische und genetische Variabilität bei *Elymus repens* L. und stellten niedrige molekulare Variation fest. Sie berichteten, dass die größere morphologische Variabilität durch die Plastizität der Art hervorgerufen wurde.
Ein anderer Faktor, welcher die molekulare Gruppierung nach geographischen Gebieten verhindern kann, sind die (mittlerweile abgestellten) Erhaltungspraktiken der Genbanken, die bei Untersuchungen wie dieser den großen Einfluß der Züchtungs- und Vermehrungsgeschichte der Herkünfte unterstreicht. Anhand der oben (s. Kapitel 2.2.2) vorgestellten Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass ohne Isolation durchgeführte Zwischenvermehrungen zu Änderungen in der genetischen Zusammensetzung von Populationen führten, welche sich aber nicht immer phänotypisch auswirkten. Das könnte eine unterschiedliche Gruppierung der Akzessionen bezüglich der molekularen und der phänotypischen Merkmale verursacht haben und wird in den hier vorgestellten Ergebnissen

dadurch verdeutlicht, dass die zwischenvermehrten asiatischen Akzessionen phänotypisch gut vom europäischen Material abgrenzbar sind, während molekular keine eindeutige Differenzierung mehr möglich ist; dies ist jedoch eher die Ausnahme – im Allgemeinen ergeben sich meist ähnliche Gruppierungen bzw. Differenzierungen.

Abschließend erwies es sich als schwierig, eine eindeutige Aussage darüber treffen zu können, welche der beiden im Projekt angewendeten Haupt-Evaluierungsmethoden - die Ermittlung morphologisch-phänotypischer Parameter mittels Freiland-Bonituren oder der Einsatz molekularer Marker - zur einer exakteren Differenzierung der Akzessionen und einer Beschreibung ihrer genetischen Diversität führt. Die Charakterisierung pflanzengenetischer Ressourcen mit modernen, molekularen Methoden ist in zunehmendem Maße wichtig, besonders für eine genauere Typisierung näher-verwandter Genbankakzessionen. Andererseits, wie auch von Feuerstein (1998) berichtet wird, können die molekularen Techniken die morphologische Feldcharakterisierung keinesfalls ersetzen - nachwievor sind diese für die Bestimmung und Charakterisierung auch von umfangreichen Sammlungsmaterial gut geeignet. Wie sich auch in diesem Projekt zeigte, sind die Ergebnisse der beiden Methoden weitgehend vergleichbar und ergänzen sich gegenseitig, so dass deren parallele Anwendung eine umfassendes Aufnahme der genetischen Diversität sichert.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die morphologisch-phänotypische und molekulare Diversität in europäischem *Poa pratensis*-Genbankmaterial untersucht. Es wurde geprüft, ob sich die molekulargenetische AFLP-Methode und die klassische morphologische Beschreibung sinnvoll ergänzen, und ob ein geographisches Muster in der morphologischen und genetischen Variabilität festzustellen ist. Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Ermittlung der Reproduktionswege und der Variabilität dieses Merkmals in den untersuchten Herkünften.

Die Daten der morphologisch-phänotypischen Beschreibung führen zu einer gemeinsamen Gruppierung der aus den selben Regionen stammenden Akzessionen. Die höchsten morphologischen Distanzen wurden zwischen dem europäischen Material und den Akzessionen aus den außereuropäischen Ländern festgestellt. Es wurde gezeigt, dass der Standort die Ausprägung der morphologischen Merkmale in erheblichem Maße beeinflussen kann. Die meisten erhobenen Merkmale zeigten signifikant unterschiedliche Ausprägung nach geographischen Regionen. Die geographische Gruppierung wurde (bei freier Abblüte der Eltern) in der nächsten Generation mit einer geringeren Anzahl signifikanter Merkmale weitergegeben.

Die Ergebnisse der Ermittlung der Art der Samenbildung zeigten, dass verschiedene Reproduktionswege in einer *Poa pratensis*-Pflanze vorkommen. Es wurden keine obligat meiotisch parthenogenetisch bzw. apomeiotisch sexuellen Typen gefunden; jedoch kamen diese in bestimmten Akzessionen zumindest vereinzelt und in Kombination mit anderen Typen vor. Da solche Typen zur Sterilität führen können, infolgedessen in der Natur nicht stabil bleiben und nach mehreren Generationen im Zuchtprozess verloren gehen, sollten die betreffenden die Akzessionen in den Züchtungsprogrammen nur eingeschränkt verwendet werden.

Die Daten der AFLP-Analyse führten zu einer weniger klaren Gruppierung der Akzessionen aus denselben Regionen. Bei der Gruppierung spielte möglicherweise die Züchtungs- und Vermehrungsgeschichte dieser Herkünfte eine größere Rolle. Die höchsten genetischen

Ähnlichkeiten bestanden zwischen den Herkünften aus den mitteleuropäischen Ländern. Weniger ähnlich waren sich dagegen die südeuropäischen Herkünfte. Geringe genetische Ähnlichkeiten zeigt das Material aus den nördlichen Inselländern, welches mit dem kontinentalen Genpool weniger nah verwandt ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine hohe genetische Diversität in natürlichen Populationen von *Poa pratensis* vorhanden ist. In allen geographischen Regionen trugen die Unterschiede innerhalb der Länder den größten Anteil zur Gesamtvarianz bei, gefolgt vom Anteil der Variation zwischen den Ländern einer Region. Zwischen den geographischen Regionen treten die geringsten Anteile der Gesamtvariation auf.

Bei der Überprüfung, ob die morphologischen und die molekularen Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse liefern, entsprach die beobachtete morphologisch-phänotypische Ländergruppierung bei drei der Evaluierungsstandorte der auf den AFLP-Daten basierenden Gruppierung. Hier wurden Korrelationen zwischen 0,81 und 0,94 ermittelt (Korrelationen separat nach Evaluierungsorten berechnet, um Standortwirkung auf phänotypische Ausprägungen zu vermeiden). Offen bleibt, ob die festgestellten Korrelationen in der entsprechenden Größe bleiben bzw. ob die festgestellten morphologischen Gruppierungen bestehen bleiben würden, falls die ermittelten morphologischen Daten zusammengestellt werden könnten. Nichtsdestotrotz zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass eine kombinierte Anwendung beider Methoden zu einem umfassenderen Ergebnis führt als der Einsatz nur eines Charakterisierungsverfahrens allein - wobei in jedem Fall die Entstehungs-, Erhaltungs- bzw. Züchtungsgeschichte des Untersuchungsmaterials stets mit berücksichtigt werden muß.

5.2 Summary

In this study, the morphological and genetic diversity of European *Poa pratensis* genebank material was analysed and was tested whether the molecular-genetic AFLP-techniques and the classical morphological and phenotypical descriptions complement each other reasonably, and if there are geographic patterns in the morpho-phenotypical and genetic variability. Another part of the study concerned the determination of the modes of *Poa* reproduction and their variability in the examined accessions.

The morphological and phenotypical characterization data led to a grouping of the accessions coming from the same geographical areas. The clearest distances could be found between the European material and the accessions from three non-European countries. It was shown that the location factors influence the expression of the morphological and phenotypical traits to a considerable extent - most of the scored traits showed significantly different expressions according to the geographic areas. The geographic grouping was observed in the next generation but with a lower number of significant traits (probably due to open pollinations in the parental generation).

The results of the determinations of the reproduction mode show that different pathways in the same *Poa pratensis* plant are possible. Obligatory meiotic parthenogenetic and apomeiotic sexual types were not found. However, individual plants of theses types occurred – in combination with other types - in some of the examined accessions. As these types can lead to sterility, and consequently are both unstable in nature and disappear after several generations of breeding, the respective accessions should better not be employed in breeding programs.

The analysis the AFLP data showed a less clear grouping of the accessions according to the geographical origins. Therefore, was assumed that the propagation history of the examined accessions plays an important role in the clustering. The highest genetic similarities were found within the central European countries. The accessions from Southern Europe were less similar. The material from the northern islands, which is less related to the continental gene pool, shows the least genetic similarities. The results showed that a high genetic diversity is available in natural populations of *Poa pratensis*. In all geographic areas most of the variability was observed within the countries, followed by the variation between the countries

of a region. Only a small part of the variation was detected between the different geographical areas.

It was tested whether the results from the morpho-phenotypical evaluations are comparable with these from the molecular investigations. At three of the four evaluation locations, the observed morphological grouping of the accessions corresponds to the grouping based on the AFLP data. This results in a high correlation between both types of data (0.81 and 0.94; correlations calculated separately by field plot locations in order to prevent location effects on the phenotypic differentiations). What remains to be shown is whether the determined correlations would remain unchanged or whether the observed morpho-phenotypical groups would prevail, respectively, if all evaluated morphological data could be combined. Nevertheless, the examinations demonstrated that a combined utilization of both characterization methods led to a more comprehensive result than applying just one procedure on its own – while in any case, the history of the generation, preservation or breeding of the material under survey always has to be regarded.

6 Literaturverzeichnis

Akerberg, E., 1943: Further studies of the embryo- and endospermdevelopment in *Poa pratensis*. Hereditas 29: 199-201

Akerberg, E., Nygren, A., 1959: *Poa pratensis*, *trivialis*, *palustris*, *compressa* und verwandte Arten. In: Th.Roemer & W.Rudorf (Hrsg.). Handbuch der Pflanzenzüchtung: 392-418

Albertini, E., Barcaccia, G., Porceddu, A., Sorbolini, S., Falcinelli, M., 2001a: Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties. Mol Breed 7: 293-300

Albertini, E., Marconi, G., Barcaccia, G., Raggi, L., Falcinelli, M., 2004: Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. Plant Mol Biol 56: 879-894

Albertini, E., Porceddu, A., Ferranti, F., Reale, L., Barcaccia, G., Romano, B., Falcinelli, M., 2001b: Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. Sex Plant Reprod 14: 231-217

Allard, R., Bradshaw, A., 1964: Implications of genotype-environment interactions in applied plant breeding. Crop Sci 4: 503-507

Allard, R. W., Garcia, P., Saenz-de-Miera, L. E., de-la-Vega, M. P., 1993: Evolution of multilocus genetic structure in *Avena hirtula* and *Avena barbata*. Genetics 135: 1125-1139

Antequera, F., Bird, A., 1988: Unmethylated CpG islands associated with genes in higher plant DNA. EMBO J 7: 2295-2299

Anton, A., Connor, H., 1995: Floral biology and reproduction in *Poa* (Poaceae: Gramineae). Austral. J. Bot. 43: 577-599

Arumuganathan, K., Earle, E., 1991a: Nuclear DNA content in some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9: 208-218

Arumuganathan, K., Earle, E., 1991b: Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol Biol Rep 9: 229-233

Asker, S. E., Jerling, L., 1992: Apomixis in plants. CRC Press. Boca Raton, Florida. 298 S.

Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., Weiber, R., 1996: Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung. Springer Verlag. Berlin.

Baker, A., 2000: Molecular methods in Ecology. Blackwell Science. Oxford: 168-207

Barcaccia, G., Mazzucato, A., Belardineli, A., Pezzotti, M., Lucretti, S., Falcinelli, M., 1997a: Inheritance of parental genomes in progenies of *Poa pratensis* L. from sexual and apomictic genotypes as assessed by RAPD markers and flow cytometry. Theor Appl Genet 95: 516-524

Barcaccia, G., Tavoletti, S., Falcinelli, M., Veronesi, F., 1997b: Verification of the parthenogenetic capability of unreduced eggs in an alfalfa mutant by a progeny test based on morphological and molecular markers. Plant Breed 116: 475-479

Barrett, S., Kohn, J., 1991: Genetic and evolutionary consequences of small population sizes in plants: implications for conservation. In: Falk, D.A. & Holsinger, K.A. (Hrsg): Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York: 3-30

Bashaw, E., Funk, C., 1987: Apomictic grasses. In W.R. Fehr (Hrsg.) Principles of cultivar development. 2 Crop Species: 40-82 Macmillan Publishers, New York.

Bashaw, E., Hanna, W., 1990: Apomictic reproduction. In: . G.P. Chapman (Hrsg.) Reproductive versatility in the grasses. Cambridge University Press. Cambridge: 100-130

Baum, B., Nevo, E., Johnson, D., Beiles, A., 1997: Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Genet Res Crop Evol 44: 147-157

Beckman, J., Soller, M., 1986: Restriction fragment lenght polymorphisms in genetic improvement of agricultural species. Euphytica 35: 111-124

Bennett, M., 1972: Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. Proc Royal Soc London 181: 109-135

Bennett, S., Hayward, M., Marshall, D., 2002: Electrophoretic variation as a measure of species of the genus *Lolium* in Europe. Genet Res Crop Evol 47: 247-255

Bergmann, F., Leinemann, L., 2000: Nutzen molekularer Marker bei der Ausweisung von Genreservaten (Genressourcen). In: Finkeldey R., Bonfils P., Landolt R. (Hrsg.): Forstliche Genreservate. Swiss federal Research Institute WSL. Birmensdorf: 115-120.

Bernatzky, R., Tanksley, S., 1986: Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. Mol Gen Genet 203: 8-14

Bicknell, R., Borst, N., 1996: Isolation of reduced genotypes of *Hieracium pilosella* using anther culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 45: 37-41

Bicknell, R. A., Borst, N. K., Koltunow, A. M., 2000: Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. Heredity 84: 228-237

Blair, M. W., McCouch, R., 1997: Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene xa-5. Theor Appl Genet 95: 174-184

Bolaric, S., Posselt, U., 1999: Ermittlung der genetischen Variabilität zwischen und innerhalb von Sorten des Deutschen Weidelgrases mittels molekularer Marker. Vortr. Pflanzenzüchtg 44: 119-125

Booy, G., Hendriks, R., Smulders, M., van Groenendal, J., Vosman, B., 2000: Genetic diversity and the survival of species. Plant Biol 2: 379-395

Botstein, D., White, R., Skolnick, M., Davis, R., 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisms. Am J Hum Genet 32: 314-331

Breese, E., 1989: Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background. International Board for Plant Genetic Resources. Rome.

Bruford, M., Wayne, R., 1993: Microsatellites and their application to population genetic studies. Curr Opin Genet Dev 3: 939-943

Bunce, N., Forde, B., Kreis, M., Shewry, P., 1986: DNA restriction length polymorphism at hordein loci: Application to identifying and fingerprinting barley cultivars. Seed Sci Technol 14: 419-429

Burr, B., Burr, F., Thompson, K., Albertson, M., Stuber, C., 1988: Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Gene 118: 519-526

Byers, D., Waller, D., 1999: Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. Ann Rev Ecol Syst 30: 479-513

Caicedo, A., Gaitán, E., Duque, M., Toro Chica, O., Debouck, D., Tohme, J., 1999: AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. Crop Sci 39: 1497-1507

Cambrell, D., Duchesne, P., Berrnachez, L., 2003: AFLP utility for population assignment studies: analytical investigations and empirical comparison with microsatellites. Mol Ecol 12: 1979-1991

Carman, J.G., 1997: Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. Biol J Linn Soc 61: 51-94

Ceccarelli, M., Falistocco, E., Cionini, P., 1992: Variation of genome size and organization within hexaploid *Festuca arundinacea*. Theor Appl Genet 83: 273-278

Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1987: Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Ann Rev Ecol Syst 18: 237-268

Charmet, G., Balfourier, F., Ravel, C., 1993: Isozyme polymorphism and geographic differentiation in a collection of French perennial ryegrass populations. Genet Res Crop Evol 40: 77-89

Chaudhury, A., Ming, L., Miller, C., Craig, S., Dennis, E., 1997a: Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4223-4228

Chaudhury, A., Ming, L., Miller, C., Craig, S., Dennis, E., Peacock, W., 1997b: Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4223-4228

Chen, S., Thseng, F., 1990: Studies on the intraspecific variation of the upland weed purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) in Taiwan. 1. Variation of morphological characters in the populations of field and field path. J Agricult Forestry 39: 103-115

Chung, K. R., Leuchtmann, A., Schardl, C. L., 1996: Inheritance of mitochondrial DNA and plasmids in the ascomycetous fungus, *Epichloe typhina*. Genetics 142: 259-265

Clausen, J., 1961: Introgression facilitated by apomixis in polyploid Poas. Euphytica 10: 87-94

Clegg, M., 1989: Molecular diversity in plant populations pp 98-115 In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. ; Weir, B.S. (Hrsg.) Plant population genetics, breeding and genetic resources.Sinauer. Sunderland, Mass.

Clegg, M. T., Rawson, J. R. Y., Karen, T., 1984: Chloroplast DNA variation in pearl millet and related species. Genetics 106: 449-461

Costich, D., Meagher, T., Yurcow, E., 1991: A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. Plant Mol Biol Rep 9: 359-370

Creber, H., Daview, M., Francis, D., Walker, H., 1994: Variation in DNA C value in natural populations of *Dactylis glomerata* L. New Phytol 128: 555-561

Cregan, P., 1992: Simple sequence repeat DNA length polymorphisms. Probe 2: 18-22

Cresswell, A., Sackville-Hamilton, N., Roy, A., Viegas, B., 2001: Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers to assess genetic diversity of *Lolium* species from Portugal. Mol Ecol 10: 229-241

Cross, R., 1992: A proposed revision of the IBPGR barley descriptor list. Theor Appl Genet 84: 501-507

Dambroth, M., 1986: Verfügbarkeit genetischer Ressourcen für die Pflanzenzüchtung in der Bundesrepublik Deutschland. In: Verfügbarkeit genetischer Ressourcen: Tagungsbericht der Arbeitsgemeinschaft Pflanzenzüchtung und der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften, Braunschweig. Heft 10. 18-31

Dehmer, K.J., 2001: Conclusions of the taxonomy of the *Solanum nigrum* complex by molecular analyses of IPK germplasm accessions. In: Van den Berg, R.G., Barendse, G.W.M., Van der Weegen, G.M., Mariani, C. (Hrsg.): Solanaceae V: Advances in taxonomy and utilisation. Proceedings of the Vth International Solanaceae Conference, July 23-29th 2000, Nijmegen. Nijmegen University Press: 85-96

D'ennequin, M., Panaud, O., Robert, T., Ricroch, A., 1997: Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. Heredity 78: 403-409

Depres, L., Loriot, S., Gaudeul, M., 2002: Geographic pattern of genetic variation in the European globeflower *Trollius europaeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers. Mol Ecol 11: 2337-2347

Dice, L., 1945: Measures of the amount ot ecological associations between species. Ecol 26: 295-302

Diederichsen, A., Hammer, K., 1995: Variation of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.subsp. *usitatissimum*) and ist wild progenitor pale flax (subsp. *angustifolium* (Huds.) Thell.). Genet Res Crop Evol 42: 263-272

Diwan, N., Cregan, P., 1997: Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theor Appl Genet 95: 723-733

Dodd, R., Afzal-Rafii, Z., Kashani, N., Budrick, J., 2002: Land barriers and open oceans: effects on gene diversity and population structure in *Avicennis germinans* L. (Avicenniaceae). Mol Ecol 11: 1327-1338

Dolezel, J., 1997: Flow cytometry, its application and potencial for plant breeding. Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant improvement WUV-Universitätsverlag. Wien: 80-90

Doyle, J., Doyle, J., 1990: Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15

Eaton, T., Curley, R., Williamson, R., Jung, G., 2004: Determination of the level of variation in polyploidy among Kentucky Bluegrass cultivars by means of flow cytometry. Crop Sci 44: 2167-2174

Eickmeyer, F., 1994: Erstellung von molekularen Markern und Untersuchungen zur Hybrydzüchtung mit Hilfe der genetischen Inkompatibilität bei Weidelgras-Arten (*Lolium* spp.). Dissertation Universität Hannover

Ellis, R., McNicol, J., Baird, E., Booth, A., Lawrence, P., Thomas, B., Powell, W., 1997: The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. Mol. Breed 3: 359-369

Emerson, R., Beadle, G., Fraser, A., 1935: A summary of linkage studies in maize. Cornell Univ Agr Exp Sta Memoir: 180

Evola, S., Burr, F., Burr, B., 1986: The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. Theor Appl Genet 71: 765-771

Excoffier, N. C., Smouse, P., Quattro, J., 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491

Fahima, T., Sun, G., Beharav, A., Krugman, T., Beile, A., Nevo, E., 1999: RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. Theor Appl Genet 98: 434-447

Falque, M., Keurentjes, J., Bakx-Schotman, J., van Dijk, P., 1998: Development and characterisation of microsatellite markers in the sexual-apomictic complex *Taraxacum officinale* (dandelion). Theor Appl Genet 97: 283-292

Fernando, W., Hayward, M., Kearsey, J., 1997: Isozyme and quantitative traits polymorphisms in European provenances of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Euphytica 93: 263-269

Feuerstein U., 1998: Einsatz von modernen Methoden zur Beschreibung der genetischen Diversität am Beispiel von Gräsern. Schriften Genet Ress 8:71-80

Fischer, M., Matthies, D., 1998: RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). Amer J Bot 85: 811-819

Gabrielsen, T., Bachmann, K., Jakobsen, K., Brochmann, C., 1997: Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. Mol Ecol 6: 831-842

Galbraith, D., Harkins, K., Maddox, J., Ayers, N., Sharma, D., Firoozabady, E., 1983: Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220: 1049-1051

Galzada, J.-P., Crane, C., Stelly, D., 1996: Apomixis: The asexual revolution. Science 274: 1322-1323

Ganders, F., Ritland, K., 1987: Crossability in *Mimulus guttatus* in relation of components of gene fixation. Evolution 41: 772-786

Gilbert, K., Garton, S., Karam, M., Arnold, G., Karp, A., Edwards, K., Cooke, D., Barker, J., 2002: A high degree of genetic diversity is revealed in Isatis spp. (dyer's woad) by amplified fragment length polymorphism (AFLP). Theor Appl Genet 104: 1150-1156

Gillespie, L., Bioles, R., 2001: Phylogenetic relationships and intraspecific variation in Canadian Arctic *Poa* based on chloroplast DNA restriction site data. Can J Bot 79: 679-701

Ginzburg, E., Miroshnichenko, E., 1997: Variability of quantitative characters following pseudogamous apomixis. 1. Analysis of the causes of variation in characters of the reproductive shoot in *Poa pratensis* L. Izv. Sib. Otd. AN-SSSR, Ser Biol N. 3: 80-86

Giussani, L., 2000: Phenetic similarity patterns of dioecious species of *Poa* from Argentina and neighboring countries. Ann Missouri Bot Gard 87: 203-233

Govindaraju, D., 1988: Relationship between dispersal ability and levels of geneflow in plants. Oikos 52: 31-35

Gregor, T., Matzke-Hajek, G., 2002: Apomikten in roten Listen: Kann der Naturschutz einen Großteil der Pflanzenarten übergehen? Natur und Landschaft 77: 64-71

Grimanelli, D., Leblanc, O., Espinosa, E., Perotti, E., De Leon, D., Savidan, Y., 1998: Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum* : one gene or several genes? Heredity 80: 33-39

Grossniklaus, U., Nogler, G., van Dijk, P., 2001: How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. Plant Cell 13: 1491-1497

Grossniklaus, U., Ville-Calzada, J., Hoeppner, M., Gagliano, W., 1998: Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. Science 280: 446-450

Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., Razin, A., 1981: Sequence specifity of methylation in higher plant DNA. Nature 292: 860-862

Grünbauer, G., 2001: Phänotypische und genetische Variation von Wildpflanzen am Beispiel von *Succisa pratensis* (Moench). Dissertation Technische Universität München

Hamrick, J., 1989: Isozymes and analyses of genetic structure of plant populations. In: Soltis D und Soltis P (Hrsg.) Isozymes in plant biology. Discorides Press. Portland, Oregon

Hamrick, J., 1991: Correlation between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology. In: D. A. Falk und K. E. Holsinger (Hrsg.) Genetics and conservation of rare plants.. Oxford University Press, Oxford: 75-86.

Hamrick, J., Godt, W., 1989: Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. & Weir, B.S. (eds.): Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer. Sunderland, MA.: 43- 63.

Hamrick, J., Linhart, Y., Mitton, J., 1979: Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Ann Rev Ecol Syst 10: 173-200

Hanna, W., 1995: Use of apomixis in cultivar development. Adv Agron 54: 333-350

Hatz, B., 1997: Untersuchungen der genetischen Diversität innerhalb der Gattung *Hordeum* mit molekularen Markertechniken. Dissertation Technische Universität München. München: Herbert Utz, Verlag

Hawthorne, D., 2001: AFLP-based genetic linkage map of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Sex Chromosomes and a Pyrethroid-Resistance Candidate Gene. Genetics 158: 695-700

Helgadottir, A., Snaydon, R., 1986: Patterns of genetic variation among populations of *Poa pratensis* L. and *Agrostis capillaris* L. from Britain and Iceland. J Appl Ecol 23: 703-719

Heslop-Harrison, J., 1995: Flow cytometry and genome analysis. Probe 5: 14-17

Hsam, S., Schickle, H., Westermeier, R., Zeller, F., 1993: Identification of cultivars of crop species by polyacrylamide electrophoresis: I. commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars grown in Germany. Monatszeitschrift f. Brauwiss 46: 86-94

Huff, R., Bara, J., 1993: Determining genetic origins of aberrant progeny from facultative apomictic Kentucky bluegrass using a combination of flow cytometry and silver-stained RAPD markers. Theor Appl Genet 87: 201-208

Huff, D., Peakall, R., Smouse, P., 1993: RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss [*Buchloè dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. Theor Appl Genet 86: 927-934

Husband, B., Schemske, D., 1996: Evolution of the magnitude of inbreeding depression in plants. Evolution 50: 54-70

Jaccard, P., 1908: Nouvelles recherches sur la distibution florale. Bull Soc Vaudoise Sci Nat 223-270

Jarne, P., Lagoda, P., 1996: Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol 11: 424-429

Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S., 1985: Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature 316: 76-79

Jones, C., Edwards, K., Castaglione, S., Winfield, M., Sale, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevshi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A., 1997: Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol Breed 3: 381-390

Jones, E., Dupal, M., Kölliker, R., Dryton, M., Forster, J., 2001: Development and charakterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theor Appl Genet 102: 405-415

Kalb, O., 2004: Zuchtmethodische Nutzung von Inzuchtlinien beim Welschen Weidelgras. Dissertation. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J., Lang, D., 2002: Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* ssp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting. Crop Sci 42: 2118-2127

Karp, A., Edwards, K., Bruford, M., Vosman, B., Morgante, M., Seberg, O., Kremer, A., Boursot, P., Arctander, P., Tautz, E., Hewitt, G., 1997: Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. Nature Biotechnol 15: 625-628

Karp, A., Issac, P., Ingram, D., 1998: Molecular Tools for Screening Biodiversity. Plants and animals. Chapman and Hall. London.

Keeler, K., Kwankin, B., Barnes, P., Galbraith, D., 1987: Polyploid polymorphism in *Andropogon gerardii*. Genome 29: 374-379

Keiper, F., McConchie, R., 2000: An analysis of genetic variation in natural polulation of *Sticherus flabellatus* (R. Br.) St. John using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Mol Ecol 9: 571-581

Kennedy, S., Gardiner, T., Gilliland, J., Camlin, M., 1985: The use of electrophoretic techniques to distinguish perennial ryegrass cultivars when sown in mixtures. Agric Sci Camb 104: 1-9

Kindinger, B., Sokolov, V., Dewald, C., 1996: A comparison of apomictic reproduction in eastern gamagras (*Tripsacum dactyloides* L.) and maize-*Tripsacum* hybrids. Genetica 97: 103-110

Knaak, C., 1996: Schätzung genetischer Distanzen mittels RFLP zur Identifikation von Genpools für die Hybridzüchtung bei Winterraps. Cuvillier Verlag, Göttingen.

Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J., Gessler, C., 1993: Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor Appl Genet 85: 901-904

Koltunow, A., Bicknell, R., Chaudhury, A., 1995: Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seed without fertilization. Plant Physiol 108: 1345-1352

Koltunow, A., Johnson, S., Bicknell, R., 1998: Sexual and apomictic development in *Hieracium*. Sex Plant Reprod 11: 213-230

Ktrings, W., 2000: Die Variabilität von Ökotypen des Welschen Weidelgrases (*Lolium multiflorum* Lam.) aus dem präalpinen Dauergrünland. Dissertation Technische Universität München

Kubik, C., Meyer, W., Gaut, B., 1999: Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. Crop Sci 39:

Kubik, C., Meyer, W., Gaut, B., 2001: Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne*) cultivars based on SSR markers. Crop Sci 41: 1565-1572

Kölliker, R., Stadelmann, F., Reidy, B., Nösberger, J., 1998: Fertilization and defoliation frequency affect genetic diversity of *Festuca pratensis* Huds. in permanent grasslands. Mol Ecol 7: 1557-1567

Larson, S., Jones, C., Cracken, M., Hu, Z., Pallazo, A., 2000: Genetic diversity of bluebunch wheatgrass cultivars and a multiple-origin polycross. Crop Sci 40: 1142-1147

Larson, S., Waldron, B., Monsen, S., St. John, L., Palazzo, A., McCracken, C., Harrison, R., 2001: AFLP variation in agamospermous and dioecious bluegrasses of Western North Amerika. Crop Sci 41: 1300-1305

Leblanc, O., Grimanelli, D., Gonzalez de Leon, D., Savidan, Y., 1995: Detection of the apomictic mode of reproduction in maize -*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. Theor Appl Genet 90: 1198-1203

Leonardi, S., Menozzi, P., 1995: Genetic variability of *Fagus syilvatica* L. in Italy: the role of postglacial recolonization. Heredity 75: 35-44

Lin, W., Harivandi, A., Harding, J., Davis, W., 1984: Identification of Kentucky bluegrass cultivars with esterase and phosphogluco-mutase isozyme markers. Crop Sci 29: 1067-1071

Link, W., Dixkens, C., Singh, M., Schwall, M., Melchniger, A., 1995: Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. Theor Appl Genet 90: 27-32

Liu, Y.-C., Sun, J.-S., Hsu, F., 1996a: An apomictic autotriploid line Tar identified in *Oryza sativa*. Acta Bot Sin 38: 917-920

Liu, Z., Biyashev, R., Saghai Maroof, M., 1996b: Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theor Appl Genet 93: 869-876

Loos, B., 1994: Allozyme differentiation of European populations and cultivars of *Lolium perenne* L., and the relation to ecogeographical factors. Euphytica 80: 49-57

Loveless, M., Hamrick, J., 1984: Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Ann Rev Ecol Syst 15: 65-95

Macarthur, J., 1934: Linkage groups in tomato. J Genet 29: 123-133

Maletskii, S., Maletskaya, E., 1996: Self-fertility and agamospermy in sugar beet, *Beta vulgaris* L. J Genet 32: 1431-1437

Martin, C., Gonzalez-Benito, M., Iriondo, J., 1997: Genetic diversity within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz. & Izco. Mol Ecol 6: 813-820

Matzk, F., 1991: New effors to overcome apomixis in *Poa pratensis* L. Euphytica 55: 65-72

Matzk, F., Meister, A., Brutovska, R., Schubert, I., 2001: Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. Plant J 26: 275-282

Matzk, F., Meister, A., Schubert, I., 2000: An effitient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. Plant J 21: 97-108

Matzk, F., Oertel, C., Althenhofer, P., Schubert, I., 1997: Manipulation of reproductive systems in Poaceae to increase the efficiency in crop breeding und production. Trends Agron 1: 19-34

Matzk, F., Prodanovic, S., Bäumlein, H., Schubert, I., 2005: The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance. Plant Cell 17: 13-24

Mazzucato, A., Barcaccia, G., Pezzotti, M., Falcinelli, M., 1995: Biochemical and molecular markers for investigating the mode of reproduction in the facultative apomict *Poa pratensis* L. Sex Plant Reprod 8: 133-138

Menges, E., Dolan, R., 1998: Demographic variability of populations of *Silene regia* in midwestern prairies: relationships with fire management, genetic variation, geographic location, population size and isolation. J Ecol 86: 63-78

Mengistu, L., Mueller-Warrant, G., Barker, R., 2000: Genetic diversity of *Poa annua* in western Oregon grass seed crops. Theor Appl Genet 101: 70-79

Michaelson, M., Price, H., Ellison, J., Johnston, J., 1991: Comparison of plant DNA content determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. Am J Bot 78: 183-188

Mogie, M., 1992: The evolution of asexual reproduction in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 288 S.

Mucha, H., 1992: Clusteranalyse mit Mikrocomputern. Akademie Verlag GmbH. Berlin

Muluvi, G., Sprent, J., Soranzo, N., Provan, J., Odee, D., Folkard, G., McNicol, J., Powell, W., 1999: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. Mol Ecol 8: 463-470

Müntzing, A., 1933: Apomictic and sexual seed formation in *Poa*. Hereditas 17: 131-154

Müntzing, A., 1936: The evolutionary significance of autopolyploidy. Hereditas 21: 263-378

Müntzing, A., 1940: Further studies on apomixis and sexuality in *Poa*. Hereditas 26: 115-190

Naumova, T. N., 1993: Apomixis in angiosperms. CRC Press. Boca Raton, Florida. 144 S.

Neal, N. P., 1935: The decrease in yielding capacity in advanced generations of hybrid corn. J Amer Soc Agron 27: 666-670

Nebauer, S., del Castillo-Agudo, L., Segura, J., 1999: RAPD variation within and among natural polulation of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). Theor Appl Genet 98: 985-994

Nei, M., 1972: Genetic distance between populations. Am Nat 106: 283-292

Neuffer, B., 1989: Leaf morphology in *Capsella* (Cruciferae) dependency on envioronments and biological parameters. Beitr Biol Pflanzen 64: 39-54

Nielsen, G., Ostergaard, H., Johansen, H., 1985: Cultivar identification by means of isoenzymes. II. Genetic variation at four enzyme loci in diploid ryegrass. Pflanzenzüchtung 94: 74-86

Nissim, Y., Jinggui, F., Shamay, A., Neta, P., Uri, L., Avner, C., 2004: Phenotypic and genotypic analysis of a commercial cultivar and wild populations of *Anemone coronaria*. Euphytica 136: 51-62

Nogler, G., 1984: Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusions. Bot Helv 94: 411-422

Noyes, R., Rieseberg, L., 2000: Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. Genetics 155: 379-390

Nybom, H., 2004: Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol Ecol 13: 1143-1155

Nygren, A., 1967: Apomixis in the angiosperms. In: Ruhland, W. (Hrsg.): Handbuch der Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag. Berlin. 551-596

Ohad, N., Margossian, L., Hsu, Y., Williams, C., Repetti, P., Fischer, R., 1996: A mutation that allows endosperm development without fertilization. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5319-5324

Ohad, N., Yadegari, R., Margossian, L., Hannon, M., Michaeli, D., Harada, J., Goldberg, R., Fischer, R., 1999: Mutations in *FIE,* a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. Plant Cell 11: 407-415

Okada, H., 2002: Genetic diversity and genetic structure of populations of *Ranunculus japonicus* Thunb. (Ranunculaceae). Plant Species Biol 17: 59-69

Ostergaard, H., Nielsen, G., 1981: Cultivar identification by means of isoenzymes. I. Genotypic survey of the Pgi-2 locus in tetraploid ryegrass. Pflanzenzüchtung 87: 121-132

Otto, F., 1977: High-resolution analysis of nuclear DNA employing the fluorochrome DAPI. Meth Cell Biol 41: 211-217

Ovesná, J., Poláková, K., Leišová, L., 2002: DNA Analysis and their Application in Plant Breeding. Czech J Genet Plant Breed 38: 29-40

Ozias-Akins, P., Lubbers, E., Hanna, W., McNay, J., 1993: Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: Co-inheritance of the trait and molecular markers. Theor Appl Genet 85: 632-638

Palacios, C., Kresovich, S., González-Candelas, F., 1999: A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). Mol Ecol 8: 645-657

Peakall, R., Morell, M., Preston, L., Moore, K., Appels, R., 1995a: An analysis of genetic variability within and among *Lolium* varieties: implications of DNA profiling for the indentification of outcrossing varieties. In: Working group report BMT/3/16, UPOV, Genf.

Peakall, R., Smouse, P., Huff, D., 1995b: Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. Mol Ecol 4: 135-147

Pessino, S., Ortiz, J., Hayward, M., Quarin, C., 1999: The molecular genetics of gametophytic apomixis. Hereditas 130: 1-11

Pillen, K., Binder, A., Kreuzkam, B., Ramsay, L., Waugh, R., Förster, J., León, J., 2000: Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. Theor Appl Genet 101: 652-660

Powell, W., Thomas, W., Baird, E., Lawrence, P., Booth, A., Harrower, B., McNicol, J., Waugh, R., 1997: Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. Heredity 79: 48-59

Prins, R., Groenewald, J., Marais, G., Snape, J., Koebner, R., 2001: AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theor Appl Genet 103: 618-624

Prodanovic, S., Kaushal, T., Bäumlein, H., Matzk, F., 2002: Strategies to manipulate apomixis in *Poa pratensis* L. Vortr Pflanzenzüchtung 59: 98-104.

Quarin, C. L., 1986: Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromyorrhizon*. Euphytica 35: 515-522

Ramulu, K., Sharma, V., Naumova, T., Dijkhuis, P., van Lookeren Campagne, M., 1999: Apomixis for crop improvement. Protoplasma 208: 196-205

Reese, G., 1958: Polyploidie und Verbreitung. Z Botanik 46: 339-354

Reisch, C., 2001: Climatic oscillations and the fragmentation of plant populations – genetic diversity within and among populations of the glacial relict plants *Saxifraga paniculata* (Saxifragaceae) and *Sesleria albicans* (Poaceae). Dissertation, Universität Regensburg

Renganayaki, J., Read, A., Fritz, A., 2001: Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet 102: 1037-1045

Richards, A., 1986: Plant breeding systems. George, Allen and Unwin. London. 403-456

Riordan, T., Fei, S., Johnson, P., Read, P., 1998: Plant breeding, plant regeneration and flow cytometry in buffalograss. In: M.B. Sticklen and M.P. Kenna (Hrsg.) Turfgrass biotechnology: cell and molecular genetic approaches to turfgrass improvement. Ann Arbor Press, Chelsea 183-193

Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., De Loose, M., 2000: AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Mol Breed 6: 125-134

Ronning, C., Schnell, R., Gazit, S., 1995: Using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify *Annona* cultivars. J Amer Soc Hort Sci 120: 726-729

Russell, J., Ellis, R., WTB, T., Waugh, R., Provan, J., Booth, A., Fuller, J., Lawrence, P., Young, G., Powell, W., 2000: A retrospective analysis of spring barley germplasm development from "foundation genotypes" to currently successfull cultivars. Mol Breed 6: 553-568

Rutishauser, A., 1967: Fortpflanzungsmodus und Meiose apomiktischer Blütenpflanzen. Handbuch der Protoplasmaforschung, Band VI. Springer-Verlag. Wien New York 245

Saghai Maroof, M., Biyashev, R., Yang, G., Zhang, Q., Allard, R., 1994: Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and populations dynamics. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5466-5470

Saiki, R., Scharf, S., Falloona, F., Mullis, K., Horn, G., Ehlich, H., Arnheim, N., 1985: Enzymatic amplification of ß´-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354

Savelkoul, P., Aarts, H., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J., Schouls, L., Lenstra, J., 1999: Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clinical Microbiol 37: 3083-3091

Savidan, Y., 1980: Chromosomal and embryological analyses in sexual x apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. Theor Appl Genet 57: 153-156

Savidan, Y., 2000: Apomixis: Genetics and Breeding. Plant Breed Rev 18: 13-86

Scacchi, R., De Angelis, G., Corbo, R., 1991: Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). Plant Syst Evol 176: 53-61

Schaal, B., Leverich, W., Rogstad, S., 1991: Comparison of methods for assessing genetic variation in plant biology. In: Falk, D.A. & Holsinger, K.A. (Hrsg.): Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York. 123-134

Schemske, D., 1983: Breeding system and habitat effects on fitness components in three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). Evolution 37: 523-539

Schmidt, K., Jensen, K., 2000: Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population population size and reproductive components. Amer J Bot 87: 678-689

Schoen, D., Brown, A., 1991: Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4494-4499

Schönfeld, R., 1998: Identifizierung und molekulare Lokalisierung neuer Resistenzgenloci der Wildgerste (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) gegen Mehltau (*Erysiple graminis* fsp. *hordei*). Dissertation Technische Universität München. Aachen: Shaker Verlag, 1998

Schönswetter, P., Tribsch, A., Barfuss, M., Niklfeld, H., 2002: Several Pleistocene refugia detected in the high alpine plant *Phyteuma globulariifolium* Sternb. & Hoppe (Campanulaceae) in the European Alps. Mol Ecol 11: 2637-2647

Shapiro, H., 1995: Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss. New York, NY
Sharma, A., Sharma, R., Machii, H., 2000: Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescent-based AFLP markers. Theor Appl Genet 101: 1049-1055
Smith, J., Pham, T., 1996: Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). Amer J Bot 83: 717-726
Smith, J., Smith, O., 1989: The description and assessment of distances between inbred lines of maize: I. The use of morphological traits as descriptors. Maydica 34: 141-150
Sneath, P., Sokal, R., 1973: Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Clasification. W.H. Freeman, San Francisco.
Sokal, R., Sneath, P., 1963: Principles of numerical taxonomy. W.H. Freeman. San Francisco, London. 359pp.
Soreng, R., 1990: Chloroplast-DNA philogenetics and biogeography in a reticulating group : Study in *Poa* (Poaceae). Amer J Bot 77: 1383-1400
Speckmann, G., Dijk, G., 1972: Chromosome number and plant morphology in some ecotypes of *Poa pratensis* L. Euphytica 21: 171-180
Spillane, C., Steimer, A., Grossniklaus, U., 2001: Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. Sex Plant Reprod 14: 179-187
Srivastava, A., Gupta, V., Pental, D., Pradhan, A., 2001: AFLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. Theor Appl Genet 102: 193-199
Stebbins, G., 1971: Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold. London
Steinmeyer, B., Wöhrmann, K., 1985: Phänotypenvariabiliät und Umwelt bei *Capsella bursa-pastoris* (*Cruciferae*). Flora 177: 323-334
Stohr, M., Eipel, H., Goerttler, K., Vogt-Schaden, M., 1977: Extended application of flow microfluorometry by means of dual laser excitation. Histochemistry 51: 305-313
Storme, V., Broeck, A., Ivens, B., Halfmaerten, D., Slycken, J., Castiglione, S., Grassi, F., Fossati, T., Cottrell, J., Tabbener, H., Lefavre, F., Saintagne, C., Fluch, S., Krystufek, V., Burg, K., Borda¡cs, S., Borovics, A., Gebhardt, K., Vornam, B., Pohl, A., Alba, N., Agadez, D., Maestro, C., Notivol, E., Bovenschen, J., Dam, B., Schoot, J., Vosman, B., Boerjan, W., Smulders, M., 2004: Ex-situ conservation of Black poplar in Europe: genetic diversity in nine gene bank collections and heir value for nature development. Theor Appl Genet 108: 969-981
Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A., 1991: Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer. Stuttgart
Strelchenko, P., Kovalyova, O., Kazutoshi, O., 1999: Genetic differentiation and geographical distribution of barley germplasm based on RAPD markers. Genet Res Crop Evol 46: 139-205
Struss, D., Plieske, J., 1988: The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. Theor Appl Genet 97: 308-315
Sugiyama, S., Yamaguchi, K., Yamada, T., 2002: Intraspecific phenotypic variation associated with nuclear DNA content in *Lolium perenne* L. Euphytica 128: 145-151
Sun, M., Wong, K., 2001: Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. Amer J Bot 88: 2180-2188
Sunnucks, P., 2000: Efficient genetic markers for population biology. Tree 15: 199-203
Sweeney, P., Danneberger, T., 1995: RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. Crop Sci. 35: 1676-1680
Szczepaniak, M., Cieslak, E., Bednarek, P., 2002: Morphological and AFLP variation of *Elymus repens* L. Gould (Poaceae). Cell Mol Biol Lett 7: 547-558
Taramino, G., Tingey, C., 1996: Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. Genome 39: 277-287

Tautz, D., 1989: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl Acids Res 17: 6463-6471

Tinney, F., 1940: Cytology of parthenogenesis in *Poa pratensis*. J Agri Res 60: 351-360

Travis, S., Maschinski, J., Keim, P., 1996: An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. Mol Ecol 5: 735-745

Tyler, B., Hayes, J., Ellis Davies, W., 1985: Descriptor list for forage grasses. IBPGR. Rome.

Ubi, B., Fujimori, M., Ebina, M., Komatsu, T., 2001: Amplified fragment length polymorphism analysis in diploid cultivars of rhodesgrass. Plant Breed 120: 85-87

UPOV, 1986: Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. TG/4/7. Ryegrass (*Lolium perenne*) International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). Genf

Van Der Hulst, R., Mes, T., Falque, M., Stam, P., Den Nijs, J., Bachmann, K., 2003: Genetic structure of a population sample of apomictic dandelion. Heredity 90: 326-335

Van der Merve, M., Winfield, M., Arnold, G., Parker, J., 2000: Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations. Mol Ecol 9: 379-386

Virk, P., Newbury, H., Jackson, M., Ford-Lloyd, B., 1995: The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. Theor Appl Genet 90: 1049-1055

Voigt, P., Burson, B., 1983: Breeding of apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. Heredity 83: 715-721

von Wettstein Knowles, P., 1992: Cloned und mapped genes: current status. In: Shewry, P.R.(Hrsg.). Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology, Alden Press. Oxford. 231-236

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl Acids Res 23: 4407-4414

Vuylsteke, M., Mank, R., Antonise, R., Bastiaans, E., Senior, M., Stuber, C., Melchinger, A., Lübberstedt, T., Xia, X., Stam, P., Zabeau, M., Kuiper, M., 1999: Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. Theor Appl Genet 1999: 921-935

Walther, U., Kopanke, D., Habekuß, A., Proeseler, G., Schliephake, E., Griebach, E., Richter, K., 1997: Evaluierung und Nutzung genetischer Ressourcen zur Sicherung einer hohen Biodiversität bei landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. In: Biologische Vielfalt in Ökosystemen - Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Reihe A: Angewandte Wissenschaft. Heft 465. 29-41

Warren, J., Raybould, A., Ball, T., Gray, A., Hayward, M., 1998: Genetic structure in the perennial grasses *Lolium perenne* and *Agrostis curtisii*. Heredity 81: 556-562

Waugh, R., McLean, K., Flavell, A., Pearce, S., Kumar, A., Thomas, B., Powell, W., 1997: Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol Gen Genet 253: 687-694

Wedim, W., Huff, D., 1996: Bluegrasses. In: Bartels J.M.,Peterson G.A., Baenziger P.S., and Bingham J.M. (Hrsg.). Cool-Season Forage Grasses. Amer Soc Agron: 665-690

Weising, K., Weigand, F., Driesel, A., Kahl, G., Zischler, H., Epplen, J., 1989: Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. Nucl Acids Res 17: 10128

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W., 1995: DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press. Boca Raton, Florida

Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18: 6531-6535

Wingender, R., 2000: Impact of breeding systems on the genetic diversity of natural plant populations. Schriftenreihe Vegetationskunde 32: 31-35

Wolff, K., Rogstad, S., Schaal, B., 1994: Population and species variation of minisatellite DNA in *Plantago*. Theor Appl Genet 87: 733-740

Wright, S., 1977: Evolution and the genetics of populations. University Press of Chicago. Chicago

Wu, Y., Taliaferro, C., Bai, G., Anderson, M., 2004: AFLP analysis of *Cynodon dactylon* L. Pers. var. *dactylon* genetic variation. Genome 47: 689-696

Zanetto, A., Kremer, A., 1995: Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. I. Monolocus patterns of variation. Heredity 75: 506-517

Zeid, M., 2003: Analysis of genetic diversity based on molecular markers (AFLP) and of heterosis in faba bean (*Vicia faba* L.). Dissertation, Georg-August-University Göttingen

Zhang, L.-H., Ozias-Akins, P., Kochert, G., Kresovich, S., Dean, R., Hanna, W., 1999: Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. Theor Appl Genet 98: 895-902

Zhao, H., Wang, X., Deng, B., Lou, P., Wu, J., Sun, R., Xu, Z., Vromans, J., Koornneef, M., Bonnema, G., 2005: Genetic relationships within *Brassica rapa* as inferred from AFLP fingerprints. Theor Appl Genet 110: 1301-1314

Zhao, X., Kochert, G., 1992: Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet 231: 353-359

Zoneweld, B., Van Iren, F., 2000: Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras. Euphytica 111: 105-110

7 Anhang

Tabelle I: Zusammensetzung der Restriktionsansätze.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionansatz	Endkonzentration
Reaktionspuffer	10x NEB-Puffer 2	1.50 µl	1x
*Mse*I	4 U/µl	0.30 µl	1 U/Ansatz
*Pst*I	20 U/µl	1.05µl	7 U/Ansatz
BSA	1mg/ml	1.0µl	100µg/ml
H_2O_{dd}		ad 15µl	
DNA	20 ng/µl	5.00 µl	100 ng/Ansatz

Tabelle II: Sequenzen der AFLP-Adapter.

Adapter	Sequenz
MseI	- GAC GAT GAG TCC TGA G + TAC TCA GGA CTC AT
PstI	- CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA + TGT ACG CAG TCT AC

Tabelle III: Zusammensetzung der Ligationsansätze.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionansatz	Endkonzentration
Ligase-Puffer	5x	3.00 µl	1x
*Mse*I-Adapter	5 pmol/µl	0.40 µl	0.2 pmol/µl
*Pst*I-Adapter	5 pmol/µl	0.40 µl	0.2 pmol/µl
Ligase (Invitrogen)	1 U/ml	0.20 µl	0.2 U/Ansatz
H_2O_{dd}		2.70 µl	
DNA-Template		3.50 µl	

Tabelle IV: Verwendete Primer für die Präamplifikation.

Primer +1	Primersequenz (5´...3´)
P01	GTA GAC TGC GTA CAT GCA G<u>A</u>
M02	GAT GAG TCC TGA GTA A<u>C</u>
M03	GAT GAG TCC TGA GTA A<u>G</u>

Tabelle V: PCR-Ansatz für die Präamplifikation.

Reagenz	**Konzentration der Stammlösung**	**Volumen je Reaktionansatz**	**Endkonzentration**
DNA-Template		3.50 µl	
Taq-Reaktionspuffer (Eppendorf)	10x	1.50 µl	1x
*Mse*I +1	10 pmol/µl	0.45 µl	0.2 pmol/µl
*Pst*I +1	10 pmol/µl	0.45 µl	0.2 pmol/µl
$MgCl_2$	25mM	0.45 µl	0.25 nmol/µl
dNTPs	10nmol/µl	0.30µl	200 pmol/µl
Taq-Polymerase (Eppendorf)	5U/ml	0.20µl	0.3 U/Ansatz
H_2O_{dd}		8.70 µl	

Tabelle VI: PCR-Profile für die Präamplifikation.

	Temperatur	**Dauer**
Startdenaturierung	95°C	1 min
30 Amplifikationszyklen	94°C 60°C 72°C	30 s 30 s 1 min

Tabelle VII: Verwendete Primer für die selektive Amplifikation.

Primer +3/+4	Primerbasensequenz
P35	5´GAC TGC GTA CAT GCA GAC A 3´
P40	5´GAC TGC GTA CAT GCA GAG C 3´
P44	5´GTA GAC TGC GTA CAT GCA GAT C 3´
M48.01	5´GAT GAG TCC TGA GTA ACA AA 3´
M68.01	5´GAT GAG TCC TGA GTA AGC CA 3´
M75.04	5´GAT GAG TCC TGA GTA AGT AT 3´
M77.02	5´GAT GAG TCC TGA GTA AGT GC 3´

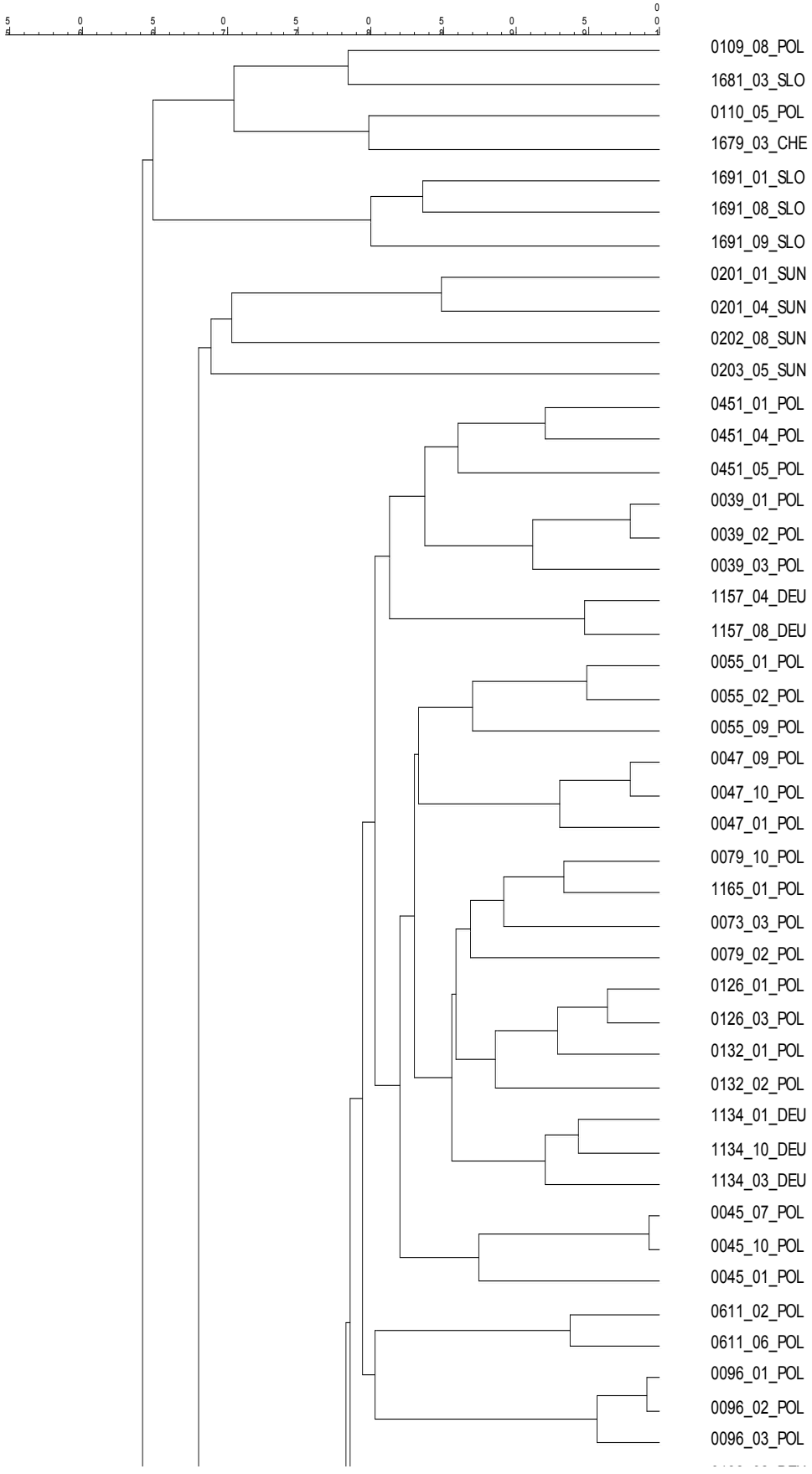
Tabelle VIII: PCR-Komponenten der selektiven +3/+4 – Amplifikation.

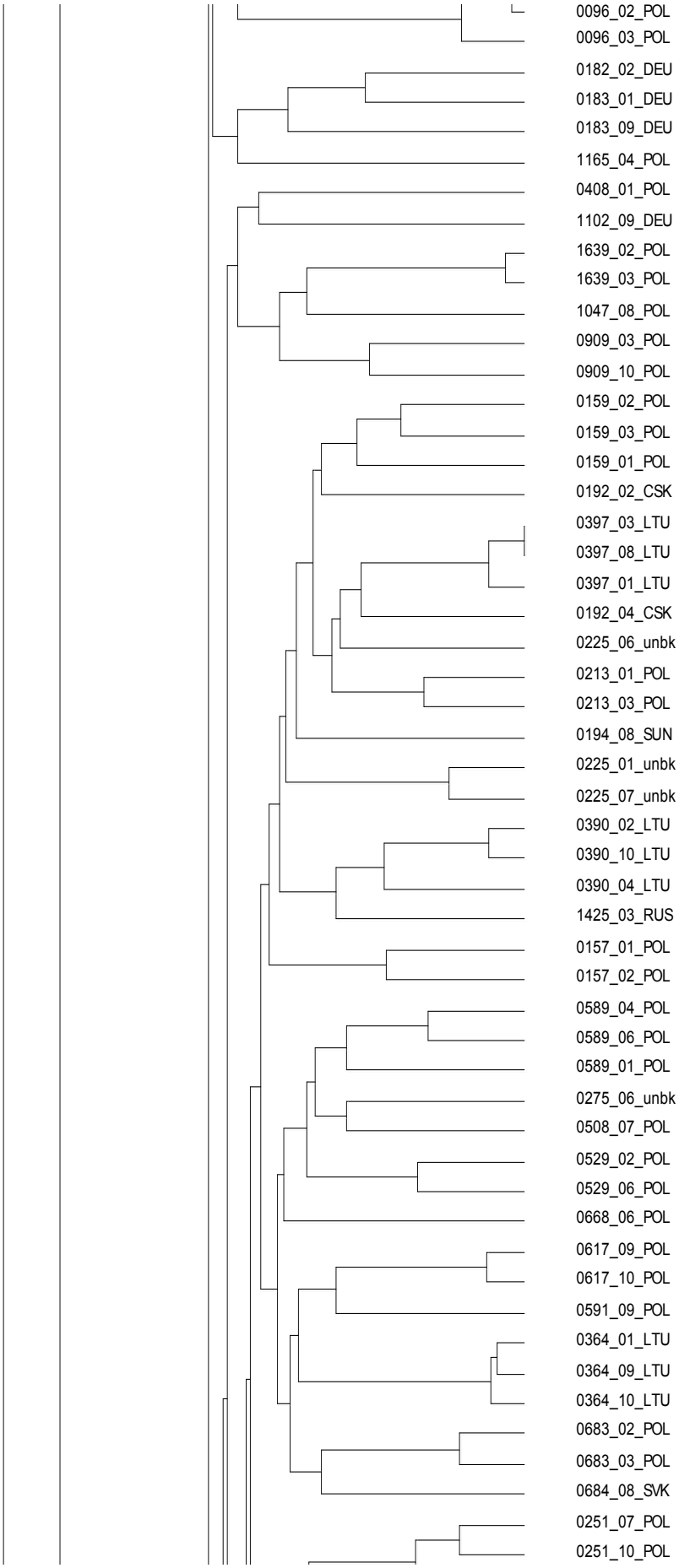
Reagenz	**Konzentration der Stammlösung**	**Volumen je Reaktionansatz**	**Endkonzentration**
Taq-Reaktionspuffer (Eppendorf)	10 x	1.50 µl	1x
*Mse*I +3/+4	10 pmol/µl	0.45 µl	300 pmol/µl
*Pst*I +3	10 pmol/µl	0.09 µl	60 pmol/µl
$MgCl_2$	25mM	0.45 µl	0.25 nmol/µl
dNTPs	10nmol/µl	0.30µl	200 pmol/µl
Taq- Polymerase (Eppendorf)	5U/ml	0.075µl	0.375 U/Ansatz
H_2O_{dd}		9.35 µl	
DNA-Template		3,50 µl	

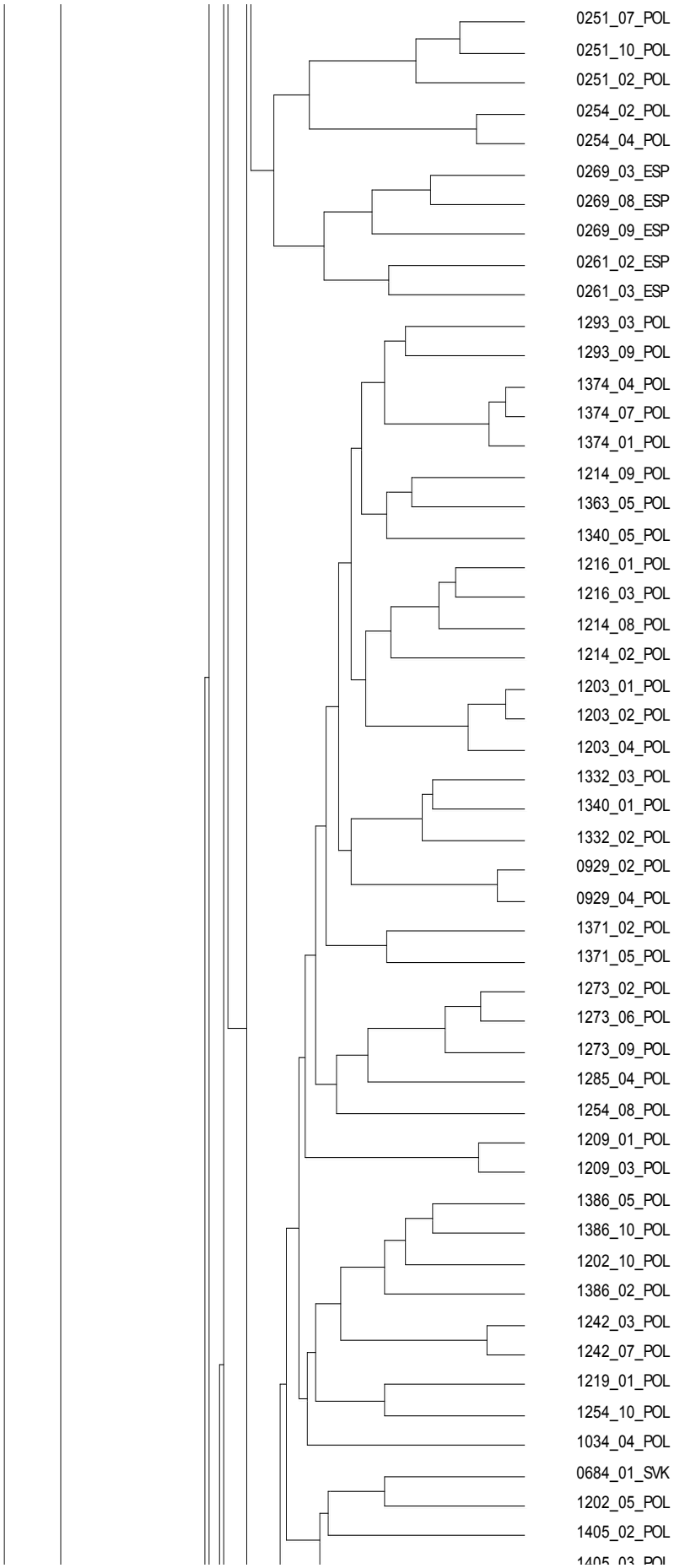
Tabelle IX: PCR-Bedingungen der selektiven AFLP-Amplifikation.

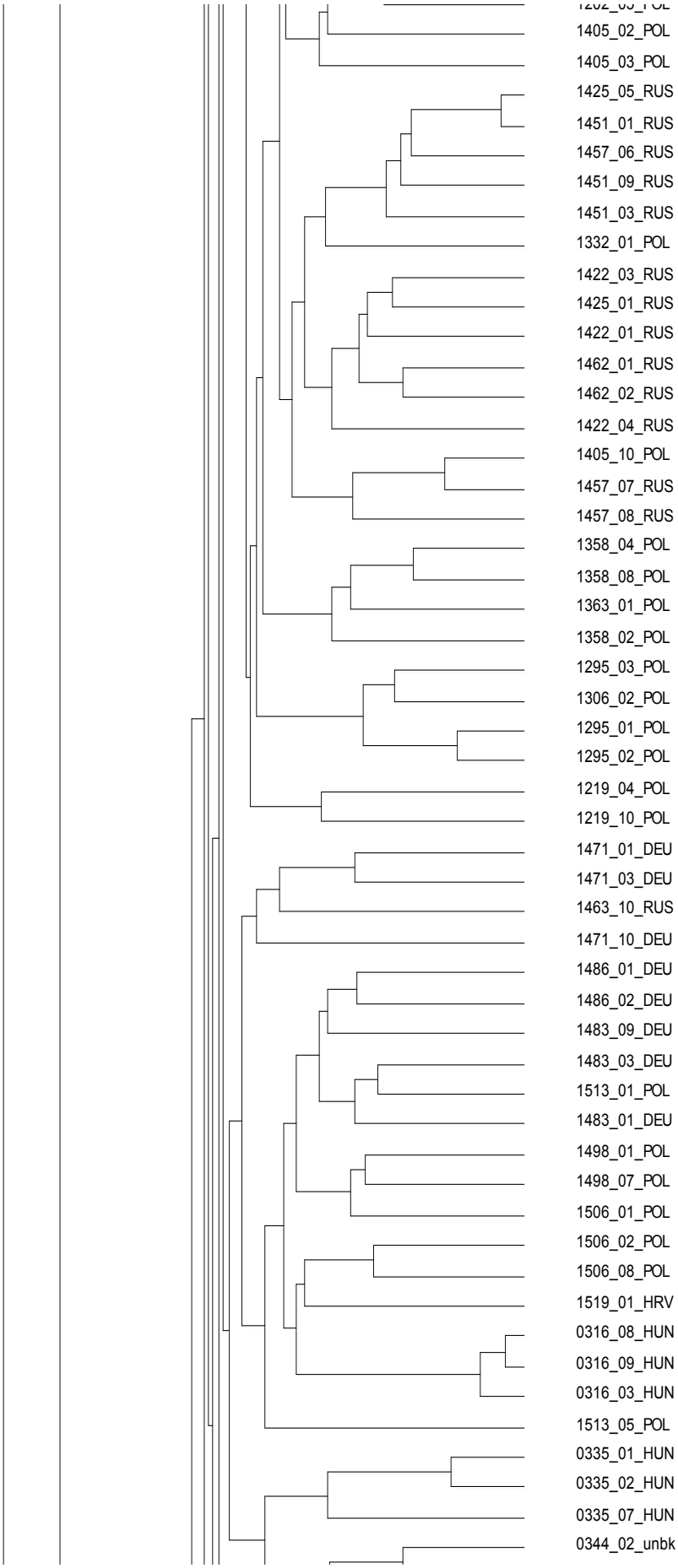
	Temperatur		Dauer
Startdenaturierung	95°C		4 min
Amplifikationszyklen	94°C 65°C(-1°C/Zyklus) 72°C	x 10	30 s 30 s 2 min
	94°C 56°C 72°C	x 24	30 s 30s 2 min
Verlängerung	72°C		5 min
abschliessende Verlängerung	60°C		25 min

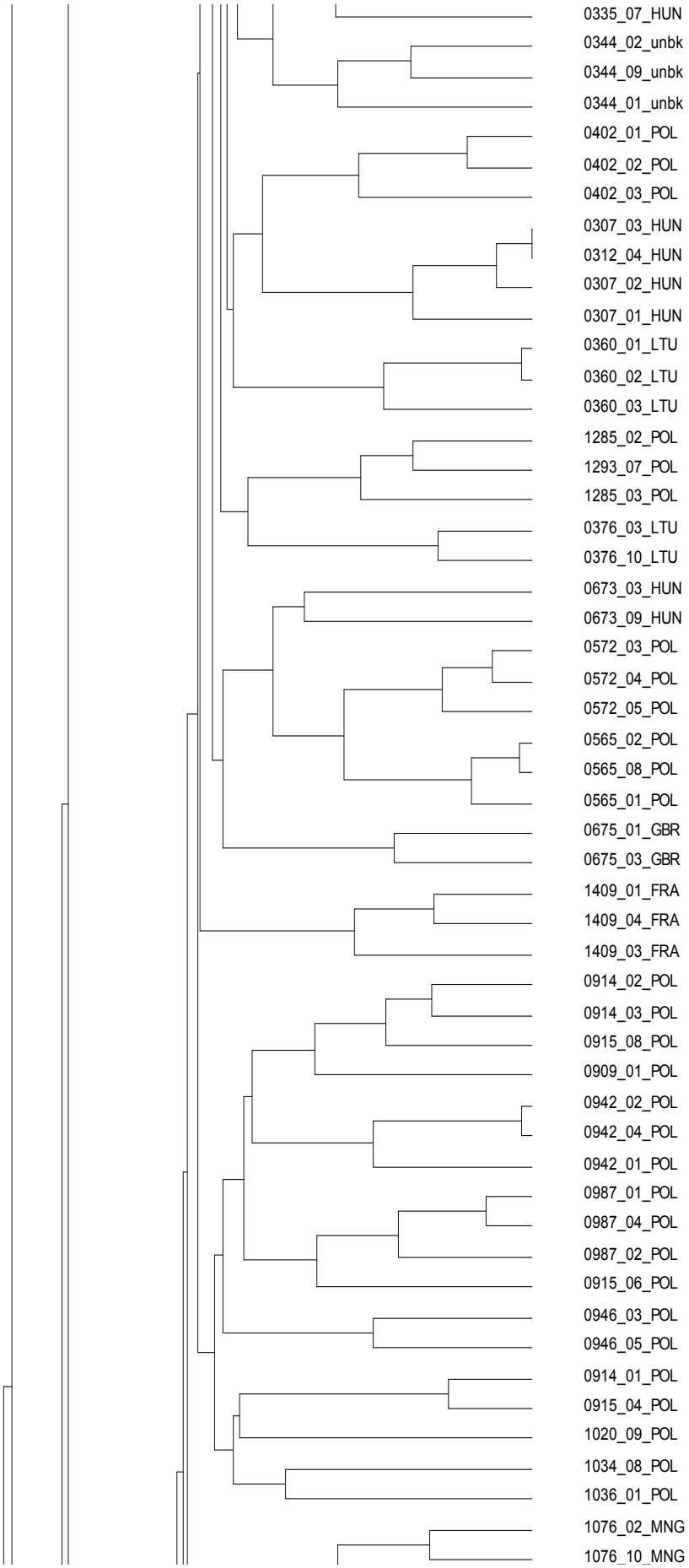
Abbildung I: Jaccard-Ähnlichkeiten zwischen europäischen *Poa*-Genbank-Akzessionen (max. drei Einzelpflanzen/Akzession analysiert; abweichender Ländercode: SLO=SVN).

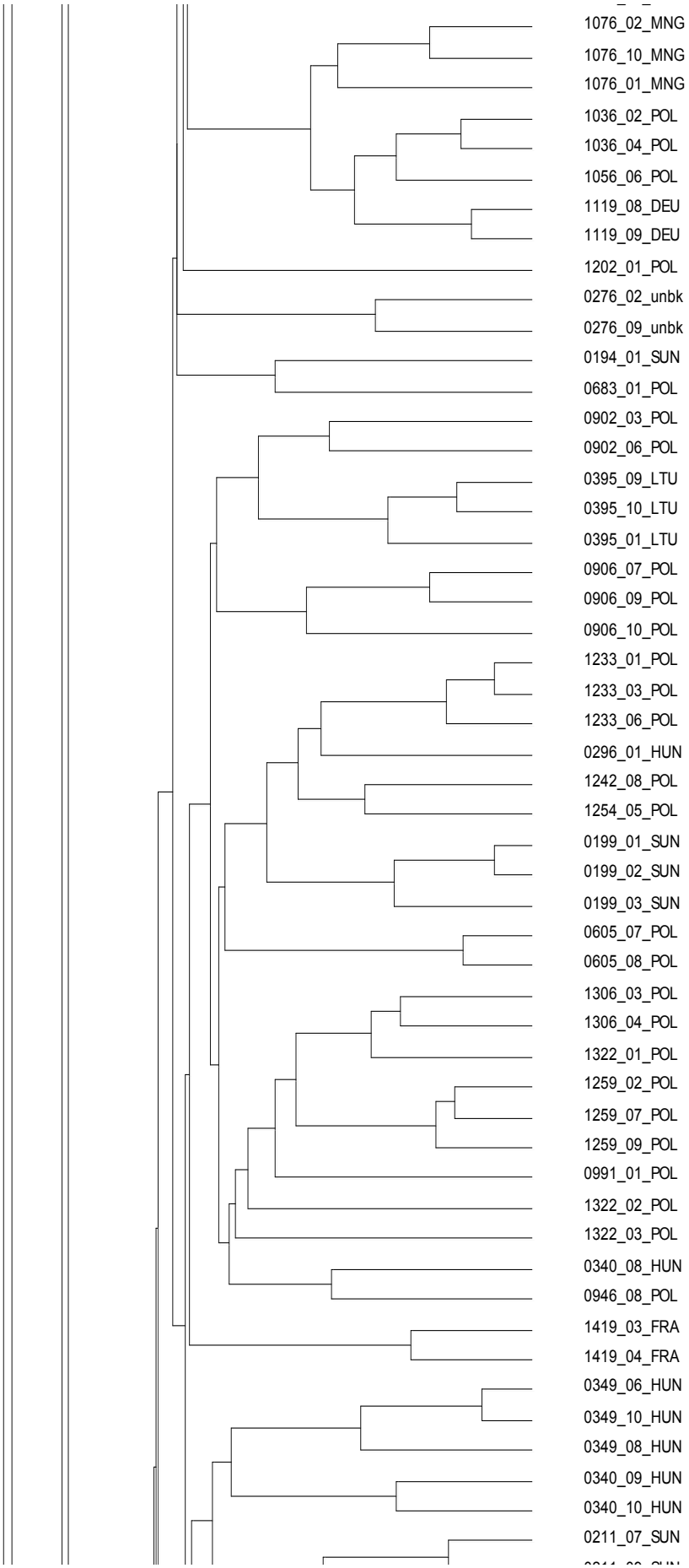


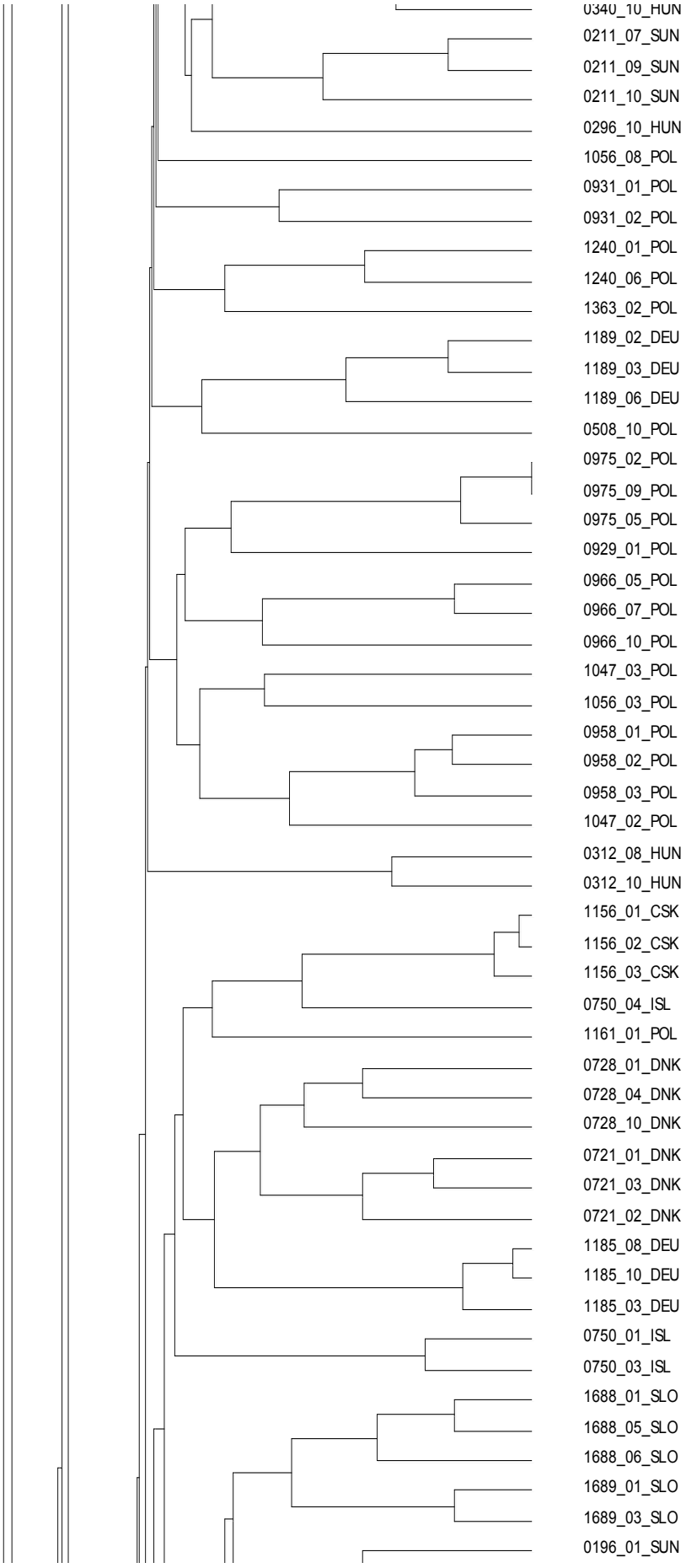

0096_02_POL
0096_03_POL
0182_02_DEU
0183_01_DEU
0183_09_DEU
1165_04_POL
0408_01_POL
1102_09_DEU
1639_02_POL
1639_03_POL
1047_08_POL
0909_03_POL
0909_10_POL
0159_02_POL
0159_03_POL
0159_01_POL
0192_02_CSK
0397_03_LTU
0397_08_LTU
0397_01_LTU
0192_04_CSK
0225_06_unbk
0213_01_POL
0213_03_POL
0194_08_SUN
0225_01_unbk
0225_07_unbk
0390_02_LTU
0390_10_LTU
0390_04_LTU
1425_03_RUS
0157_01_POL
0157_02_POL
0589_04_POL
0589_06_POL
0589_01_POL
0275_06_unbk
0508_07_POL
0529_02_POL
0529_06_POL
0668_06_POL
0617_09_POL
0617_10_POL
0591_09_POL
0364_01_LTU
0364_09_LTU
0364_10_LTU
0683_02_POL
0683_03_POL
0684_08_SVK
0251_07_POL
0251_10_POL

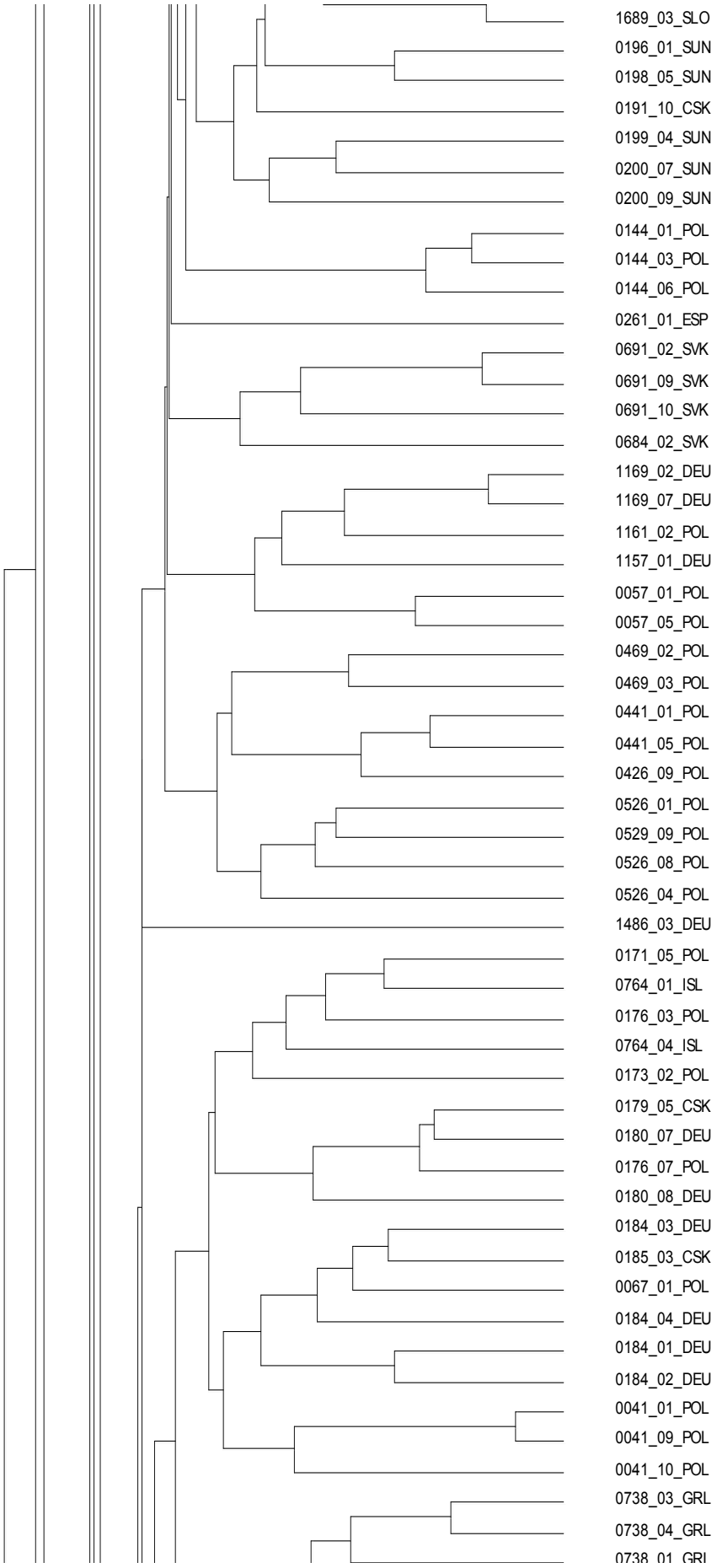

0251_07_POL
0251_10_POL
0251_02_POL
0254_02_POL
0254_04_POL
0269_03_ESP
0269_08_ESP
0269_09_ESP
0261_02_ESP
0261_03_ESP
1293_03_POL
1293_09_POL
1374_04_POL
1374_07_POL
1374_01_POL
1214_09_POL
1363_05_POL
1340_05_POL
1216_01_POL
1216_03_POL
1214_08_POL
1214_02_POL
1203_01_POL
1203_02_POL
1203_04_POL
1332_03_POL
1340_01_POL
1332_02_POL
0929_02_POL
0929_04_POL
1371_02_POL
1371_05_POL
1273_02_POL
1273_06_POL
1273_09_POL
1285_04_POL
1254_08_POL
1209_01_POL
1209_03_POL
1386_05_POL
1386_10_POL
1202_10_POL
1386_02_POL
1242_03_POL
1242_07_POL
1219_01_POL
1254_10_POL
1034_04_POL
0684_01_SVK
1202_05_POL
1405_02_POL

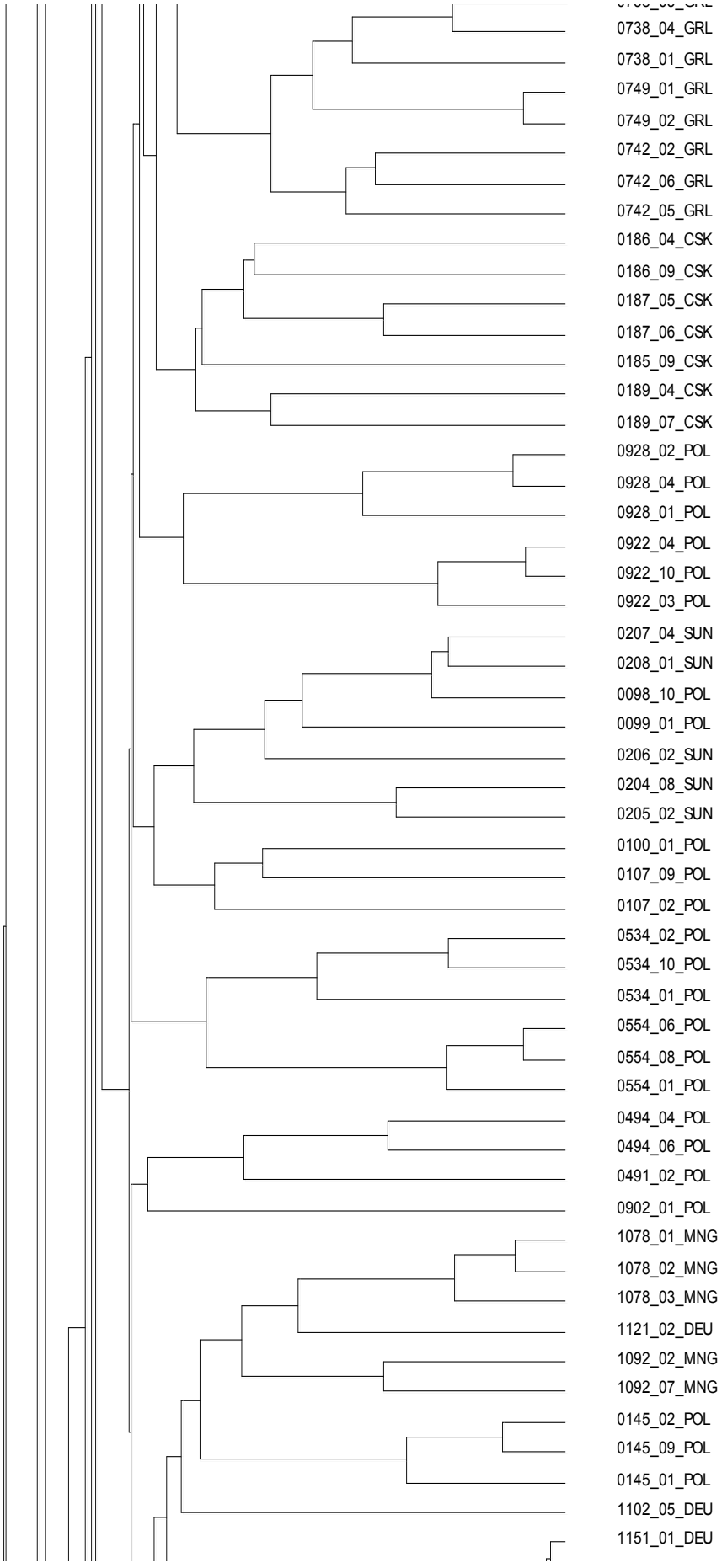

1405_02_POL
1405_03_POL
1425_05_RUS
1451_01_RUS
1457_06_RUS
1451_09_RUS
1451_03_RUS
1332_01_POL
1422_03_RUS
1425_01_RUS
1422_01_RUS
1462_01_RUS
1462_02_RUS
1422_04_RUS
1405_10_POL
1457_07_RUS
1457_08_RUS
1358_04_POL
1358_08_POL
1363_01_POL
1358_02_POL
1295_03_POL
1306_02_POL
1295_01_POL
1295_02_POL
1219_04_POL
1219_10_POL
1471_01_DEU
1471_03_DEU
1463_10_RUS
1471_10_DEU
1486_01_DEU
1486_02_DEU
1483_09_DEU
1483_03_DEU
1513_01_POL
1483_01_DEU
1498_01_POL
1498_07_POL
1506_01_POL
1506_02_POL
1506_08_POL
1519_01_HRV
0316_08_HUN
0316_09_HUN
0316_03_HUN
1513_05_POL
0335_01_HUN
0335_02_HUN
0335_07_HUN
0344_02_unbk

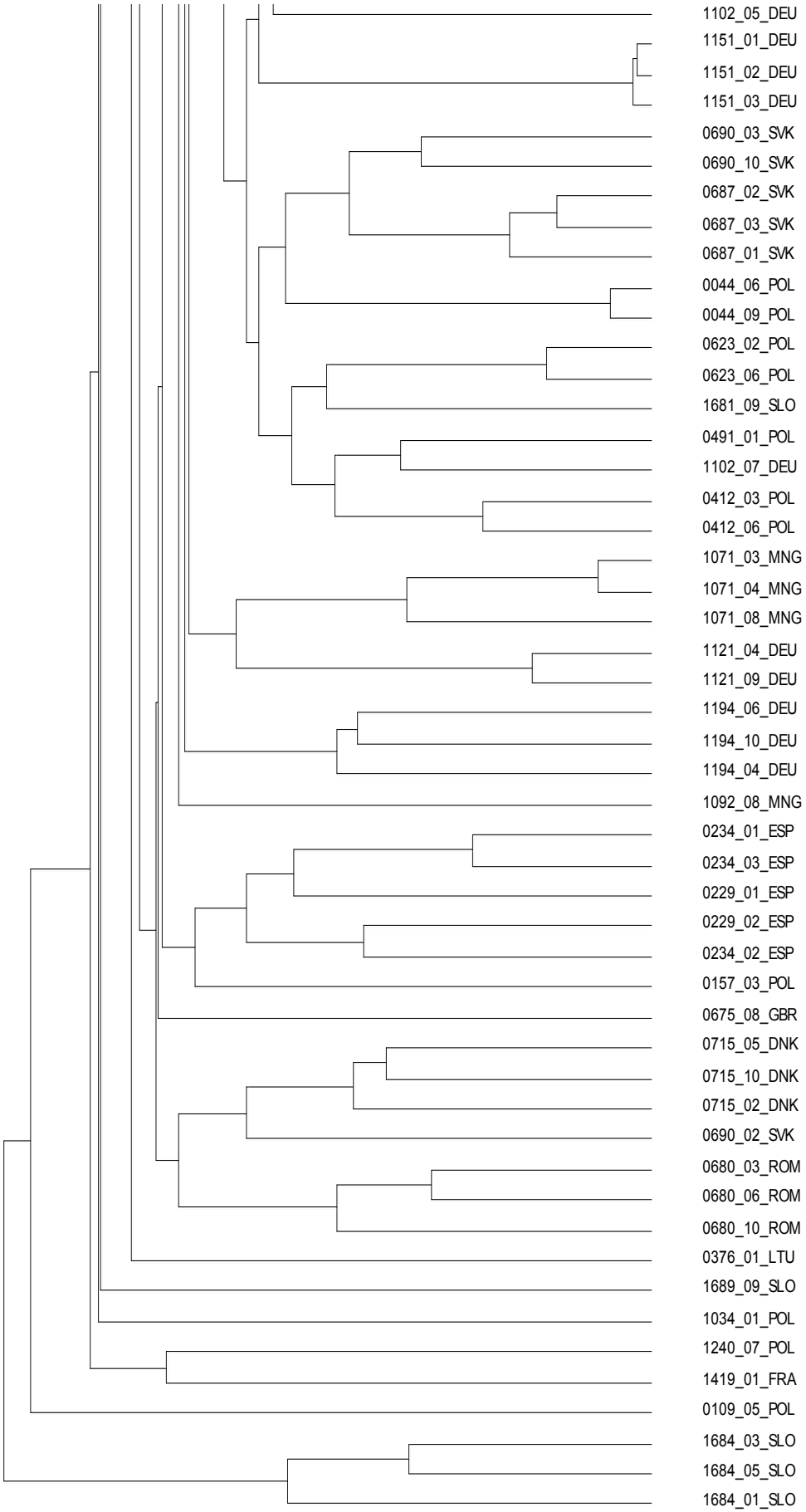

0335_07_HUN
0344_02_unbk
0344_09_unbk
0344_01_unbk
0402_01_POL
0402_02_POL
0402_03_POL
0307_03_HUN
0312_04_HUN
0307_02_HUN
0307_01_HUN
0360_01_LTU
0360_02_LTU
0360_03_LTU
1285_02_POL
1293_07_POL
1285_03_POL
0376_03_LTU
0376_10_LTU
0673_03_HUN
0673_09_HUN
0572_03_POL
0572_04_POL
0572_05_POL
0565_02_POL
0565_08_POL
0565_01_POL
0675_01_GBR
0675_03_GBR
1409_01_FRA
1409_04_FRA
1409_03_FRA
0914_02_POL
0914_03_POL
0915_08_POL
0909_01_POL
0942_02_POL
0942_04_POL
0942_01_POL
0987_01_POL
0987_04_POL
0987_02_POL
0915_06_POL
0946_03_POL
0946_05_POL
0914_01_POL
0915_04_POL
1020_09_POL
1034_08_POL
1036_01_POL
1076_02_MNG
1076_10_MNG


1076_02_MNG
1076_10_MNG
1076_01_MNG
1036_02_POL
1036_04_POL
1056_06_POL
1119_08_DEU
1119_09_DEU
1202_01_POL
0276_02_unbk
0276_09_unbk
0194_01_SUN
0683_01_POL
0902_03_POL
0902_06_POL
0395_09_LTU
0395_10_LTU
0395_01_LTU
0906_07_POL
0906_09_POL
0906_10_POL
1233_01_POL
1233_03_POL
1233_06_POL
0296_01_HUN
1242_08_POL
1254_05_POL
0199_01_SUN
0199_02_SUN
0199_03_SUN
0605_07_POL
0605_08_POL
1306_03_POL
1306_04_POL
1322_01_POL
1259_02_POL
1259_07_POL
1259_09_POL
0991_01_POL
1322_02_POL
1322_03_POL
0340_08_HUN
0946_08_POL
1419_03_FRA
1419_04_FRA
0349_06_HUN
0349_10_HUN
0349_08_HUN
0340_09_HUN
0340_10_HUN
0211_07_SUN


0340_10_HUN
0211_07_SUN
0211_09_SUN
0211_10_SUN
0296_10_HUN
1056_08_POL
0931_01_POL
0931_02_POL
1240_01_POL
1240_06_POL
1363_02_POL
1189_02_DEU
1189_03_DEU
1189_06_DEU
0508_10_POL
0975_02_POL
0975_09_POL
0975_05_POL
0929_01_POL
0966_05_POL
0966_07_POL
0966_10_POL
1047_03_POL
1056_03_POL
0958_01_POL
0958_02_POL
0958_03_POL
1047_02_POL
0312_08_HUN
0312_10_HUN
1156_01_CSK
1156_02_CSK
1156_03_CSK
0750_04_ISL
1161_01_POL
0728_01_DNK
0728_04_DNK
0728_10_DNK
0721_01_DNK
0721_03_DNK
0721_02_DNK
1185_08_DEU
1185_10_DEU
1185_03_DEU
0750_01_ISL
0750_03_ISL
1688_01_SLO
1688_05_SLO
1688_06_SLO
1689_01_SLO
1689_03_SLO
0196_01_SUN


1689_03_SLO
0196_01_SUN
0198_05_SUN
0191_10_CSK
0199_04_SUN
0200_07_SUN
0200_09_SUN
0144_01_POL
0144_03_POL
0144_06_POL
0261_01_ESP
0691_02_SVK
0691_09_SVK
0691_10_SVK
0684_02_SVK
1169_02_DEU
1169_07_DEU
1161_02_POL
1157_01_DEU
0057_01_POL
0057_05_POL
0469_02_POL
0469_03_POL
0441_01_POL
0441_05_POL
0426_09_POL
0526_01_POL
0529_09_POL
0526_08_POL
0526_04_POL
1486_03_DEU
0171_05_POL
0764_01_ISL
0176_03_POL
0764_04_ISL
0173_02_POL
0179_05_CSK
0180_07_DEU
0176_07_POL
0180_08_DEU
0184_03_DEU
0185_03_CSK
0067_01_POL
0184_04_DEU
0184_01_DEU
0184_02_DEU
0041_01_POL
0041_09_POL
0041_10_POL
0738_03_GRL
0738_04_GRL


0738_04_GRL
0738_01_GRL
0749_01_GRL
0749_02_GRL
0742_02_GRL
0742_06_GRL
0742_05_GRL
0186_04_CSK
0186_09_CSK
0187_05_CSK
0187_06_CSK
0185_09_CSK
0189_04_CSK
0189_07_CSK
0928_02_POL
0928_04_POL
0928_01_POL
0922_04_POL
0922_10_POL
0922_03_POL
0207_04_SUN
0208_01_SUN
0098_10_POL
0099_01_POL
0206_02_SUN
0204_08_SUN
0205_02_SUN
0100_01_POL
0107_09_POL
0107_02_POL
0534_02_POL
0534_10_POL
0534_01_POL
0554_06_POL
0554_08_POL
0554_01_POL
0494_04_POL
0494_06_POL
0491_02_POL
0902_01_POL
1078_01_MNG
1078_02_MNG
1078_03_MNG
1121_02_DEU
1092_02_MNG
1092_07_MNG
0145_02_POL
0145_09_POL
0145_01_POL
1102_05_DEU
1151_01_DEU


1102_05_DEU
1151_01_DEU
1151_02_DEU
1151_03_DEU
0690_03_SVK
0690_10_SVK
0687_02_SVK
0687_03_SVK
0687_01_SVK
0044_06_POL
0044_09_POL
0623_02_POL
0623_06_POL
1681_09_SLO
0491_01_POL
1102_07_DEU
0412_03_POL
0412_06_POL
1071_03_MNG
1071_04_MNG
1071_08_MNG
1121_04_DEU
1121_09_DEU
1194_06_DEU
1194_10_DEU
1194_04_DEU
1092_08_MNG
0234_01_ESP
0234_03_ESP
0229_01_ESP
0229_02_ESP
0234_02_ESP
0157_03_POL
0675_08_GBR
0715_05_DNK
0715_10_DNK
0715_02_DNK
0690_02_SVK
0680_03_ROM
0680_06_ROM
0680_10_ROM
0376_01_LTU
1689_09_SLO
1034_01_POL
1240_07_POL
1419_01_FRA
0109_05_POL
1684_03_SLO
1684_05_SLO
1684_01_SLO

Chemikalienverzeichnis

A1: TE:

1 ml Tris HCl 1M, pH 8.0 (Stammlösung)
0,2 ml EDTA 0,5 M, pH 8.0
ad 100 ml mit H_2O_{dd}

EDTA

186,1 g EDTA
pH 8.0 mit NaOH eingestellt
ad 1 l mit H_2O_{dd}

Tris-HCL

121,1 g Tris
pH mit HCl eingestellt (7.4 oder 8.0)
ad 1 l mit H_2O_{dd}

A2: 10x TNE (Ansatz für 250 ml):

25 ml Tris-HCl 1M pH 7.4
29,22 g NaCl
5 ml EDTA 0.5M, pH 8.0

A3: Ladepuffer /Standard-Mix:

450 µl Ladepuffer-Stammlösung
30 µl Standard MegaBace ET 900-Rox

Ladepuffer-Stammlösung:

200 µl ABI-Stammlösung Ladepuffer
(25 mM EDTA pH 8, 100 mg/ml Blue dextran)
800 µl Formamid

A4 : 6%iges Polyacrylamidgel :

36,0 g	Harnstoff
15,0 ml	40% Polyacrylamid (19:1)
10,0 ml	10 x TBE-Puffer
560,0 µl	10% APS
56,0 µl	TEMED

ad 100 ml mit H_2O_{dd}

A5: DAPI Ma IV:

1,07 g $MgCl_2$ $6H_2O$,
5,0g NaCl
12,11 g Tris
5,0 ml Triton X-100
9,0 mg Natriumacetat $2H_2O$
10 ml DAPI-Stammlösung
mit konzentrierter HCl auf pH 7,0 eingestellt
ad 1 l mit H_2O_{dd}

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von 2002 bis 2005 im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt und unter der Vorhaben-Nummer F 59/02 AiF von der Gemeinschaft zur Förderung der Privaten Deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (AiF/GFP) gefördert.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Graner, für die Überlassung des Themas bedanken.

Meinen Betreuern, Herrn Dr. Dehmer und Frau Willner, die die Studie leiteten, mir in vielerlei Hinsicht weitergeholfen und zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen haben, danke ich sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matzk für seine Unterstützung in Sachen Ploidie-Untersuchungen und FCSS sowie die ständige Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion.

Herrn Prof. Weber danke ich für die Betreuung am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie für hilfreiche Diskussionen bei statistischen Fragestellungen.

Insbesondere Frau Dr. Stracke und Frau Dr. Potokina sei an dieser Stelle für die vielen fachlichen Auseinandersetzungen gedankt.

Auch die Mitarbeiter der IPK-Arbeitsgruppen Molekulare Marker und Embryogenese/Parthenogenese sowie die damit verbundene, konstruktive Arbeitsatmosphäre trugen sehr zum Werden dieser Arbeit bei.

Vielmals danken möchte ich Tilla Schwendtke und Katrin Trnka für die technische Unterstützung in Labor, Birgit Freitag und den Mitarbeitern der Außenstelle Malchow des IPK für die Unterstützung bei den umfangreichen Feldversuchen.

Den Züchterhäusern DSV, NPZ und SZS danke ich für die freundliche und effektive Teilnahme in der Primärevaluierung.

Mein persönlichen Dank für die stetige Unterstützung und Motivation gilt meiner Familie und meinen Freunden Uljana Hesse, Tzwetina Brumbarova, Rumen Ivanov, Gudrun Oswald, Dessislava Dobrikova, Milena Popova, Pavel Lukaschek, und Darius Kasamekas.

Lebenslauf

Name	Kalina Andreeva
Geburtsdatum/Ort	17 November 1973 / Bourgas (Bulgarien)
Address	Selkeweg 4, D-06466 Gatersleben, Deutschland
Staatsangehörigkeit	bulgarisch
Familienzustand	ledig
Schule	
1980 – 1991	Oberschule mit humanitär-ästhetischem Profil "Hl. Hl. Kyrill und Method" Bourgas/Bulgarien
Studium	
1991 – 1997	Agronomische Fakultät der Institut für Landwirtschaft, 4000 Plovdiv/ Bulgarien
Berufstätigkeit	
1997 – 1999	Agraringenieur in der landwirtschaftlichen Genossenschaft "Plodorodie", 4800 Prosenik, Bulgarien
Weiterbildung	
1999-2001	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Zusatzstudiengang „Standort- und umweltgerechte Landwirtschaft in den Transformationsländern" Thema der Masterarbeit: „Vorkommen und Bedeutung endophytischer Pilze in Nutzgräsern in Bulgarien"
2002-2005	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, Deutschland. Thema des Projektes und Dissertation „Erschließung genetischer Ressourcen der Wiesenrispe (*Poa pratensis* L.) für die Gräserzüchtung durch Analyse wichtiger Merkmalsausprägungen"

PUBLIKATIONEN

Andreeva, K., K.J. Dehmer, E. Willner, 2003: Assessment of *Poa* genetic resources for breeding purposes by evaluation of important traits. Czech J. of Genet Plant Breed 39,:185-187

Andreeva, K. & E. Willner, 2005: Assessment of *Poa* genetic resources for breeding purposes by evaluation of agronomical important traits. In: Maggioni, L. et al.: Report of a working group on Forages, 8th meeting of the ECP/GR working group on forages, Linz, Austria, 10-12 April 2003, IPGRI Rome, :158-162

Hesse, U., H. Hahn, K. Andreeva, K. Förster, K. Warnstorff, W. Schöberlein and W. Diepenbrock, 2004: Investigations on the influence of *Neotyphodium* endophytes on plant growth and seed yield of *Lolium perenne* genotypes. Crop Sci. 44: 1689-1695.

POSTER

Andreeva, K., K.J. Dehmer & E. Willner: "Morphologische Variabilität bei europäischen *Poa pratensis*-Ökotypen" 10. Tagung der AG Molekulare Marker der GPZ, Freising, 16.-17.09.2002.

Andreeva, K., K.J. Dehmer & E. Willner: Assessment of *Poa* genetic resources for breeding purposes by evaluation of important traits. Eucarpia Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting and 15th EUCARPIA Medicago spp. Group Meeting. Brno, Czech Republic, 01-05 September 2003.

Andreeva, K., E. Willner & K.J. Dehmer: Assessment of *Poa* genetic resources for breeding purposes by agronomical and molecular evaluations. 11th Molecular Markers Symposium of the GPZ: Harnessing genetic diversity: genomics and allele mining. Gatersleben, 16.-17.09.2003.

Andreeva, K., J. Mattner, T. Sretenovic Rajicic, C. Wiedow & K.J. Dehmer: Diversity screening in the IPK genebank by AFLPs, SNPs and SSRs. IPK -Institutstag, Gatersleben 9.10. 2003

Andreeva, K., Willner, E., Dehmer, K.J.: Morphological und genetic diversity in Eurasian ecotypes of *Poa pratensis* L. 7. GPZ-Tagung. Halle/Saale, 03.-05.03.2004.

Hahn, H., Andreeva, K., Willner, E., Diepenbrock, W.: Fungal Endophytes in grass species in Bulgaria and infection level in relation to altitude and water supply of their habitats. – 5th International Symposium on *Neotyphodium*/Grass Interactions, Fayetteville/USA, 23.-26.05.2004.

Andreeva, K., E. Willner & K.J. Dehmer: Morphologische, molekulare und Reproduktions-Diversität in einer europäischen *Poa pratensis* L. Kollektion. GPZ-AG-Genomanalyse Bonn 22-23.02.2005

VORTRÄGE

Andreeva, K.

Erschließung genetischer Ressourcen der Wiesenrispe (*Poa pratensis* L.) für die Gräserzüchtung durch Analyse wichtiger Merkmalausprägungen. Vortrag Jahrestagung der GFP-Abteilung Futterpflanzen, Bonn, 5-6.11.2002.

Andreeva, K. & E. Willner

Assessment of *Poa* genetic resources for breeding purposes by evaluation of important traits. In: Maggioni, L. et al.: Report of a working group on Forages, 8th meeting of the ECP/GR working group on forages. Linz, Austria, 10-12 April 2003.

Andreeva, K

Erschließung genetischer Ressourcen der Wiesenrispe (*Poa pratensis* L.) für die Gräserzüchtung durch Analyse wichtiger Merkmalausprägungen. Vortrag Jahrestagung der GFP-Abteilung Futterpflanzen, Bonn, 6-7.11.2003.

Andreeva, K

Erschließung genetischer Ressourcen der Wiesenrispe (*Poa pratensis* L.) für die Gräserzüchtung durch Analyse wichtiger Merkmalausprägungen. Vortrag Jahrestagung der GFP-Abteilung Futterpflanzen, Bonn, 3-4.11.2004.

Andreeva, K

Assessment of germplasm accessions of Kentucky Bluegrass for breeding purposes by evaluation of important traits.1st IPK Student Conference, 22-25.06.2005 Gatersleben

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Gatersleben, den 01.08.2005

Kalina Andreeva