



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Messung der Genomgröße von *Biscutella laevigata*
mittels Durchflusszytometrie und Analyse systematisch-
populationsgenetischer Aspekte sowie Untersuchung
technisch-methodischer Einflussfaktoren auf die
Messung“

verfasst von

Philipp Glaser

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 445 482

Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium UF Biologie und Umweltkunde UF
Bewegung und Sport

Betreut von: Ass.-Prof. Mag. Dr. Hanna Schneeweiss, Privatdoz.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all jenen Personen, die mich im Rahmen der Arbeiten für meine Diplomarbeit unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. Christiane König, die mich während der gesamten Zeit betreut und begleitet hat, den Großteil des Pflanzenmaterials gesammelt hat, das Pflanzenmaterial mit mir verarbeitet hat, mir alle notwendigen Arbeitstechniken für die Analyse mittels Durchflusszytometrie beigebracht hat und mich schließlich auch tatkräftig bei der Auswertung der Daten unterstützt hat.

Frau Dr. Eva Maria Temsch, die mir bei technischen und methodischen Problemen geholfen hat.

Frau Prof. Mag. Dr. Hanna Schneeweiss, die meine Arbeit kontrolliert, korrigiert und beurteilt hat.

Allen Sammlern und Sammlerinnen, die durch ihr Hilfe diese Arbeit ermöglicht haben – Dr. Luise Ehrendorfer-Schratt, Dr. Friedrich Ehrendorfer, Dr. Josef Greimler, Franz Tod und Rudolf Wernert

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
2. Ziele der Diplomarbeit	11
3. Material und Methoden	11
3.1 Untersuchungsmaterial	11
3.2 Methoden	16
3.2.1 Chromosomenzählung	16
3.2.1.1 Untersuchungsmaterial	16
3.2.1.2 Vorbehandlung und Fixierung	17
3.2.1.3 Feulgenfärbung und Chromosomenzählung	17
3.2.2 Genomgrößenmessung	18
3.2.2.1 Präparation	18
3.2.2.2 Messung Mittels Durchfluszytometrie (Flow cytometry)	18
3.2.3 Dateneingabe mit Excel und SPSS	24
3.2.4 Statistische Methoden	26
4. Ergebnisse	27
4.1 Chromosomenzählung	27
4.2 Überblick über die Genomgrößen in den verschiedenen Subspezies von <i>Biscutella laevigata</i>	28
4.3 Variation der Messwerte innerhalb der Individuen bzw. innerhalb der Populationen	34
4.4 Konstanz bzw. Variation des DNA-1C-Gehalts innerhalb einer Ploidiestufe bzw. innerhalb einer Subspezies	35
4.5 Triploide Individuen in den diploiden Populationen	39
4.6 Genomgröße im Zusammenhang mit „methodisch-technischen“ Aspekten	41
4.7 Einfluss unterschiedlicher Standards auf die Messergebnisse	41

4.8 Einfluss unterschiedlicher Messgeräte auf die Messergebnisse	42
4.9 Vergleich der Messgenauigkeit der beiden Geräte anhand der G1-Variationskoeffizienten	45
4.10 Einfluss der Durchlaufgeschwindigkeit (speed) auf die Messergebnisse	46
4.11 Einfluss der Anzahl der gemessenen Kerne auf die Messergebnisse	49
4.12 Zusammenhang der Variationskoeffizienten (CV) von Probe und Standard	50
4.13 Einfluss des Zeitfaktors auf die Messergebnisse – Zeit nach dem Sammeln/Präparieren/Färben	51
5. Diskussion	55
5.1 Chromosomenzählung	55
5.2 Überblick über die Genomgrößen	56
5.3 Variation der Messwerte innerhalb der Individuen, der Populationen, der Subspezies, bzw. innerhalb der Ploidiestufen	57
5.4 Triploide Individuen in den diploiden Populationen	58
5.5 Einfluss unterschiedlicher Standards auf die Messergebnisse	60
5.6 Einfluss unterschiedlicher Messgeräte auf die Messergebnisse	61
5.7 Einfluss der Durchlaufgeschwindigkeit (speed) bzw. der Anzahl der gemessenen Kerne auf die Messergebnisse	61
5.8 Zusammenhang der Variationskoeffizienten (CV) von Probe und Standard	62
5.9 Einfluss des Zeitfaktors – nach dem Sammeln/Präparieren/Färben	62
6. Anhang	64
6.1 Zusammenfassung	64

1. Einleitung

Biscutella laevigata - das Glatte Brillenschötchen – aus der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler, Ordnung Brassicales (Kreuzblütlerartige)) steht im Mittelpunkt meiner Diplomarbeit. Zu dieser Familie gehören auch viele Kulturpflanzen (zB *Brassica oleracea*, der Gemüsekohl, *Brassica nigra*, der Schwarze Senf, *Bassica napus*, der Raps uvm.), wodurch sie ist von



Abb. 1. Blütenstand mit Bestäuber, *B. laevigata*

ssp. *laevigata*, Großeck/Speiereck ca. 2150 m

großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. Es handelt sich bei den Vertretern dieser Familie meist um krautige Pflanzen, häufig mit grundständiger Blattrosette aus schraubig gestellten, fiederschnittig bis ungeteilten Laubblättern ohne Stipeln. Weiters zeichnen sich die Brassicaceae durch ihre charakteristischen Blüten mit der Blütenformel:

* $K_{2+2} C_4 A_{2+4} G_{(2)}$ und ihre 2-fächrige Kapselfrucht, der Schote bzw. dem Schötchen aus.



Abb. 2. *B. laevigata* ssp. *gracilis*?, Pollauer Berge, ca. 520 m

Bei *Biscutella laevigata* handelt es sich um eine 15 - 30 cm hohe, mehrjährige, krautige Pflanze mit lockerer Traube und 0,4 – 1 cm großen Blüten mit hellgelben Petalen. Sie besitzt gestielte, lanzettliche, ganzrandige bis gezähnte Grundblätter (Rosettenblätter) und meist kleinere Stängelblätter.



Abb. 3. *B. laevigata* ssp. *kernerii*,
Unterloiben, 250 m



Abb. 4. *B. laevigata* ssp. *laevigata*,
Feuerkogel, ca. 1650 m

Als spezielles Merkmal werden die namensgebenden brillenförmigen, 8–13 mm breiten Schötchen auf abstehenden Stielen, beschrieben. Als Schötchen wird diese Kapselfrucht, die sich typischerweise mit zwei Klappen öffnet, bezeichnet, wenn sie gedrungen ist und höchstens dreimal so lang wie breit ist (im anderen Fall bezeichnet man die Frucht als Schote). Im Fall von *Biscutella laevigata* handelt es sich bei den Schötchen jedoch um keine Streufrucht, sondern um Spalt-Nussfrüchte, da die (Teil)Früchte einzeln mitsamt dem jeweiligen Fruchtblatt abfallen. Die Blütezeit erstreckt sich von April bis September und die als geflügelte Nüsschen bezeichneten Früchte werden anschließend durch den Wind ausgebreitet (vgl. Adler, Fischer & Oswald, 1994, S. 610).



Abb. 5. Felsrasen mit *B. laevigata* ssp. *austriaca*, Hochschwab, ca. 1700 m

Biscutella laevigata findet man einerseits in Föhrenwälder und auf Trockenrasen in collin bis submontanen Lagen und andererseits auch auf Magerrasen, Schutthalden, Flussschotter und in Föhrenwäldern der (collinen) montanen bis alpinen Lagen (vgl. Adler, Fischer & Oswald, 1994, S. 610). An dieser Stelle sollte man jedoch auch beachten, dass es bei *B. laevigata* zahlreiche Unterarten gibt, welche teilweise sowohl unterschiedliche Standorte besiedeln als auch unterschiedliche Ploidiestufen aufweisen. „Der polyploide Sippen-Komplex der *Biscutella laevigata* s.l. ist auf Grund seiner sehr variablen morphologischen Merkmale und der zum Teil starken Aufsplitterung der Areale der einzelnen Sippen nur sehr schwer systematisch zu gliedern, schreibt König (1994, S. 1). Bereits 1910 veröffentlichte Malinowski eine erste größere Monographie der Gattung *Biscutella* in der er sie in 24 Arten gliedert. Machatschki-Laurich (1926) gliedert den Formenkreis der *B. laevigata* in weiterer Folge in 10 Unterarten und 7 Varietäten, wobei die Gliederung bis zu diesem Zeitpunkt vornehmlich durch morphologische und teilweise auch durch geographisch-genetische Merkmale erfolgte. Besonders die karyosystematischen Arbeiten von Manton in den Jahren 1934 und 1937 waren von großer Bedeutung und ergaben nach ihren Chromosomenzählungen an 11 Unterarten bzw. Varietäten von *B. laevigata* drei Ploidiestufen – Diploide ($2n = 2x = 18$), Tetraploide ($2n = 4x = 36$) und weiters hexaploide Pflanzen aus Nordspanien ($2n = 6x = 54$) (Manton, 1934, 1937).

Da in meiner Arbeit die Polyploidie von *Biscutella laevigata* einen besonderen Stellenwert einnimmt und dieser Aspekt in viele Betrachtungen und Ergebnisse einfließt, möchte ich auf den Begriff der Polyploidie an dieser Stelle gesondert eingehen.

„Das Genom ist in Chromosomen organisiert. Diese werden über die Chromosomenzahl, die Grundzahl, die Ploidiestufe, den Karyotyp und den DNA-Gehalt, den sie aufbringen, zu einfachen beschreibenden Parametern der Pflanzensippen und Arten. Sowohl drastische Evolutionsschritte wie Polyploidisierung oder Dysploidie, wie auch kleine selektionsbedingte Veränderungen am DNA-Gehalt wirken sich auf diese Parameter aus. Ihre Kenntnis ist wichtig für die taxonomische Einordnung und das Verständnis der Evolution und Ökologie von Arten oder biogeographischer Prozesse“, schreibt Durka (2002, S. 58 f). Der Begriff Polyploidie bezieht sich auf die Vervielfachung des kompletten Chromosomensatzes in den Zellen eines Organismus (Weiss-Schneeweiss, 2013, S. 213). Im Lehrbuch von Campbell, Reece & Markl (2006, S. 555) wird auf den Begriff der Polyploidie vor allem im Zusammenhang mit sympatrischer Artbildung eingegangen. Hierzu schreibt Campbell et al. (2006, S. 555), dass manche Pflanzenarten durch Fehler bei der Zellteilung, die zu einem zusätzlichen Chromosomensatz führen, entstehen. Dabei handelt es sich um eine Mutationsform, die man als Polyploidie bezeichnet. Individuen mit mehr als zwei Chromosomensätzen, welche alle von einer einzigen Art stammen, bezeichnet man als autopolyploid. Beispielsweise kann sich die Chromosomenzahl von der diploiden Anzahl ($2x$) zu einer tetraploiden Anzahl ($4x$) verdoppeln, wenn es bei der Meiose zu einem Fehler kommt. Nun kann sich die tetraploide Form zwar selbst bestäuben und auch mit anderen tetraploiden Individuen kreuzen, jedoch kann sie sich nicht erfolgreich mit diploiden Pflanzen der Ausgangspopulation kreuzen. Campbell schreibt in diesem Zusammenhang auch, dass triploide Nachkommen steril wären, weil ungepaarte Chromosomen sowie trivale Chromosomen zur abnormalen Meiose führen.

Durka (2002, S. 58 f; zit.n. Ramsey & Schemske, 1998) schreibt weiters: „Die meisten Polyploiden entstehen durch Fusion nicht reduzierter Gameten, d.h. diploide Pollen und vor allem diploide Eizellen. Dabei können neben direkter Polyploidisierung auch triploide Zwischenstufen eine Rolle spielen, vor allem bei der Entstehung von Autopolyploiden.“ Als Folgen der Polyploidisierung nennt Durak (2002, S. 59) mehrere Unterschiede zwischen den Diploiden und Polyploiden und führt dabei Effekte des erhöhten DNA-Gehalts pro Zelle an (zB Erhöhung der Zellgröße, Erhöhung der Radiosensibilität usw.), weiters nennt er genetische Effekte wie die erhöhte Anzahl und Variabilität von Genkopien und außerdem noch Selektionseffekte während der Etablierung neu entstandener Polyploider. Im Gegensatz zum Genom von höheren Tieren besitzt das Genom von Pflanzen große Anteile

an repetitiver DNA (Weiss-Schneeweiss, 2013, S. 7; zit.n. Kejnosky et al., 2009; Schmidt and Heslop-Harrison, 1998; Leitch and Leitch, 2008).

Die Fundorte von diploiden Sippen von *Biscutella laevigata* beschränken sich auf mitteleuropäische Gebiete außerhalb der Alpen, Tetraploide hingegen kommen hauptsächlich in der Alpenregion vor. König (1994, S. 31) schreibt, dass der Großteil der untersuchten Diploiden in der kollinen und montanen Stufe wächst und bei ihren Untersuchungen keine Überschneidungsbereiche zwischen den Verbreitungsgebieten der Diploiden und jenen der Tetraploiden gefunden wurden. Dazu schreibt Durak (2002, S. 61), dass Polyploide häufig geringere Fitness zeigen als ihre diploiden Ursprungsarten. Jedoch kann die Etablierung von neu entstandenen Tetraploiden durch unterschiedliche Faktoren begünstigt werden, zB erhöhte Selbstbestäubung, vegetative Fortpflanzung bzw. erhöhte Produktion unreduzierter Gameten am Entstehungsort, erhöhte Kolonisierungsfähigkeit bzw. ökologische oder phänologische Nischendifferenzierung zwischen den Cytotypen. Manton kommt 1937 im Rahmen ihrer Kreuzungsversuche und des Studiums des Paarungsverhaltens der Chromosomen in der Meiose zum Schluss, dass die Tetraploiden durch Autopolyploidie entstanden sind. Weiters leitet Manton (1934) auf Grund der geographischen Verteilung der von ihr untersuchten Populationen die Theorie ab, dass die Diploiden, welche Großteils in den während der Würm-Eiszeit unvergletscherten Gebieten außerhalb des Alpenraums vorkommen, interglaziale Relikte sein müssten.



Abb. 6. *B. laevigata* ssp. *austriaca*, Schneeberg /Ochsenboden, ca. 1900 m

Die Tetraploiden sind ihrer Ansicht nach jüngeren Ursprungs und erst postglazial in ihr heutiges Verbreitungsgebiet in den Alpen eingewandert. Manton ist also der Meinung, dass die im Rahmen ihrer Forschungen erkannten, zytologischen Unterschiede in der Geschichte der Populationen begründet sind und beschreibt die tetraploiden Populationen als postglaziale Einwanderer. Die diploiden Populationen beschreibt Manton andererseits als interglaziale bzw. präglaziale Relikte. In weiterer Folge führten sowohl Bresinsky und Grau (1970) als auch Schönfelder (1968b) Chromosomenzählungen an *Biscutella laevigata* durch und besonders Schönfelder (1986b) unterstützte Mantons (1937) Theorie zur späteren

Einwanderung, der Tetraploiden, in die Alpen. Schönfelder (1968b, 1970) verwendete zur Beschreibung der abgeleiteten Stellung der Tetraploiden den Begriff „adalpin“.

In ihren Arbeiten über *Biscutella laevigata* bemerkten sowohl König (1994) als auch Dannemann (2000) neben den üblichen diploiden und tetraploiden Vertretern jeweils noch einzelne Individuen mit annähernd triploidem Chromosomensatz ($2n = 3x = 24$).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Unterarten von ausgewählten Standorten des Alpenraums und der nordöstlich angrenzenden Gebiete untersucht:

Tab. 1. Auflistung der untersuchten Unterarten und deren Ploidiestufe

<i>Biscutella laevigata</i> ssp. <i>austriaca</i>	$2n = 2x = 18$
<i>Biscutella laevigata</i> ssp. <i>kerner</i>	$2n = 2x = 18$
<i>Biscutella laevigata</i> ssp. <i>laevigata</i>	$2n = 4x = 36$
<i>Biscutella laevigata</i> ssp. <i>gracilis</i>	$2n = 2x = 18$

Durka (2002, S. 59; zit.n. Ayele et al. 1996) schreibt: „Polyploidisierung führt zu ungefähr proportionaler Erhöhung des DNA-Gehaltes.“ Somit ist es möglich die Ploidiestufe über DNA-Gehalte zu ermitteln, was das zentrale Ziel unserer Untersuchungen war. Jedoch bemerkt Durka (2002, S. 59; zit.n. Kubis et al. 1998) auch, dass der DNA-Gehalt bei Polyploiden oft etwas geringer ist, als es den jeweiligen Vielfachen der Ausgangsarten entsprechen würde, was er auf das Wegfallen von nicht kodierenden, repetitiven DNA-Sequenzen zurückführt. Nach Weiss-Schneeweiss (2013, S. 7; zit.n. Preuss and Pikaard, 2007; Vaughan et al., 1993; Lim et al., 2000a, b.; Weiss-Schneeweiss et al., 2007, 2012; Kotserba et al., 2012; Kolano et al., 2011; Ksiazczyk et al., 2011) zeigen polyploide Pflanzen üblicherweise ein umgeordnetes Genom mit rDNA-Wiederholung und/oder Genlocusstillegung- bzw. Verlust oder auch Rekombination von ganzen Interlocussegmenten und können daher sowohl einen geringeren als auch einen höheren DNA-Gehalt als die Ausgangsarten aufweisen.

Durka führt in seinem Text über Chromosomenzahlen, Ploidiestufen und den DNA-Gehalt (2002, S. 59f) auch einige intra- und interspezifische Korrelationen des DNA-Gehaltes mit phylogenetischen, biologischen, ökologischen oder phänologischen Parametern an. Einige dieser Korrelationen möchte ich hier beispielhaft unter Angabe des Sekundärzitats nennen:

- „Monokotyle haben im Mittel höhere DNA-Gehalte als Dikotyle.“ (Durka, 2002, S. 60; zit.n. Grime & Mowforth, 1982)
- „DNA-Gehalt ist negativ korreliert mit Chromosomen-Grundzahl.“ (Durka, 2002, S. 60; zit.n. Vinogradov, 2001)
- „Samengröße steigt mit DNA-Gehalt.“ (Durka, 2002, S. 60; zit.n. Chung et al. 1998)
- „Pflanzen mit kleinem DNA-Gehalt sind überall verbreitet, solche mit hohem DNA-Gehalt sind beschränkt auf Gebiete mit teilweise kühlen Vegetationsperioden.“ (Durka, 2002, S. 60; zit.n. Grime 1983)

2. Ziele der Diplomarbeit

Das Ziel der Untersuchungen war es durch die quantitative Analyse unterschiedlicher Parameter einerseits systematisch-populationsgenetische Fragestellungen und andererseits Fragestellungen technisch-methodischer Natur, zu beantworten. Zu diesem Zweck wurde die Variabilität der Genomgröße innerhalb der Ploidiestufen, der Unterarten, der Populationen und der einzelnen Individuen untersucht und interpretiert. Des Weiteren sollten die Auswirkungen unterschiedlicher technischer bzw. methodischer Parameter auf die Messergebnisse untersucht werden. Beispielsweise wurden technische Parameter wie die Durchlaufgeschwindigkeit, die Anzahl der gemessenen Kerne oder die Wahl des Messgeräts variiert und anschließend ausgewertet. Außerdem war die Untersuchung des Einflusses von methodischen Parametern, wie die Wahl des Standards bzw. die verstrichenen Stunden zwischen dem Sammeln und dem Weiterverarbeiten des Pflanzenmaterials, auf die Ergebnisse ein wichtiges Ziel der Diplomarbeit.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde im Rahmen eines Projektes zur quantitativen karyosystematischen Untersuchung von *Biscutella laevigata* unter der Leitung von Frau Prof. König, von ausgewählten Standorten zusammengetragen. Dabei wurde einerseits versucht ein möglichst großes Gebiet abzudecken und andererseits in bestimmten Teilgebieten nach Möglichkeit eine dichtere Bestandsaufnahme von Populationen, auch in Bezug auf ihre

Höhenlage, durchzuführen. Aus diesem Grund liegen daher in manchen Gebieten die untersuchten Populationen relativ dicht nebeneinander und in anderen Gebieten gibt es hingegen große Lücken. Meine Tätigkeit beschränkte sich hauptsächlich auf die darauf folgende Bearbeitung des Materials: die Messung der Genomgröße, sowie die Dateneingabe und Auswertung der Daten. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei den Sammlerinnen und Sammlern des Pflanzenmaterials herzlich bedanken, ohne deren Hilfe die angestrebten Untersuchungen nicht möglich gewesen wären. In der folgenden Tabelle sind die genauen Fundortsangaben inklusive Fundortsnummer, Subspezies, Ploidiestufe, Sammeldatum und SammlerIn angeführt.

Tab. 2. Übersichtstabelle der besammelten Fundorte unter Angabe der Fundortsnummer, der Fundortsbeschreibung, der Ploidiestufe, des Namens des Sammlers oder der Sammlerin und des Sammeldatums

Fundort, FO#	Sub-spezies von B. I.	Ploidie -stufe	Fundortsangaben	Sammlerin	gesammelt am
Mödling, 401	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Mödling, auf dem Frauenstein und auf dem Weg (bergab) zur Goldenen Stiege, ca. 320 m, Trockenrasen unter Schwarzföhren	C. König	01.05.2013
Pollauer Berge, 402	<i>c. f. gracilis</i>	2x	Tschechische Republik, Südmähren, Pollauer Berge N Mikulov (Nikolsburg), S Horni Vestonice, auf dem Devin (Maienberg), ca. 520 m, Trockenrasen auf steilen Kalkfelsen unter Schwarzföhren	C. König	09.05.2013
Kleinschwein barth, 403	<i>kerneri</i>	2x	NÖ: nördliches Weinviertel, Kleinschweinbarth, W Drasenhofen, beim Südmährerkreuz, 330 m, Trockenrasen, Kalkfelsen	C. König	09.05.2013
Weißenbach, 404	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Voralpen, W-Hang des Kühbergs bei Weißenbach a. d. Triesting, westexponierter Steilhang (Aufstieg ca. 100 m N Haus Hollergasse 30 (Arzthaus)), 420 m, bei Felsen im Schwarzföhrenwald	C. König	12.05.2013
Hermagor, 405	<i>laevigata</i>	4x	K: Hermagor, beim Eingang in die Garnitzenklamm	L. und F. Ehrendorfer	10.05.2013
Aggsbach, Bärenköpl, 406	<i>kerneri</i>	2x	NÖ: Dunkelsteiner Wald, Mitterbach, Bärenköpfl, ca. 1,9 km NE Aggsbach-Dorf, 400 m, lichter Rotföhrenwald über Serpentin-Felsrasen	F. Tod	19.05.2013
Aggsbach, Mitterbach, 407	<i>kerneri</i>	2x	NÖ: Dunkelsteiner Wald, Mitterbach, ca. 1,3 km SW Bärenköpfl (ca. 1,5 km O Aggsbach/Dorf, S des Mitterbach), 400 m, lichter Rotföhrenwald über Serpentin-Felsrasen	F. Tod	19.05.2013
Gösting, 408	<i>laevigata</i>	4x	St: Gösting, im NW von Graz, Felsen südlich der Mur, auf dem Jungfernsprung, 545 m, steile Kalkfelswände	C. König	26.05.2013
Redlschlag, 409	<i>austriaca</i>	2x	B: Redlschlag, NO Bernstein, Westhang des Ochsenriegels, 700 m, auf Serpentin, <i>P. sylvestris</i> -Wald	C. König	26.05.2013
Unterloiben, 410	<i>kerneri</i>	2x	NÖ: Wachau, Unterloiben, S-Hang des Loibenberg, ca. 500m NW von Unterloiben, 250 m, Trockenrasen über steilen Felsen unter Rotföhren	C. König	08.06.2013
Spratzern, 411	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: ca. 1 km S Spratzern (S St. Pölten), Erholungsgebiet Brunnenfeld, an der B 20, Franz Psick Gasse rechts, Trockenrasen, 290 m	C. König	08.06.2013
Gesäuse 1, 412	<i>austriaca</i>	2x	St: Ennstaler Alpen, Gesäuse, auf dem Weg vom Gstatterboden zur Haindlkarhütte „oben“, unter	J. Greimler	15.6.2013?

			Latschen, ca. 880 m		
Gesäuse 2, 413	<i>austriaca</i>	2x	St: Ennstaler Alpen, Gesäuse, auf dem Weg vom Gstatterboden zur Haindlkarhütte „unten“, bei der Brücke, ca. 690 m	J. Greimler	15.6.2013?
Schneearlpe, 414	<i>austriaca</i>	2x	St: Nördliche Kalkalpen, Schneearlpe bei Altenberg an der Rax, östlich vom Schneearlpenhaus, 1770 m	L. Ehrendorfer	01.07.2013
Großeck, Speiereck, 415	<i>laevigata</i>	4x	S: Lungau, Radstädter Tauern (Niedere Tauern) bei Mauterndorf, auf dem Weg vom Großeck zum Speiereck, ca. 2.150 m, Felsrasen	C. König	07.07.2013
Innerkrems, 416	<i>laevigata</i>	4x	K: Gurktaler Alpen, Nockberge östlich von Innerkrems, entlang der Nockalmstraße, ca. 5 km östlich der Mautstelle, vor der Pfandlhütte, ca. 1.700 m, Felsrasen	C. König	08.07.2013
Obertauern, Gnadenalm, 417	<i>laevigata</i>	4x	S: Pongau, Radstädter Tauern (Niedere Tauern) bei Obertauern, Abzweigung von der Pass-Straße zur Gnadenalm, ca. 7 km NW Obertauern, ca. 1.250 m, Felsabbruch	C. König	09.07.2013
Dachstein, 418	<i>laevigata</i>	4x	St: Dachsteingebirge, ca. 7 km NW Ramsau, im Bereich der Talstation der Dachstein-Südwand Seilbahn, ca. 1.700 m, Felsrasen	C. König	09.07.2013
Hochschwab, 419	<i>austriaca</i>	2x	St: Hochschwab-Gruppe, entlang des Weges von der Bürgeralm (N von Aflenz-Kurort) zur Voisthaler-Hütte, im Bereich Endriegel und Höchstein, ca. 1.700 m, Felsrasen	C. König	13.07.2013
Admonter Kalbling 1, 420	<i>laevigata</i>	4x	St: Ennstaler Alpen, Gesäuseberge: gegen Eisloch-Kar WSW Admonter Kalbling (ca. 400-600 m N Klinke-Hütte); E 14°30'49-51'', N 47°32'35-43'', 1550-1600 msm - "unten". Auflösungsbereich einer Almweide (z.T über Grauwacke von Karbonatschutt überrollt) und Übergang in steinigen Pionierrasen (Seslerion) über Kalk bzw. Dolomit	J. Greimler	17.07.2013
Admonter Kalbling 2, 421	<i>laevigata</i>	4x	St: Ennstaler Alpen, Gesäuseberge: gegen Eisloch-Kar WSW Admonter Kalbling (ca. 400-600 m N Klinke-Hütte); E 14°30'49-51'', N 47°32'35-43'', 1550-1600 msm - "oben". Auflösungsbereich einer Almweide (z.T über Grauwacke von Karbonatschutt überrollt) und Übergang in steinigen Pionierrasen (Seslerion) über Kalk bzw. Dolomit	J. Greimler	17.07.2013
Moggio, 422	<i>laevigata</i>	4x	Italien, Prov. Como, bei Moggio (NO Lecco am Comer See), nach 3km entlang der Pass-Straße (SP64) Richtung Taleggio, vor der ersten 360°-Kehre, Felsabbruch, ca. 1.000 m	C. König	22.07.2013
Cúlmine San Pietro, 423	<i>laevigata</i>	4x	Italien, Prov. Como, bei der Passhöhe des Cúlmine San Pietro (NO Lecco am Comer See), SP64 von Moggio nach Taleggio, Felsabbruch, 1.250 m	C. König	22.07.2013
Presolana 1, 424	<i>laevigata</i>	4x	Italien, Prov. Bergamo, Bergamasker Alpen, Castiòne della Presolana, Weg vom Passo della Presolana (Giogo della Presolana) auf den Pizzo della Presolana, S vom Pizzo Plagna, ca. 1.500 m, Felsrasen	C. König	24.07.2013
Presolana 2, 425	<i>laevigata</i>	4x	Italien, Prov. Bergamo, Bergamasker Alpen, Castiòne della Presolana, Weg vom Passo della Presolana (Giogo della Presolana) auf den Pizzo della Presolana, S vom Pizzo Plagna, ca. 1.600 m, Felsrasen	C. König	24.07.2013
Bernina-Pass, 426	<i>laevigata</i>	4x	Schweiz, Kanton Graubünden, Bernina-Pass (SO St. Moritz), entlang der Straße ca. 2 km süd-östlich der Passhöhe, ca. 2.300 m, Felsrasen	C. König	25.07.2013
Julier-Pass, 427	<i>laevigata</i>	4x	Schweiz, Kanton Graubünden, Julier-Pass (SW St. Moritz), im Bereich der Passhöhe, bei einem Stausee S der Straße, ca. 2.280 m, Felsrasen	C. König	25.07.2013
Schneeberg, Ochsenboden	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Schneeberg; entlang des Weges von der Bergstation der Schneebergbahn (bei	C. König	07.08.2013

428			Puchberg am Schneeberg) zum Klosterwappen, im Bereich des Ochsenbodens, ca. 1.900 m, Felsrasen		
Schneeberg, Kloster- wappen, 429	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Schneeberg; entlang des Weges von der Bergstation der Schneebergbahn (bei Puchberg am Schneeberg) zum Klosterwappen, ca. 400 m bis 50 m SO des Klosterwappen, ca. 1.950 m - 2.030 m, Felsrasen	C. König	07.08.2013
Schneeberg, Damböck- haus, 430	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Schneeberg; entlang des Weges von der Bergstation der Schneebergbahn (bei Puchberg am Schneeberg) zum Klosterwappen, ca. 50 m NW und N des Damböckhauses, ca. 1.830 m, Felsrasen	C. König	07.08.2013
Schneeberg, Waxriegel, 431	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Schneeberg; auf dem Waxriegel, ca. 200 m W der Bergstation der Schneebergbahn (bei Puchberg am Schneeberg), ca. 1.880 m, Felsrasen	C. König	07.08.2013
Feuerkogel, 432	<i>laevigata</i>	4x	OÖ: Nördliche Kalkalpen, Höllengebirge im Salzkammergut; entlang des Weges von der Bergstation der Feuerkogel-Seilbahn (bei Ebensee am Traunsee) zum Alberfeldkogel, nach ca. 800 m, auf einem W-exponierten Hang, ca. 1.620 m, offene Felsrasen	C. König	15.08.2013
Rax, Hohe Kanzel, 433	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Rax; entlang des Weges von der Bergstation der Rax-Seilbahn (bei Reichenau an der Rax) zum Preinerkreuz, im Bereich der Hohen Kanzel, ca. 1.680 m, zwischen Latschen	C. König	17.08.2013
Rax, Preinerwand, 434	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Rax; entlang des Weges von der Bergstation der Rax-Seilbahn (bei Reichenau an der Rax) zum Preinerkreuz, auf dem Kamm der Preinerwand ca. 800 m bis 400 m NO Preinerkreuz, ca. 1.720 m, offene Felsrasen	C. König	17.08.2013
Rax, Preinerkreuz, 435	<i>austriaca</i>	2x	NÖ: Nördliche Kalkalpen, Rax, bei Reichenau an der Rax; 50 m N des Preinerkreuz, ca. 1.750 m, offene Felsrasen mit Latschen	C. König	17.08.2013
Kleinschwein- barth 2, 436	<i>kerneri</i>	2x	NÖ: nördliches Weinviertel, Kleinschweinbarth, W Drasenhofen, beim Südmährerkreuz, 330 m, Trockenrasen, Kalkfelsen	F. Tod & R. Wernert	27.08.2013
			Abkürzungen: NÖ = Niederösterreich; OÖ = Oberösterreich; K = Kärnten; S = Salzburg; St = Steiermark		

Diese Fundorte sind zur besseren Übersicht in folgender Karte nochmals eingezzeichnet und gruppiert (Abb. 7).

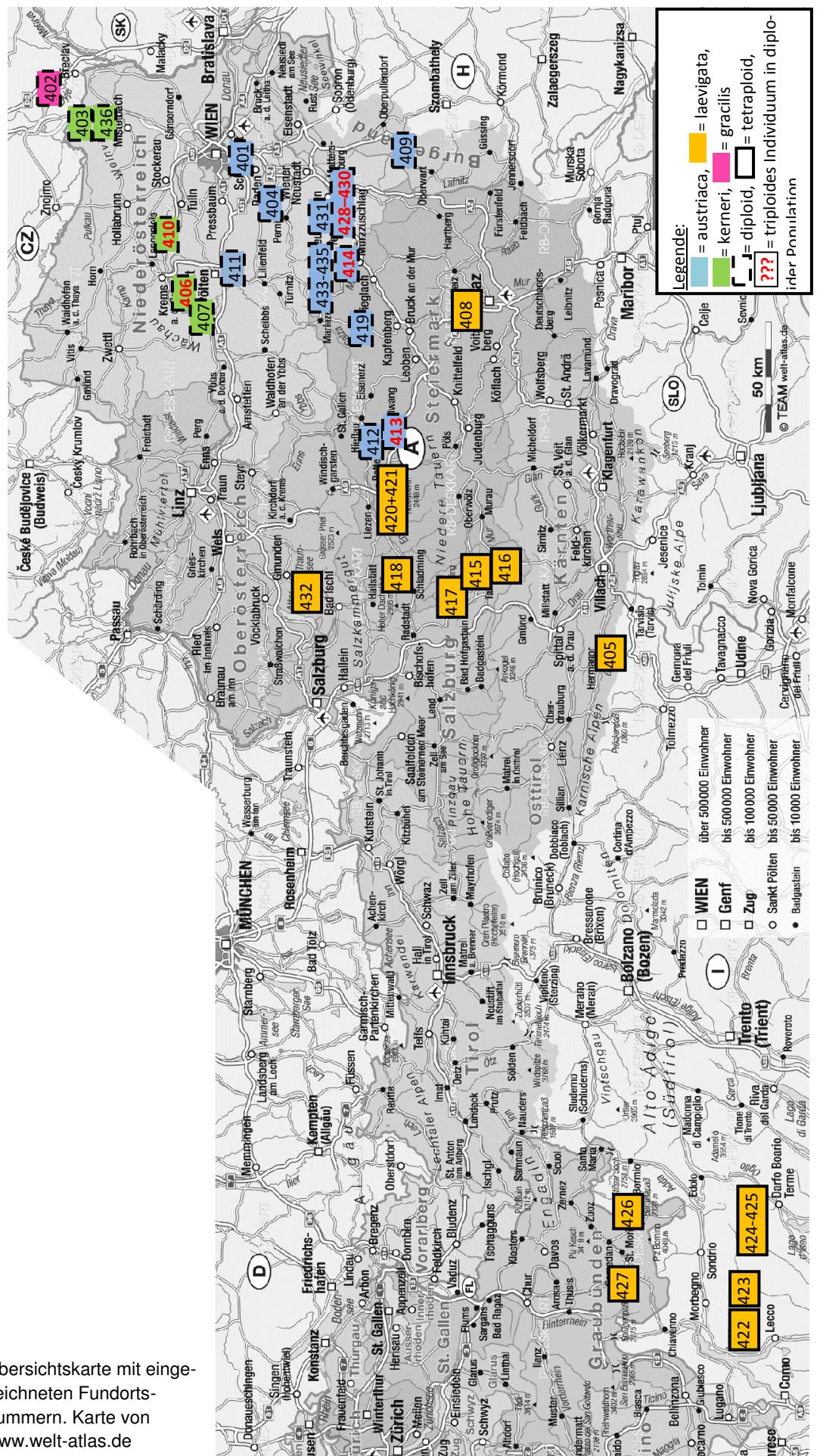


Abb. 7. Übersichtskarte mit eingezeichneten Fundortnummern. Karte von www.welt-atlas.de

Des Weiteren wurde auf Grund früherer Funde auch an folgendem Standort nach *B. laevigata* gesucht, was in diesem Fall jedoch erfolglos war.

Tab. 3. Bekannte Standorte von *B. laevigata* ohne erfolgreiche Besammlung

Vermeintlicher Standort	Sammelversuchsdatum (SammlerIn)
N: Heufurth, an der Straße B30 ca. 800m nach NW, Richtung Riegersburg; rechte Straßenseite, mäßig steiler, felsiger Hang	19. 05. 2013 (P. Glaser)

In Abhängigkeit von der Populationsgröße wurden Proben von etwa 15-25 Individuen von jeder Population entnommen. Beim der Besammlung der Populationen wurde auf die schonende Behandlung der Pflanzen geachtet und jeweils ein (Seiten)Spross eines Individuums knapp unterhalb der Rosette abgeschnitten. Bei etwa 3-5 Pflanzen jeder Population wurde versucht bei der Besammlung auch etwa 5-10 cm der Wurzel zu erwischen, um in weiterer Folge die Möglichkeit zu haben diese im Botanischen Garten der Universität Wien zu verpflanzen. Bei besonders kleinen Populationen wurde davon abgesehen ganze Pflanzen zu sammeln und es wurden nur einzelne Blättern pro Pflanze entnommen. Das gesammelte Pflanzenmaterial wurde danach feucht und gekühlt (mittels Kühlelementen bzw. im Kühlschrank) transportiert bzw. zwischengelagert und außerdem auch möglichst zeitnah weiterverarbeitet und vermessen. Es wurde auch Wert darauf gelegt, dass die gesammelten Pflanzen zumindest teilweise blühend bzw. auch fruchtend waren, um in Folge über gutes Material für etwaige weitere karyologische Untersuchungen zu verfügen. Nach der Verarbeitung des für die Genomgrößenmessungen notwendigen Blattmaterials wurden die Pflanzen möglichst vollständig herbarisiert bzw. nach Möglichkeit einige Individuen in den Versuchsgarten verpflanzt. Vor der Herbarisierung wurden auch noch Fixierungen von Blütenknospen für die späteren Chromosomenzählungen angefertigt. Methanol-Eisessig (= ME, 3:1) oder Äthanol-Eisessig (=AE, 3:1) wurde hierbei als Fixativ verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Chromosomenzählung

3.2.1.1 Untersuchungsmaterial

Da wiederholte Versuche mit bereits im Gelände bzw. bei der Präparation fixierten Blüten, Blütenknospen und Früchten keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachten, wurden Samen

von *Biscutella laevigata* angekeimt und die hierbei entstandenen Wurzelspitzen fixiert und für weitere Präparationen verwendet.

3.2.1.2 Vorbehandlung und Fixierung

Nach Vorbehandlung der Wurzelspitzen mit dem Spindelgift 0,002M 8-Hydroxychinolin (2 Stunden bei Zimmertemperatur, danach 2 Stunden im Kühlschrank) folgte die Fixierung mit Methanol-Eisessig (= ME, 3:1) oder Aethanol-Eisessig (=AE, 3:1) bei Zimmertemperatur über Nacht.

3.2.1.3 Feulgenfärbung und Chromosomenzählung

Danach wurde das Pflanzenmaterial in Aethanol (70 %) überführt und im Kühlschrank aufbewahr. Vor der Weiterverarbeitung wurde das Untersuchungsmaterial in Aqua dest. transferiert und darin 15 Minuten gespült. Im Anschluss musste das Pflanzenmaterial mit Hilfe von Pipetten und Filterpapier vom anhaftenden Wasser vorsichtig befreit werden, um danach die 30-minütige Hydrolyse in 5N HCl durchzuführen (bei Zimmertemperatur). Nach diesem Vorgang wurde das Material neuerlich mehrmals mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde es wie oben vom anhaftenden Wasser befreit und es folgte die Färbung mittels Schiffs Reagenz bei Zimmertemperatur im Dunkeln für etwa 30 bis 45 Minuten, bei gelegentlichem Schwenken.

Für die Präparation wurde das Pflanzenmaterial in Blockschälchen mit 45%iger Essigsäure überführt und für einige Minuten durchtränkt. Anschließend wurden saubere, fettfreie Objektträger mit kleinen Tropfen 45%iger Essigsäure versehen und die Wurzelspitzenmeristeme dorthin transferiert, möglichst gründlich zerzupft, mit einem Deckglas bedeckt, vorsichtig mittels Präpariernadel zerklopft und das Präparat unter mehreren Lagen Filterpapier gequetscht.

Die Untersuchung der Quetschpräparate erfolgte mit dem Mikroskop Zeiss Axio Imager A1 mit dazugehörigem PC. Bei der Untersuchung der Präparate mit dem Mikroskop wurde versucht geeignete mitotische bzw. meiotische Metaphaseplatten zu finden und die Chromosomen zu zählen.

3.2.2 Genomgrößenmessung

3.2.2.1 Präparation

Das Blattmaterial von *Biscutella laevigata* (Rosettenblätter oder Stängelblätter, ca. 0,05 g) wurde zusammen mit Blattmaterial (etwa 1/3 der Blattmenge von *B. laevigata*) des jeweils verwendeten Standards von *Solanum pseudocapsicum* oder *Glycine max* in kleinen Petrischalen aus Kunststoff vorbereitet. Vom jeweiligen Standard wurde auch eine reine Probe (also ohne *Biscutella laevigata*) als Kontrolle angefertigt. Dann wurde 0,55 mL Galbraith's Puffer (45 mM MgCl₂; 30 mM sodium citrate; 20 mM MOPS (4-morpholinepropane sulfonate); 0,1 % (w/v) Triton X-100 (Merck) (Dolezel und Bartos, 2005)) zugesetzt und das Blattmaterial wurde mit Rasierklingen (Gilette Super Silver) mechanisch zerkleinert und mit nochmals 0,55 mL Isolations-Puffer (pH ~1,5) vermengt. Anschließend wurde die Suspension aus Zellwänden, Protoplasma mit Organellen und Zellkernen mittels eines Nylon-Filters mit 30 Mikrometer Maschenweite gefiltert, um eine reine Zellkernsuspension zu erhalten und alle sonstigen Zellbestandteile, die das Zytophotometer möglicherweise blockieren könnten, zu beseitigen.

Im nächsten Schritt wurde die Probe mit 0,05 mL RNAse A (zum Abbau der RNA) versehen und zur Inkubation für 30 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Danach erfolgte die Aufteilung in zwei gleiche Teile, wobei eine Hälfte der Suspension gefärbt wurde und die andere Hälfte als Backup unbehandelt blieb und im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

Gefärbt wurden die Kerne in der Suspension mittels Propidiumiodid-Lösung (PI-Lösung, pH ~9,5). Propidiumiodid wirkt wie Ethidiumbromid als Nukleinsäureinterkalator. Der Farbstoff kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen (vgl. Temsch, 2003; Cires, Cuesta, Fernández, Nava, Vázquez & Fernández, 2011, S. 142 ff). Die mit der PI-Lösung versehene Suspension wurde anschließend für mindestens 30 Minuten im Kühlschrank gelagert um danach für das Messverfahren der Durchflusszytometrie verwendbar zu sein.

3.2.2.2 Messung Mittels Durchflusszytometrie (Flow cytometry)

Die Durchflusszytometrie wird im Allgemeinen zur Analyse von mikroskopischen Partikeln in Suspensionen verwendet - einerseits zur Diskriminierung der Zellviabilität und auch wie in diesem Fall zur Messung des DNA-Gehaltes von Zellen. Besonders die Feststellung des DNA-Gehalts und der Ploidiestufe sind wichtige Anwendungsgebiete der

Durchflusszytometrie, schreiben Hsiao-Ching und Tsai-Yun (2005, S. 53). Der DNA-Gehalt wird hierbei indirekt durch die Messung von emittiertem, fluoreszierendem Licht bestimmt. Zu diesem Zweck muss die DNA in den Zellen für das jeweilige Färbemittel (Propidiumiodid oder Ethidiumbromid) zugänglich gemacht werden. Dies geschieht durch Behandlung frischen Gewebes mit dem oben genannten Isolations-Puffer, wodurch die Entfernung der Zellwände durch hydrolytische Enzyme und in weiterer Folge auch des Protoplasmas zu einer Zellkernsuspension führt. Dieser Schritt ist notwendig da eine rigide Zellwand autofloreszierend ist und somit isolierte Pflanzenzellen für diese Zwecke unbrauchbar macht und auch das Zytoplasma führte in der Vergangenheit zu unbrauchbaren Messergebnissen. Die Zellkernsuspension wird durch den Hüllstrom der Trägerflüssigkeit fokussiert und tritt in den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette aus Glas oder Quarz ein, sodass die Zellen einzeln nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt werden. Das dabei entstehende Streulicht bzw. Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor ausgewertet. Da die Partikel mit hoher Geschwindigkeit und einzeln gemessen werden, ist es möglich große Populationen sehr rasch zu vermessen. Das Messen des relativen DNA-Gehalts wird durch die Verwendung von Propidiumiodid möglich, das fluoreszierend ist und sich zwischen die Basen der DNA einlagert (interkaliert). Die analysierte relative Floureszenzintensität wird üblicherweise in Form eines Histogramms dargestellt und repräsentiert somit den relativen DNA-Gehalt. Daher kann der absolute DNA-Gehalt einer unbekannten Probe, nur durch den Vergleich mit einem Standard, dessen Genomgröße (DNA-Gehalt) bereits bekannt ist, bestimmt werden. In diesem Fall wurden folgende Standards mit bekannten Genomgrößen verwendet:

Glycine max (1C = 1,134 pg) bzw. hauptsächlich *Solanum pseudocapsicum* (1C = 1,2946 pg)

Ein guter Standard sollte eine ähnliche Genomgröße und am besten auch eine ähnliche Chromatinstruktur wie die Probe haben. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Standards war notwendig um bei den späteren Auswertungen mit Sicherheit feststellen zu können, ob die Auswahl des Standards auch wirklich keinen Einfluss auf die Messungen hat. Daher haben wir die ersten fünf Individuen der ersten Populationen jeweils mit *Solanum pseudocapsicum* und auch *Glycine max* gemessen.

Da es im Fall der Messung der Genomgröße von triploiden Individuen, durch die ähnliche Genomgröße der Probe und den verwendeten Standards, zu Überlagerungen der Kurvengipfel und somit zu einer Verzerrung kommt, wurden triploide Individuen mit einem diploiden Individuum der jeweiligen Population gemessen. Als Bezugswert des DNA-1C-

Werts der Probe wurde der DNA-1C-Mittelwert der Population (der diploiden Individuen) herangezogen.

Für die Messung der Genomgröße wurden zwei unterschiedliche Geräte verwendet – einerseits das Modell CyFlow ML (Partec, ausgestattet mit einem grünen Laser) und andererseits das Modell CyFlow Space. Die beiden Geräte sind nicht ganz gleichwertig, das Modell CyFlow ML ist zwar älter, war aber teurer und misst mit einer höheren Genauigkeit als das neuere Modell CyFlow Space.

Zu Beginn der Messung jeder einzelnen Population wurde zuerst der jeweilige Standard (bzw. auch beide) isoliert gemessen um etwaige Messfehler bzw. Abweichungen an unterschiedlichen Tagen erkennen zu können. Danach wurde jede Probe (bestehend aus gefärbten Zellkernen aus dem Blattmaterial von *B. laevigata* und vom jeweiligen Standard) in mehreren Durchläufen (runs, meist waren es drei) und mit unterschiedlichen Kernanzahlen (counts) gemessen. Die Zahl bei „counts“ gibt an, wie viele Kerne vom Gerät vermessen wurden und diese Anzahl wurde bewusst zwischen 1000 und 5000 gemessenen Kernen variiert, um später feststellen zu können, ob das Ergebnis für die Genomgröße von der Anzahl der gemessenen Kerne beeinflusst wird. Trotzdem könnte das Messergebnis auch bei immer gleichen Einstellungen der Instrumente durch zufällige Messschwankungen bzw. Variationen in der Probenpräparation und –färbung beeinflusst werden, was eine möglichst gut standardisierte Arbeitsweise und genaue Protokollierung notwendig macht.

Das Ergebnis der Messungen wird dann von einem externen Computer für die Zytometersteuerung und das Datenmanagement (Fujitsu-Siemens) ausgegeben und ist zur weiteren Bearbeitung verfügbar. Anhand des Screenshots des folgenden Beispiels (Abb. 8) wird erklärt, welche Information vom Gerät zur Verfügung gestellt wird:

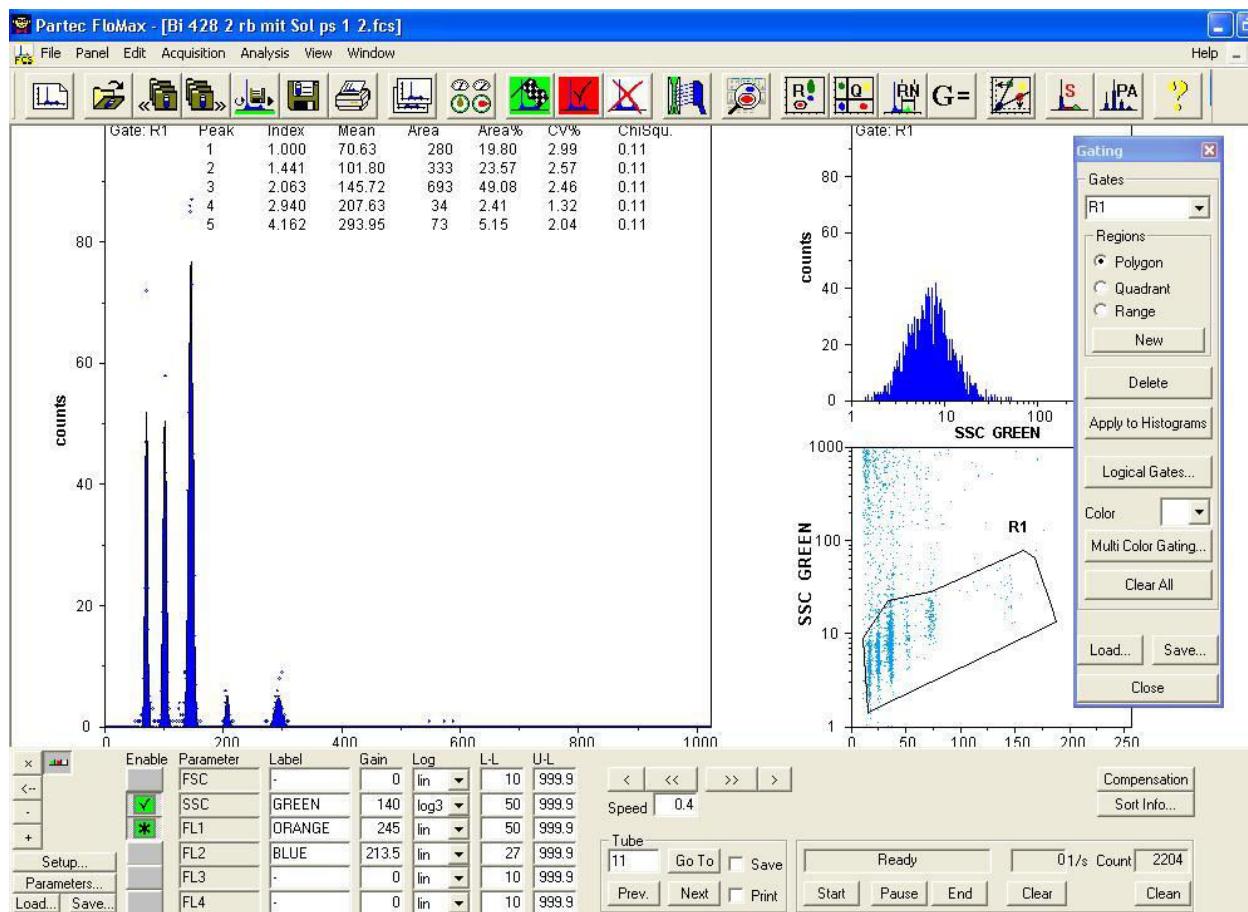


Abb. 8. Histogramm des relativen DNA-Gehalts (Probe *Biscutella laevigata*, Population Nr. 428, Individuum 2, Rosettenblatt, Standard: *Solanum pseudocapsicum*, zweiter Durchlauf)

Im unteren Bereich der Abbildung lassen sich die Einstellungen des jeweiligen Durchlaufs ablesen: Bei diesem Durchlauf wurden 2204 Kerne (Count) gemessen, bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0,4 (Speed) und einer FL1 Wellenlänge von 245.

Als Ergebnis sind im Histogramm für die gemessene Intensität der Fluoreszenz (mit einer Skala von 0 bis 1000) fünf Kurvengipfel (Peaks - generell können es natürlich auch mehr oder weniger sein) dargestellt und darüber in Form einer Tabelle deren statistischen Kenn-Daten dargestellt.

Es wird durch die Einstellungen im Bereich der FL1 Wellenlänge versucht den ersten Peak (G1-Peak) des Standards immer in Bereich von 100 zu platzieren. Von links nach rechts gelesen ist in Abb. 3 zuerst den G1-Peak von *B. laevigata* bei einem Mittelwert (aus der darüberstehenden Tabelle ablesbar) von 70,63, danach den G1-Peak des Standards (*Solanum pseudocapsicum*) bei 101,80, den G2-Peak von *B. laevigata* bei 145,72, den G2-Peak des Standards bei 207,63 und zuletzt den C8-Peak von *B. laevigata* bei 293,95. Die Anzahl der Kerne pro Peak ergibt die in der Tabelle angegebene Fläche (Area). Auch die Qualität der jeweiligen Probe kann durch Betrachtung des Histogramms beurteilt werden.

Einerseits sollten in dem Streudiagramm rechts unten, neben dem Histogramm, möglichst wenige Messwerte außerhalb der Bereiche des Untersuchungsmaterials (sogenannte Hintergrund-Messwerte) erkennbar sein. Andererseits sollten die Peaks möglichst symmetrisch sein und einen niedrigen Variationskoeffizienten ($CV\% = \text{Standardabweichung/Mittelwert} \cdot 100$) aufweisen, der ein Maß für die relative Streuung ist. Grundsätzlich wird ein CV unter 3 % als erstrebenswert betrachtet, jedoch werden bei schwierigen Bedingungen auch häufig CVs unter 5 % gerne akzeptiert. Beeinflusst wird die Probenqualität einerseits von der Qualität der Zellkernsuspension und andererseits natürlich auch von der Qualität der Färbung, da anhand dieser die Fluoreszenzintensität gemessen wird (Dolezel und Bartos, 2005, S. 103).

Exkurs:

An dieser Stelle möchte ich zum besseren Verständnis auf ein paar ständig vorkommende Begriffe und Abkürzungen eingehen. Greilhuber, Temsch und Loureiro (2007, S. 67) schreiben, dass zur besseren Präsentation und besseren Vergleichbarkeit von DNA-Gehalten in den letzten Jahren die Terminologie überarbeitet wurde. Pflanzen haben einen relativ komplizierten Lebenszyklus mit einem komplexen Generationswechsel und auch komplexem Kernphasenwechsel. Pflanzen zeigen wie bereits erwähnt auch Formen der Polyploidisierung und aus diesen Gründen wurde die strenge Unterscheidung der Begriffe „haplophatische bzw. diplophatische Genomgröße“ sowie die Verwendung der Begriffe C-Wert bzw. Cx-Wert gefördert um eine präzise Terminologie und eine unmissverständlichen Datenpräsentation zu gewährleisten (Greilhuber et al. 2007, S. 67). Der Begriff „(1)C-Wert oder 1C-Wert“ bezeichnet den DNA-Gehalt in einem unreplizierten, gametischen („haploiden“) Zellkern mit der Chromosomenanzahl n (=Grundzahl) (Greilhuber, Dolezel, Lysák & Bennett, 2005). Das bedeutet, dass der (1)C-Wert für eine Zelle unabhängig von der generativen Ploidiestufe (diploid = $2x$, tetraploid = $4x$ usw.) zu betrachten ist. x gibt hier die Anzahl der Chromosomensätze an.

Mit n wird hingegen das Stadium im Lebenszyklus eines Individuums bzw. einer Zelle bezeichnet und daher bedeutet $n = \text{haplophatisch}$ (im Fall von Samenpflanzen also Gameten) und $2n = \text{diplophatisch}$ (im Fall von Samenpflanzen: somatische Zellen).

Das erste mit G1 bezeichnete Stadium in der Interphase des Zellzyklus beschreibt die somatische Zelle vor der der Synthese-Phase (S-Phase, in welcher die Chromosomen repliziert werden), mit G2 wird das auf die S-Phase folgende Stadium mit doppelter Chromatidenzahl bezeichnet. Zusammengefasst ergeben sich folgende Bedeutungen und Anwendungen:

1C-Wert	„haploider“ unreplizierter DNA-Gehalt einer Zelle in Picogramm (pg)
G1, G2	beziehen sich auf die Phase im Zellzyklus (während der Interphase)
1Cx-Wert (Cx-Wert)	Basis-DNA-Gehalt einer Zelle in Picogramm, bezieht sich auf den niedrigsten, in der Verwandtschaftsgruppe gefundenen Wert
x	Grundzahl - kleinste gemeinsame, haploide Chromosomenzahl in einer Verwandtschaftsgruppe an; bzw. gibt Aufschluss über die Ploidiestufe der Zelle
n	bezieht sich auf das Stadium im Lebenszyklus (haploatisch, diploatisch)

Die für die Auswertung verwendeten Begriffe G1-Wert, G2-Wert und 8C-Wert haben daher folgende Bedeutung: Der G1-Wert beschreibt die 2C-Genomgröße einer somatischen Zelle, der G2-Wert hingegen die 4C-Genomgröße einer somatischen Zelle und somit das Stadium kurz vor der Mitose. Die Angabe 2n bedeutet hingegen nur, dass es sich um eine Zelle eines Individuums in der Diplophase handelt und mit der Angabe von 2x, 3x oder 4x wird die Ploidiestufe des jeweiligen Individuums angegeben.

Daher gilt bei *B. laevigata* ($x = 9$) für Diploide ($2n = 2x = 18$), für Tetraploide ($2n = 4x = 36$) und für Triploide ($2n = 3x = 27$).

Zur besseren Vergleichbarkeit der DNA-Gehalte wurde der 1Cx-Wert eingeführt. Bei den Diploiden gilt $1C = 1Cx$ und bei den Tetraploiden $1C = 2Cx$.

Der 8C-Wert und 16C-Wert kommt nur bei einzelnen, durch Endopolyploidie entstandenen Zellen vor.

Durka (2002, S. 59) schreibt, dass der C-Wert (C-value) als für jede Art konstant betrachtet wird. Weiters bemerkt Durka (2002, S. 59; zit.n. Ceccarelli et al. 1992, Greilhuber 1998): „Jedoch unterliegt der DNA-Gehalt auch innerhalb einer Art den gleichen Selektionskräften wie zwischen den Arten, so dass intraspezifische Variation zu erwarten ist bei weitverbreiteten Arten oder bei Arten, die verschiedenen Nischen besetzen oder Ökotypen ausbilden. Inwieweit wirklich intraspezifische Variation auftritt, ist umstritten, da immer wieder

auch methodische Ursachen für die beobachteten Phänomene verantwortlich gemacht werden.“

3.2.3 Dateneingabe mit Excel und SPSS

Die ermittelten Daten wurden im Anschluss in eine Excel-Datei eingegeben. In diese Datei wurden sowohl Daten aus den Messungen als auch Daten, die aus den Protokollaufzeichnungen stammten (zB Bemerkungen über die Qualität der Proben bzw. Dauer der Lagerung zwischen Sammlung und Messung uvm.) eingetragen, um später möglichst viele relevante Parameter bei der Auswertung zur Verfügung zu haben. Ein solcher Datensatz hatte folgende Struktur:

Tab. 4. Eingabestruktur eines Datensatzes, Teil 1

subsp	ssp nr	fundort	fo nr	ind	sam dat	mat	mat qual	präp dat	färb dat	mess dat
austriaca	2	Mödling	401	1	2013-05-01	sb	1	2013-05-02	2013-05-02	2013-05-02

- zu Beginn allgemeine Daten über die jeweilige Probe (Subspezies, Fundort, Individuum, Sammeldatum usw.)
- mat → Abkürzung für die Art des verwendeten Pflanzenmaterials
sb = Stängelblatt
rb = Rosettenblatt
bl = Laubblatt
fr = frucht
- mat qual → Bewertung der Qualität des Blattmaterials mit folgender Codierung:
1 = sehr gut
2 = gut
3 = mittelmäßig
4 = eher schlecht
- präp dat, färb dat, mess dat → Datum der Präparierung, der Färbung und der Messung des Pflanzenmaterials

Tab. 5. Eingabestruktur eines Datensatzes, Teil 2

cf	std nach sam	std nach präp	std nach färb	run	fl1	speed	count	pr qual	Bi G1 mw	Bi G1 area	Bi G1 cv
1	23	2	1	1	244	0.4	3000	3	77,36	242	3,77

- cf → Welches Cytoflow-Gerät wurde verwendet?
- Std nach dem sam/präp/färb → Vergangene Stunden zwischen Sammlung und Weiterverarbeitung des Materials – um später feststellen zu können ob beispielsweise langes Aufbewahren der unverarbeiteten oder auch bereits verarbeiteten (gefärbten) Probe, die Messergebnisse beeinflusst.
- run → Nummerierung des jeweiligen Probendurchlaufs
- fl1 → am CyFlow eingestellte Wellenlänge
- speed → am CyFlow eingestellte Durchlaufgeschwindigkeit
- count → Anzahl gemessener Kerne
- pr qual → Probenqualität, Bewertung nach grafischer Darstellung des Messergebnisses
 - 1 = sehr gut, kaum "Hintergrund"
 - 2 = gut, wenig "Hintergrund"
 - 3 = mittelmäßig, viel "Hintergrund"
 - 4 = eher schlecht, sehr viel "Hintergrund"
- Bi G1 mw → Mittelwert des G1 Peaks von *Biscutella laevigata*
- Bi G1 area → Anzahl der gemessene Kerne im G1 Peak von *B. l.*
- Bi G1 cv → Variationskoeffizient in % des G1-Peaks von *B. l.*

Tab. 6. Eingabestruktur eines Datensatzes, Teil 3

Bi G2 mw	Bi G2 area	Bi G2 cv	Bi 8C qual	Bi 8C mw	Bi 8C area	Bi 8C cv	Bi 16C qual	Stand	St G1 mw	St G1 area	St G1 cv	St G2 mw	St G2 area	St G2 cv
158,26	841	2,67	1	316,7	168	2,68	5	Sol ps	106	690	2,73	215,7	431	2,73

- Weitere Werte für die restlichen Peaks von *B. l.* (vgl. oben)
- Bi 8C qual → Bewertung der 8C Peak-Qualität
 - 1 = sehr gut, Peak mit Mittelwert berechnet
 - 3 = mittelmäßig, Mittelwert geschätzt
 - 4 = eher schlecht, Mittelwert schätzen nicht möglich
 - 5 = nicht vorhanden

- Bi 16C qual → Bewertung der 16C Peak-Qualität
 - 3 = deutlich sichtbar
 - 5 = nicht vorhanden
- Stand → Angabe des verwendeten Standard
- analog zu den Variablen für *B. l.* werden die Werte für den jeweiligen Standard eingegeben (St G1 mw, St G1 area, St G1 cv usw.)

Insgesamt wurden über 2000 solcher Datensätze eingetragen und anschließend zur Auswertung in das Statistikprogramm SPSS übertragen. In SPSS wurden im Nachhinein noch einige Variablen zur besseren Auswertbarkeit hinzugefügt. Beispielsweise die Variablen Ploidiestufe, Materialnummer, Qualität (Gesamtqualität um Ausreißer bei statistischer Auswertung kennzeichnen zu können), DNA-Gehalt des Standards (aus der Literatur). Daraus wird schließlich der absolute DNA-Gehalt für die Probe von *Biscutella laevigata* (in Picogramm) auf Grund des Verhältnisses der Mittelwerte der G1-Peaks von Probe und Standard berechnet:

Probe 1C-DNA-Gehalt = [(Bi G1 mw) / (Standard G1 mw)] * Standard 1C-DNA-Gehalt in pg

3.2.4 Statistische Methoden

Die Auswertung der gesammelten Daten erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 21.

Zur genaueren Beschreibung, Aufschlüsselung und Interpretation der Daten wurden vor allem Methoden der deskriptiven Statistik angewandt. Hier wurden unterschiedliche Tabellen und Diagramme (Boxplot-Diagramm, Histogramm) erstellt, um die Daten zusammenzufassen und zu veranschaulichen.

Zur Feststellung von Unterschieden zwischen Stichproben wurden der T-Test für unabhängige Stichproben und die Varianzanalyse (mit zusätzlichem Scheffé-Test für die Identifizierung von homogenen Untergruppen) verwendet. Vor der Verwendung dieser Tests wurde jeweils die Normalverteilung und auch die Varianzhomogenität der Daten überprüft. Die Überprüfung der Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest und die Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte mittels Levene-Test für Varianzgleichheit. Im Fall, dass die Normalverteilung der Daten nicht gegeben war, wurde zur Feststellung von signifikanten Unterschieden zwischen zwei Stichproben der Mann-

Whitney-Test verwendet. Im Fall von mehr als zwei Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt.

Auch bei der Testung von Korrelationen unterschiedlicher Parameter wurde im Vorfeld jeweils die Normalverteilung der Daten überprüft. Waren die Daten normalverteilt, so wurde der Korrelationstest nach Pearson-r herangezogen und andernfalls der Korrelationstest nach Spearman-Rho. Häufig wurden die zu vergleichenden Daten auch noch in Form eines Streudiagramms mit Regressionsgeraden dargestellt um eine mögliche Korrelation auch grafisch zu veranschaulichen.

4. Ergebnisse

4.1 Chromosomenzählung

Um die von Manton (1934, 1937), Schönfelder (1968b) und König (1994) angegebenen Chromosomenzahlen zu bestätigen, wurden wie oben beschrieben Fotos von Metaphaseplatten gemacht und die Chromosomen gezählt. Die nun folgenden Abbildungen zeigen ausschließlich mitotische Metaphaseplatten, da sie von Präparaten aus Wurzelspitzen gemacht wurden.

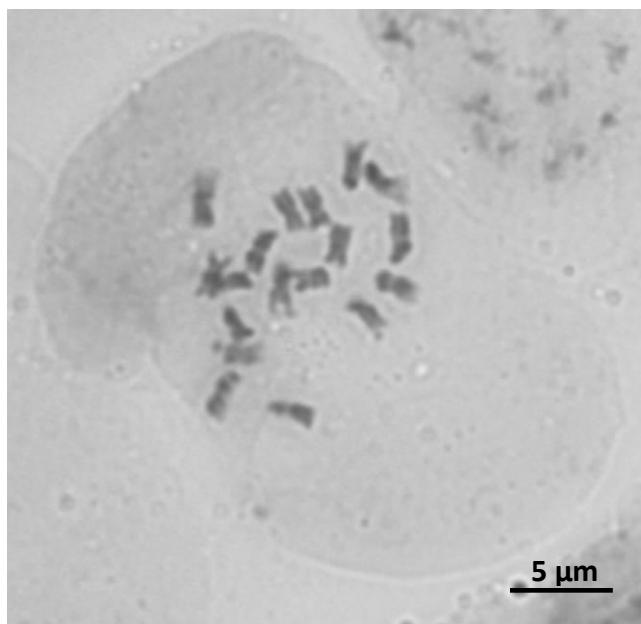


Abb. 9. Chromosomen von *B. laevigata* ssp. *kernerii* – Metaphase, $2n = 2x = 18$

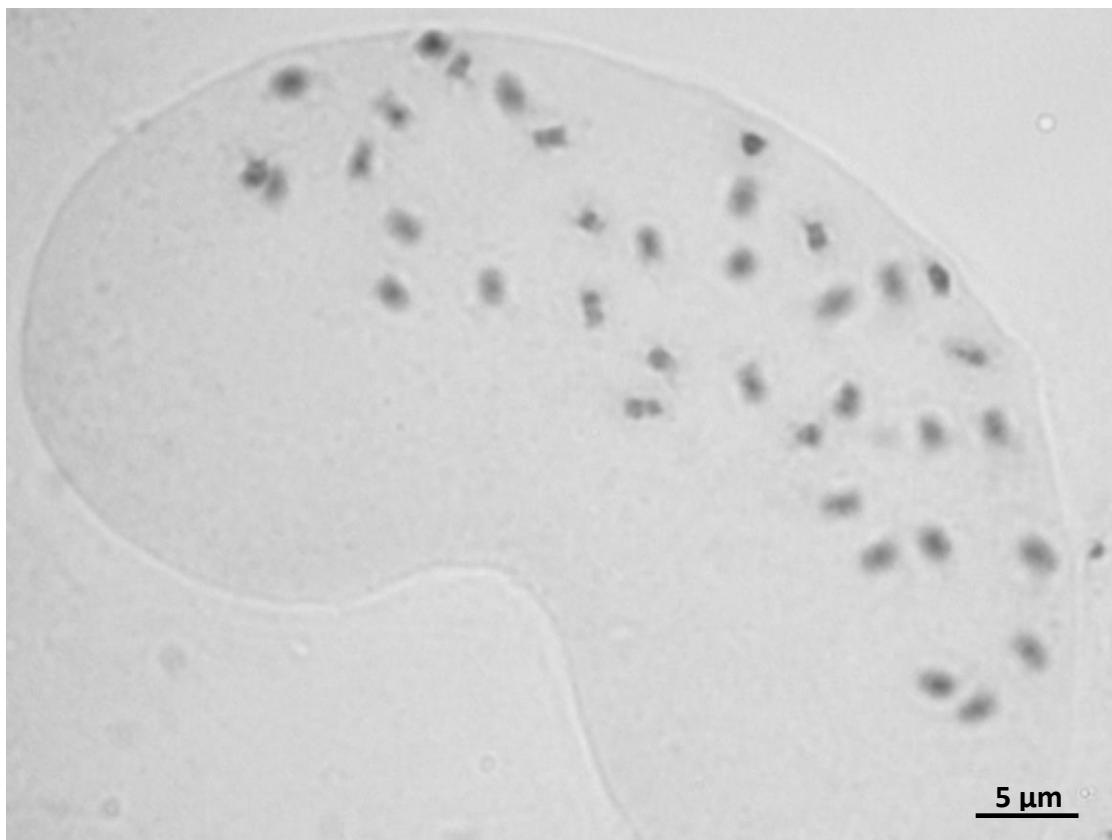


Abb. 10. Chromosomen von *B. laevigata* ssp. *laevigata* – Metaphase, $2n = 4x = 36$

Wie die Abbildungen 9 und 10 zeigen wurde für die diploiden Vertreter von *Biscutella laevigata* die Chromosomenzahl $2n = 2x = 18$ und für die tetraploiden Vertreter von *Biscutella laevigata* die Chromosomenzahl $2n = 4x = 36$ ermittelt. Für die triploiden Vertreter von *Biscutella laevigata* konnten leider keine Chromosomenzählungen durchgeführt werden.

4.2 Überblick über die Genomgrößen in den verschiedenen Subspezies von *Biscutella laevigata*

Zur Ermittlung der endgültigen Ergebnisse wurden Daten von 34 Populationen (also von unterschiedlichen Standorten) und von vier verschiedenen Subspezies in die Auswertung einbezogen. Zwei Populationen der ursprünglich 36 gesammelten und vermessenen Populationen – 405 (Hermagor) und 436 (Kleinschweinbarth 2) - wurden nachträglich auf Grund zu geringer Individuenzahlen bzw. teilweise schlechter Qualität des Pflanzenmaterials und einer damit möglicherweise verbundenen Verfälschung der Daten ausgeschlossen. Die geographische Verbreitung der besammelten Populationen erstreckt sich von südwestlichen Teilen der Zentralalpen in der Schweiz bzw. Norditalien bis zu den östlichsten

Alpenausläufern vor Wien und im Norden bis in das Weinviertel und sogar über die tschechische Grenze (siehe Abb. 7). In der Abbildung 7 lässt sich auch die grafische Verteilung der unterschiedlichen Subspezies gut erkennen. Die Fundorte der diploiden Unterarten befanden sich alle in Ostösterreich und jene der tetraploiden Unterarten nur westlich davon - mit Ausnahme der Population 408 im Raum Graz -, wobei die Trennlinie, im Bereich des Gesäuses verläuft.

Insgesamt wurden die Genomgrößen von 626 Individuen für die Berechnung der Ergebnisse herangezogen (einige statistische Ausreißer und fehlerhafte Datensätze, der gesamten vermessenen Individuen, wurden von den Berechnungen ausgeschlossen). Wie bereits erwähnt, wurden die einzelnen Individuen in mehreren Wiederholungen bzw. Durchläufen („runs“, meist 3, manchmal jedoch auch bis zu 6) vermessen. Dadurch ergibt sich die Anzahl von 1933 in die Ergebnisse einfließenden Datensätzen (nicht verwendbare Datensätze und Individuen wurden von vornherein ausgeschlossen).

In den 20 grundsätzlich diploiden Populationen betrug die Zahl der diploiden Individuen 358, wobei in diesen Populationen insgesamt 7 triploide Individuen gefunden wurden. Dabei wurden pro Population mindestens 6 und maximal 28 Individuen untersucht, durchschnittlich waren es 18 Individuen pro Population.

In den 14 tetraploiden Populationen wurden keine abweichenden Ploidiestufen gefunden, die Zahl der tetraploiden Individuen betrug 261 und es wurden hierbei mindestens 5 und maximal 26 Individuen pro Population untersucht, durchschnittlich waren es 19 Individuen pro Population.

Aufgeteilt nach Subspezies wurden 272 Individuen von *B. laevigata* ssp. *austriaca* ausgewertet, 261 Individuen der Subspezies ‚*laevigata*‘, 82 Individuen der Subspezies ‚*kernerii*‘ und 11 Individuen der Subspezies ‚*gracilis*‘.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse für den DNA-1C-Gehalt der verschiedenen Subspezies eingetragen.

Tab. 7. Genomgrößen der Unterarten. DNA 1C Mittelwerte in Picogramm, Standardabweichung der Mittelwerte, Variationskoeffizienten (CV) angegeben in Prozent, Anzahl der gemessenen Individuen (N, Individuen) aufgeteilt nach Unterarten und der Durchläufe (N, runs) aufgeteilt nach Unterarten

Subspezies	MW DNA 1C (pg)	Standard-abweichung	CV %	N (Individuen)	N (runs)
<i>austriaca</i>	0,926036	0,0154864	1,67	272	856
<i>kerneri</i>	0,937839	0,0138301	1,47	82	238
<i>c.f. gracilis</i>	0,918236	0,0106384	1,16	11	48
<i>laevigata</i>	1,868618	0,0276390	1,48	261	751

Wie man aus den oben stehenden Tabellen entnehmen kann, stimmt der DNA-1Cx-Gehalt (=1C/2) der tetraploiden Subspezies *B. l. ssp. laevigata* mit 0,934 pg am besten mit dem DNA-1Cx-Gehalt von *B. l. ssp. kerneri* mit 0,938 pg überein.

Erwähnenswert ist der besonders niedrige Variationskoeffizient (CV) der gesammelten Daten, welcher innerhalb der Unterarten nur zwischen 1,16 % und 1,67 % variiert und auch bei den triploiden Individuen insgesamt nur 1,43 % beträgt. Der Wert in der Spalte N nennt hier und auch im später folgenden Tabellen nicht die Anzahl der in die Werte eingehenden Individuen, sondern die Anzahl der in die Werte eingehenden Runs.

Insgesamt erhält man bei den Diploiden einen Mittelwert von 0,928 pg (N = 1142) und bei Tetraploiden einen Mittelwert von 0,934 pg (N = 751) für den DNA-1Cx-Gehalt.

Die folgenden Tabellen sollen die enge Verteilung der DNA-1C-Werte unter Beachtung der unterschiedlichen Fundorte, innerhalb der Subspezies, verdeutlichen.

Tab. 8 DNA 1C Mittelwerte in Picogramm von *B. laevigata* ssp. *austriaca* aufgeteilt nach Fundorten, Standardabweichung der Mittelwerte, Variationskoeffizienten in Prozent, Anzahl der gemessenen Individuen/Durchläufe (N, individuen/runs)

	N (Individuen / runs)	MW DNA1C (pg)	Standard- abweichung	CV %
401, Mödling	24 / 97	,941293	,0106119	1,13
404, Weißenbach	24 / 87	,926733	,0130595	1,41
409, Redlschlag	18 / 59	,942746	,0102812	1,09
411, Spratzern	28 / 90	,929199	,0154386	1,66
412, Gesäuse 1	6 / 18	,938783	,0088191	0,94
413, Gesäuse 2	20 / 56	,930524	,0130552	1,40
414, Schneetalpe	28 / 83	,921913	,0114211	1,24
419, Hochschwab	26 / 78	,922218	,0134909	1,46
428, Schneeberg O.	15 / 45	,918869	,0156863	1,71
429, Schneeberg K.	18 / 54	,915220	,0078444	0,86
430, Schneeberg D.	9 / 26	,909799	,0096355	1,06
431, Schneeberg W.	15 / 42	,910249	,0090554	0,99
433, Rax HK.	14 / 42	,921371	,0109192	1,19
434, Rax PW.	17 / 49	,923926	,0138365	1,50
435, Rax PK.	10 / 30	,914000	,0130643	1,43
Gesamt	272 / 856	,926036	,0154864	1,67

Innerhalb der Fundorte von *B. l. ssp. austriaca* gibt es beim DNA-1C-Gehalt eine Spannweite zwischen 0,910 pg und 0,943 pg und auch die Variationskoeffizienten bewegen sich wiederum im äußerst niedrigen Bereich von 0,86 % bis 1,71 %. Unterschiede zwischen den Werten verschiedener Fundorte sind möglicherweise auf eine Variation in der Messung bzw. Messungenauigkeiten zurückzuführen.

Tab. 9 DNA 1C Mittelwerte in Picogramm von *B. laevigata* ssp. *kernerii* aufgeteilt nach Fundorten, Standardabweichung der Mittelwerte, Variationskoeffizienten in Prozent, Anzahl der gemessenen Durchläufe (N, runs)

	N (runs)	MW DNA1C (pg)	Standard- abweichung	CV %
403, Kleinschweinbarth 1	28 / 84	,942240	,0140668	1,49
406, Aggsbach B.	7 / 33	,935125	,0085223	0,91
407, Aggsbach M.	24 / 51	,935693	,0171613	1,83
410, Unterloiben	23 / 70	,935400	,0116323	1,24
Gesamt	82 / 238	,937839	,0138301	1,47

Die Spannweite des DNA-1C-Gehalts zwischen den Fundorten von *B. l. ssp. kernerl* bewegt sich innerhalb von 0,935 pg und 0,942 pg. Und der Variationskoeffizient ist wiederum im äußerst niedrig, maximal 1,83 %.

Tab. 10 DNA 1C Mittelwerte in Picogramm von *B. l. ssp. laevigata* aufgeteilt nach Fundorten, Standardabweichung der Mittelwerte, Variationskoeffizienten in Prozent, Anzahl der gemessenen Durchläufe (N, runs)

	N (runs)	MW DNA1C (pg)	Standard- abweichung	CV %
408, Gösting	20 / 82	1,891189	,0198320	1,05
415, Großeck, Speiereck	24 / 68	1,882368	,0162932	0,87
416, Innenkrems	24 / 69	1,881145	,0197161	1,05
417, Obertauern	16 / 45	1,877941	,0269926	1,44
418, Dachstein	25 / 73	1,860817	,0189313	1,02
420, Admonter Kalbling 1	8 / 20	1,894503	,0155787	0,82
421, Admonter Kalbling 2	16 / 39	1,870502	,0292241	1,56
422, Moggio	19 / 37	1,863703	,0224454	1,20
423, Culmine San Pietro	21 / 58	1,865548	,0213353	1,14
424, Presolana 1	5 / 13	1,867710	,0096842	0,52
425, Presolana 2	8 / 24	1,864533	,0155241	0,83
426, Bernina-Pass	23 / 69	1,839533	,0193773	1,05
427, Julier-Pass	26 / 78	1,839357	,0348155	1,89
432, Feuerkogel	26 / 76	1,877403	,0126958	0,68
Gesamt	261 / 751	1,868618	,0276390	1,48

Die Spannweite des DNA-1C-Gehalts zwischen den Fundorten von *B. l. ssp. laevigata* (tetraploid) liegt zwischen 1,839 pg und 1,894 pg, mit einem mittleren CV von 1,11 %.

In den folgenden Abbildungen ist die jeweils sehr enge Verteilung der DNA-1C-Werte bei den diploiden und tetraploiden Populationen gesamt nochmals grafisch dargestellt.

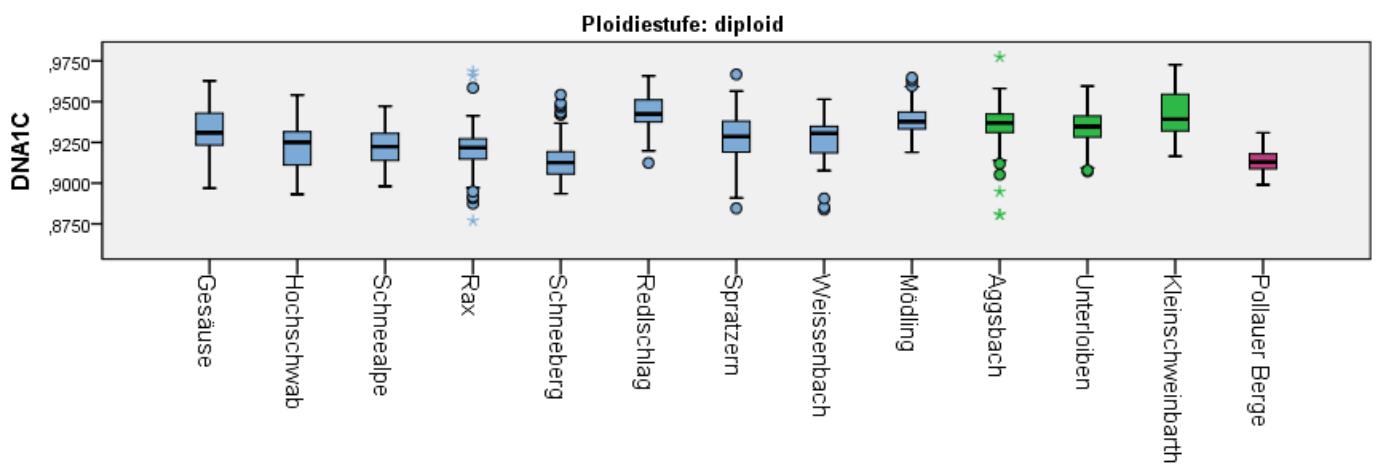


Abb. 11. Boxplotdiagramm der DNA 1C Mittelwerte geordnet nach geografischer Lage. *B. l. ssp. austiraca* (blau), *B. l. ssp. kerneri* (grün), *B. l. ssp. gracilis* (pink)

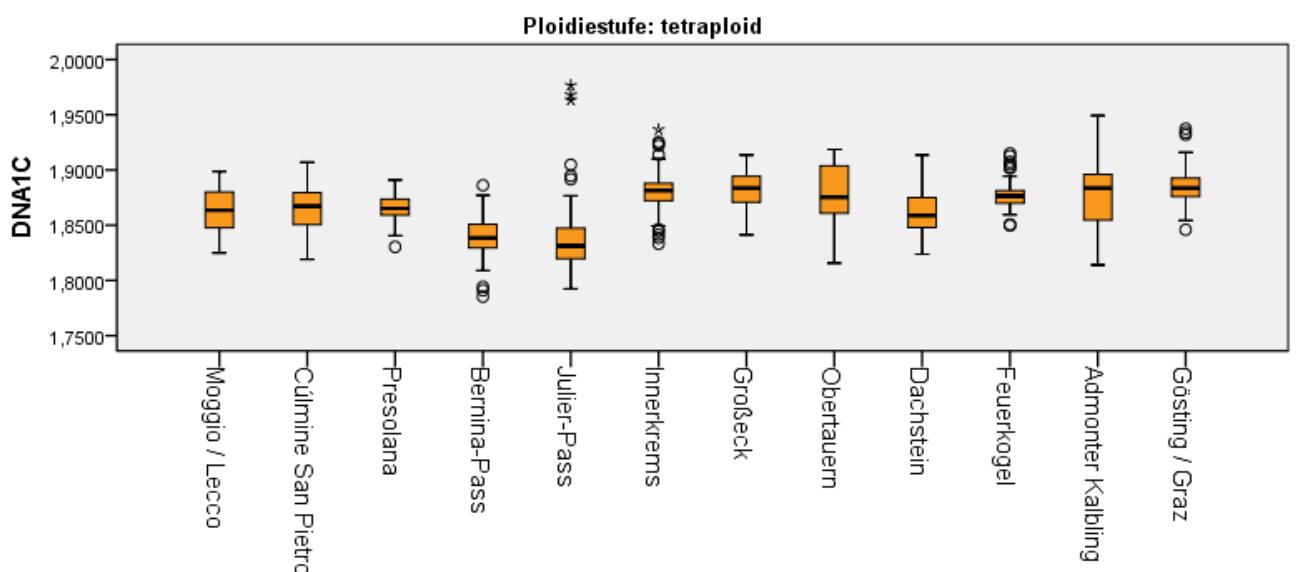


Abb. 12. Boxplotdiagramm der DNA 1C Mittelwerte geordnet nach geografischer Lage, *B. l. ssp. laevigata*

In beiden Abbildungen sind die Fundorte jeweils nach ihrer geografischen Lage von West nach Ost und Süd nach Nord geordnet. Weder bei den diploiden noch bei den tetraploiden Populationen lässt sich hinsichtlich der geografischen Lage ein Zusammenhang mit den DNA-1CMittelwerten erkennen.

4.3 Variation der Messwerte innerhalb der Individuen bzw. innerhalb der Populationen

Die folgenden Ergebnisse sollen die Schwankungen bzw. die Konstanz der DNA-1C-Mittelwerte von Individuen während mehrerer Durchläufe (runs) am selben Messgerät zeigen. In diesem Fall handelt es sich um Daten der Individuen von Population 401 (Mödling), welche in nachstehender Tabelle dargestellt sind:

Tab. 11. DNA 1C Mittelwerte von einzelnen Individuen für *B. laevigata* ssp. *austriaca* vom Fundort Mödling.
Angabe der Durchläufe (N, runs), Standardabweichung der MW, Variationskoeffizienten der MW in Prozent, minimaler und maximaler DNA 1C Wert pro Individuum

Individuum	N (runs)	DNA1C- Mittelwert	Standardabweich- ung	Variationskoeffizient (CV) %	Minimum	Maximum
1	3	,944179	,0006319	,06692587	,9436	,9448
2	2	,934907	,0008247	,08821198	,9343	,9355
3	3	,941049	,0031794	,33785701	,9378	,9442
5	3	,934207	,0058292	,62397306	,9287	,9403
6	2	,942473	,0017432	,18496021	,9412	,9437
7	3	,948518	,0034232	,36089985	,9456	,9523
8	3	,940425	,0032121	,34155834	,9368	,9429
9	6	,936774	,0039693	,42372013	,9323	,9425
10	6	,936495	,0035295	,37688402	,9302	,9397
11	6	,926892	,0026738	,28846942	,9250	,9320
12	3	,948067	,0009955	,10500313	,9473	,9492
13	3	,930618	,0162549	,74667801	,9190	,9492
14	3	,941197	,0019426	,20639675	,9390	,9425
15	3	,930434	,0053095	,57064768	,9262	,9364
16	3	,935247	,0025306	,27058093	,9332	,9381
17	3	,936302	,0028682	,30633279	,9334	,9391
18	3	,939348	,0050776	,54054514	,9351	,9450
19	3	,962232	,0028229	,29337123	,9591	,9647
20	3	,928564	,0008594	,09255151	,9278	,9295
21	3	,939161	,0044946	,47857609	,9352	,9441
22	3	,928366	,0008508	,09164489	,9278	,9293
23	3	,940709	,0040770	,43339651	,9377	,9453
24	3	,936682	,0008704	,09292375	,9358	,9376
25	3	,954881	,0052696	,55185934	,9492	,9596
Gesamt	79	,938434	,0090445	,96378648	,9190	,9647

Man kann anhand dieser Tabelle gut erkennen, dass die DNA-1C-Mittelwerte der unterschiedlichen Individuen weitgehend homogen sind. Auch die Schwankungen der DNA-1C-Werte zwischen den einzelnen Durchläufen des selben Individuums (der selben Probe) sind sehr gering, die jeweiligen Variationskoeffizienten liegen zwischen 0,06 % und 1,7 %

(fast immer unter 1 %). Beispielweise wurde beim Individuum 1 ein Mittelwert von 0,944 pg ermittelt, welcher sich aus drei Durchläufen mit Messwerten von 0,9436, 0,9442 und 0,9448, eine Standardabweichung von nur 0,00063 ergibt. Der Messunterschied ist hier also im Tausendstel-Picogramm-Bereich zu suchen. Bei Individuen mit höheren Standardabweichungen zwischen 0,004 – 0,009 bzw. 0,016 findet sich der Messunterschied im Hundertstel-Picogramm-Bereich.

Weiters möchte ich an dieser Stelle erwähnen, dass beim Vergleich aller 25 Individuen aus Mödling mittels Scheffé-Test für homogene Untergruppen festgestellt wurde, dass 23 Individuen als homogene Untergruppe zusammengefasst werden können und sich somit nicht signifikant voneinander unterscheiden. Nur jene beiden Individuen mit den höchsten DNA-1C-Mittelwerten unterscheiden sich signifikant von dieser Untergruppe.

4.4 Konstanz bzw. Variation des DNA-1C-Gehalts innerhalb einer Ploidiestufe bzw. innerhalb einer Subspezies

Wie in Kapitel „Überblick über die Genomgrößen in den verschiedenen Subspezies von *Biscutella laevigata*“ beschrieben, ist die Variation der Genomgrößen innerhalb der verschiedenen Subspezies und auch innerhalb der Ploidiestufen sehr gering. Es sollte jedoch untersucht werden, ob es eventuell doch gewisse Trends innerhalb dieser Gruppe gibt, die auf geographische Ursachen zurückzuführen sind.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob sich die DNA-1C-Gehalte innerhalb einer Ploidiestufe oder innerhalb einer Subspezies je nach der Seehöhe signifikant voneinander unterscheiden.

Bereits erste grafische Darstellungen der DNA-1C-Werte im Zusammenhang mit der Seehöhe, ließen sowohl bei den Diploiden als auch bei den Tetraploiden eine tendenzielle Verringerung der DNA-1C-Werte mit steigender Höhe vermuten, wobei diese Grafiken auf Grund zu geringer Aussagekraft hier nicht gezeigt werden. Daher wurde diese Vermutung durch weitere Darstellungen und Berechnungen überprüft. Bei den Diploiden bleibt zu erwähnen, dass nur Werte der Subspezies *B. l. ssp. austriaca* in diese Berechnung einflossen, da die beiden Subspezies *B. l. ssp. kerner* und *B. l. ssp. gracilis* nur auf Lagen unterhalb von 1200 m Seehöhe vorkommen. In subalpinen Lagen findet man nur *B. l. ssp. austriaca* und daher ist ein Vergleich der Höhenlagekategorien nur für diese Subspezies zulässig.

Nach der Aufteilung der DNA-1C-Werte in zwei Kategorien (<1200 m und ≥ 1200 m) bei den Diploiden (= *B. l. ssp. austriaca*) und in drei Kategorien (<900 m, 900 – 1800 m und ≥ 1800 m) bei den Tetraploiden (= *B. l. ssp. laevigata*) konnte der vormalige Verdacht mit folgenden Grafiken und Berechnungen untermauert werden. Folgende Diagramme stellen die DNA-1C-Mittelwerte aufgeteilt nach Kategorien grafisch dar (siehe Abb. 13 und 14).

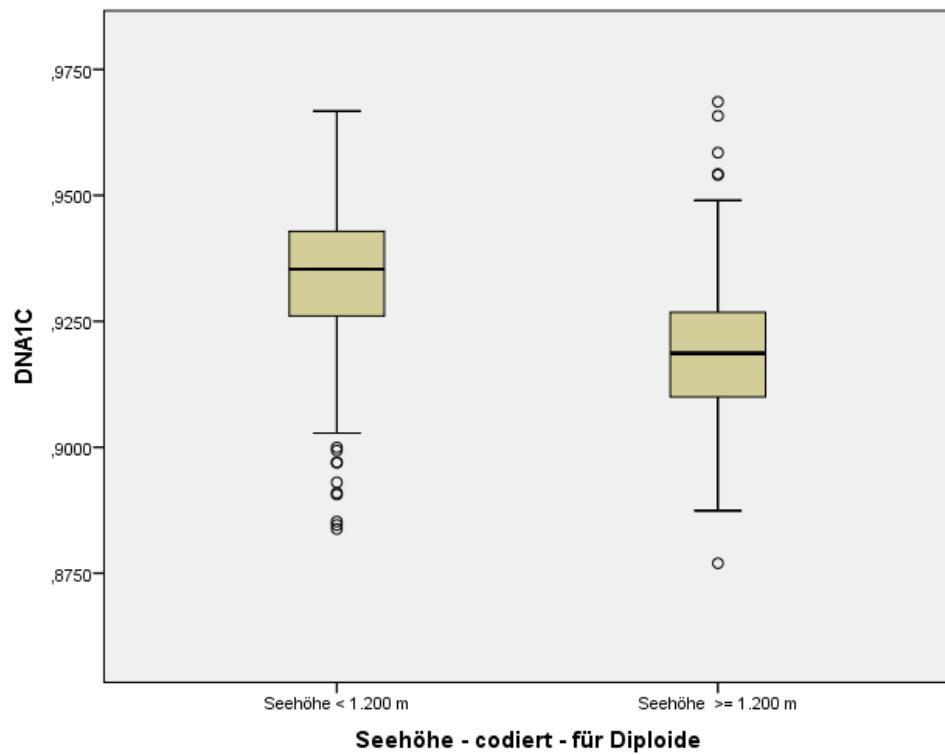


Abb.13. Boxplotdiagramm der DNA-1C-Mittelwerte von *B. l. ssp. austriaca* aufgeteilt in zwei Höhenlagekategorien.

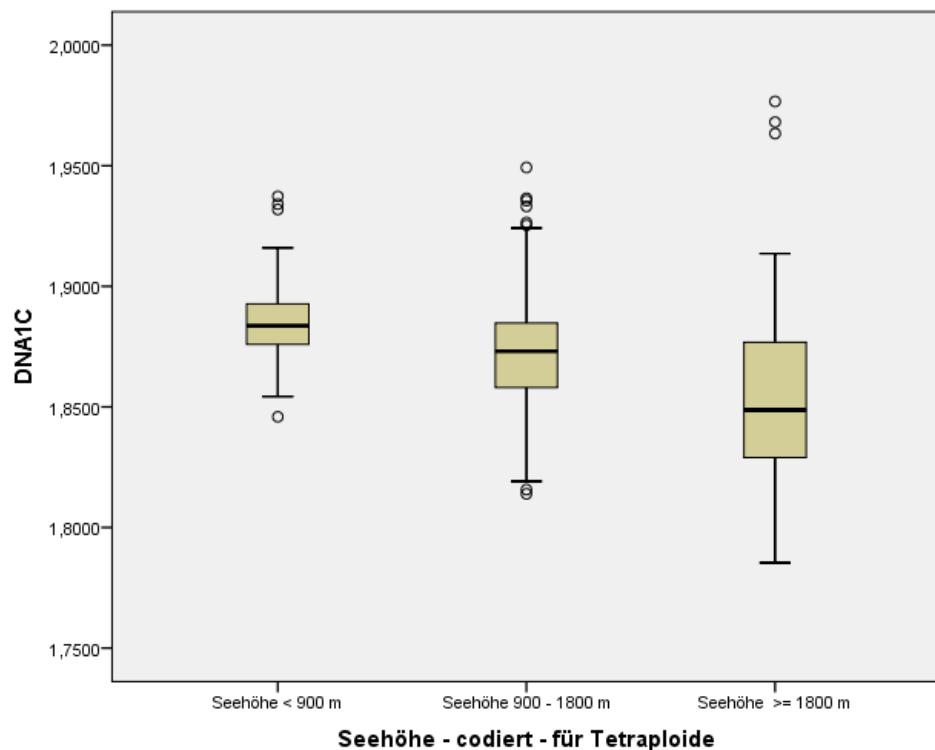


Abb. 14. Boxplotdiagramm der DNA-1C-Mittelwerte von *B. l. ssp. laevigata* aufgeteilt in drei Höhenlagekategorien.

In beiden Fällen lässt sich der Abfall der DNA-1C-Mittelwerte mit steigender Seehöhe gut erkennen. Da die Werte für die Seehöhen bei den Diploiden nicht normalverteilt sind wurde zum Vergleich der Daten der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test herangezogen (Tab. 12).

Tab. 12. Mann-Whitney-U-Test für die beiden Gruppen Seehöhe <1.200 m und Seehöhe >= 1.200 m von *B. l. ssp austriaca* Diploiden. Gruppenvariable: Seehöhe – codiert – für Diploide

	Seehöhe - codiert - für Diploide	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
DNA1C	Seehöhe < 1.200 m	407	564,84	229891,00
	Seehöhe >= 1.200 m	449	304,91	136905,00
	Gesamt	856		
DNA1C				
Mann-Whitney-U		35880,000		
Wilcoxon-W		136905,000		
Z		-15,361		
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,000		

Die mittleren Ränge (565 bei < 1200 und 305 bei >= 1200) der beiden Seehöhenkategorien unterscheiden sich deutlich und auch statistisch signifikant (Signifikanzwert < 0,001) voneinander. Abgesehen von den Mittleren Rängen unterscheiden sich natürlich auch die Mittelwerte für diese beiden Kategorien (Tab. 13):

Tab. 13. Mittelwerte der DNA-1C-Werte von *B. l. ssp. austriaca* aufgeteilt in zwei Höhenlagekategorien, Standardabweichung

	Seehöhe - codiert - für Diploide	N (runs)	Mittelwert-DNA-1C	Standardabweichung
DNA1C	Seehöhe < 1.200 m	407	,934124	,0141196
	Seehöhe >= 1.200 m	449	,918704	,0127953

Auch bei den Tetraploiden war keine durchgehende Normalverteilung der Daten gegeben und da es hier auch mehr als zwei Kategorien gibt, kam der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Wie auch schon bei den Diploiden wurde auch bei den Tetraploiden auf Grund der unterschiedlichen mittleren Ränge (519 bei < 900 m, 397 bei 900 – 1800 m und 259 bei >= 1800 m) ein signifikanter Unterschied (Signifikanzwert < 0,001) zwischen den jeweiligen Seehöhekatoren festgestellt (siehe Tab. 14).

Tab. 14. Mittlere Ränge der Tetraploiden als Ergebnis des Kruskal-Wallis-Test für die Gruppen Seehöhe < 900 m, Seehöhe 900 – 1800 m und Seehöhe >= 1800 m

	Seehöhe - codiert - für Tetraploide	N	Mittlerer Rang
DNA1C	Seehöhe < 900 m	64	519,10
	Seehöhe 900 - 1800 m	454	396,52
	Seehöhe >= 1800 m	215	259,38
	Gesamt	733	

Die Mittelwerte der Kategorien bei den Tetraploiden werden in folgender Tabelle angegeben (Tab. 15):

Tab. 15. Mittelwerte der DNA-1C-Werte der Tetraploiden aufgeteilt in drei Höhenlagekategorien, Standardabweichung

	N	Mittelwert-DNA-1C	Standardabweichung
Seehöhe < 900 m	64	1,885429	,0179645
Seehöhe 900 - 1800 m	454	1,871930	,0220204
Seehöhe >= 1800 m	215	1,853017	,0322327

Als zusätzlicher Vergleich wird folgende Grafik herangezogen, welche die DNA-1C-Mittelwerte nach Standorten (bei teilweiser regionaler Zusammenfassung von Populationen) für die Subspezies *Biscutella laevigata austriaca* darstellt. In dieser Abbildung (Abb. 15) sind zusätzlich jene vier Standorte mit Populationen über 1200 m Seehöhe mit Pfeilen markiert.

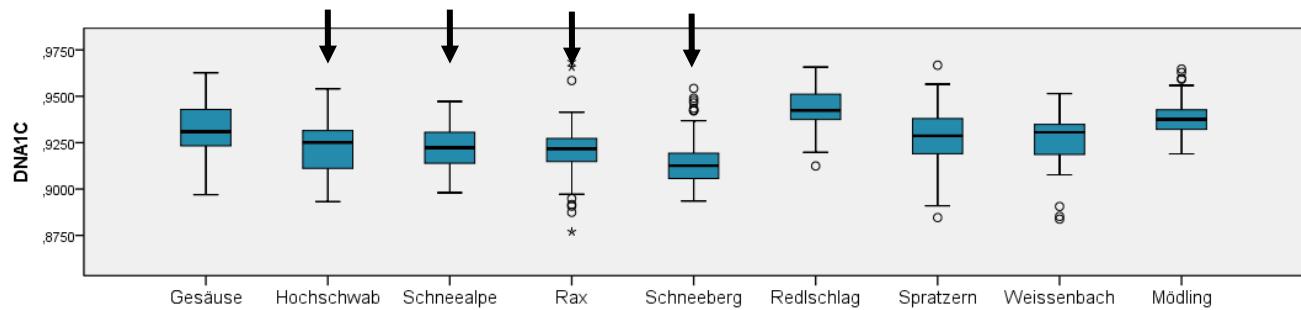


Abb. 15. Boxplotdiagramm der DNA-1C-Mittelwerte der Populationen von *B. laevigata* ssp. *austriaca*

Bei der Auswertung des Mann-Whitney-U-Tests ergab sich für die Populationen ober- und unterhalb einer Seehöhe von 1200 m ebenfalls ein signifikanter Unterschied der DNA-1C-Mittelwerte (Signifikanzwert < 0,001). Die mittleren Ränge waren 534 bei den Populationen unterhalb von 1200 m Seehöhe und 299 bei den Populationen oberhalb von 1200 m Seehöhe, was Mittelwerten von 0,933 pg (< 1200 m) und 0,919 pg (>= 1200 m) entspricht.

4.5 Triploide Individuen in den diploiden Populationen

Bereits während den Messungen der Genomgrößen mittels Durchflusszytometer fielen in einigen der 20 grundsätzlich diploiden Populationen einzelne triploide Pflanzen auf.

In nachfolgender Tabelle (Tab. 16) sind jene sieben Standorte mit jeweils genau einem triploiden Individuum angeführt. Der Mittelwerte wurde aus jeweils drei Durchläufen (runs) pro Individuum berechnet:

Tab. 16. Fundorte mit jeweils einem triploiden Individuum, Subspezies, Mittelwert in Picogramm und Variationskoeffizient in Prozent

Fundort & Fundortnummer	Subspezies	MW DNA1C (pg)	MW CV %
Aggsbach, Bärenköpfl (NÖ), 406	<i>kerneri</i>	1,420071	8,47
Unterloiben (NÖ), 410	<i>kerneri</i>	1,401425	5,79
Gesäuse 2, (Stmk), 413	<i>austriaca</i>	1,418214	7,09
Schneeaalpe (Stmk), 414	<i>austriaca</i>	1,421272	4,81
Schneeberg, Ochsenboden (NÖ), 428	<i>austriaca</i>	1,391432	5,91
Schneeberg, Klosterwappen (NÖ), 429	<i>austriaca</i>	1,386523	5,74
Schneeberg, Damböckhaus (NÖ), 430	<i>austriaca</i>	1,354006	3,89

Aus dieser Tabelle lässt sich erkennen, dass triploide Individuen sowohl in Populationen von *Biscutella laevigata* ssp. *kerneri* als auch in Populationen von *Biscutella laevigata* ssp.

austriaca gefunden wurden. Besonders auffällig ist auch die Tatsache, dass in jeder der am Schneeberg (NÖ) untersuchten Populationen eine triploide Pflanze gefunden wurde.

Der Mittelwert für den DNA-1C-Gehalt beträgt bei 7 triploiden Individuen 1,399 pg, wie aus der unten folgenden Tabelle ersichtlich ist.

Tab. 17. DNA-1C-Mittelwert aller triploiden Individuen

Triploide Individuen aus Subspezies	MW DNA 1C (pg)	Standardabweichung	CV %	N (Individuen)
<i>austriaca, kernerii</i>	1,401186	0,0201350	1,43	7

Folgende Abbildung zeigt in einem Boxplotdiagramm die Verteilung der DNA-1C-Mittelwerte der triploiden Individuen, aufgeteilt nach Subspezies.

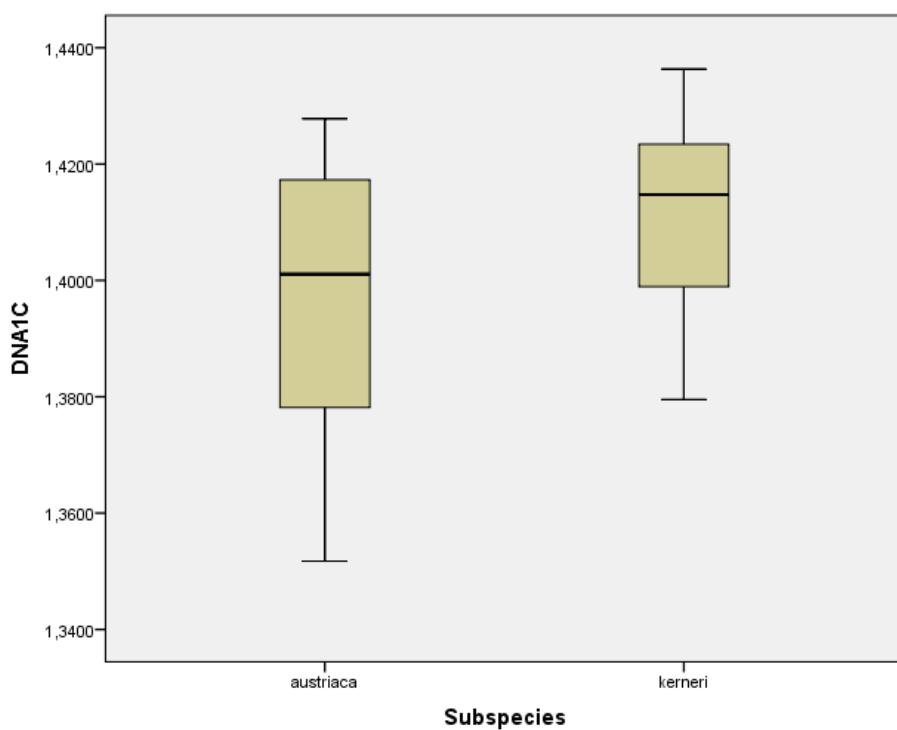


Abb. 16. Boxplotdiagramm der DNA-1C-Mittelwerte der triploiden Individuen, aufgeteilt nach Subspezies

Nach Überprüfung der Normalverteilung der Daten konnte durch einen T-Test nachgewiesen werden, dass sich die DNA-1C-Werte der Triploiden aufgeteilt nach Subspezies nicht signifikant (Signifikanzwert = 0,115) von einander unterscheiden. Nachstehende Tabelle zeigt die DNA-1C-Mittelwerte aufgeteilt nach Subspezies.

Tab. 18. DNA-1C-Mittelwerte aufgeteilt nach Subspezies

	Subspecies	N (Indiv.)	Mittelwert	Standardabweichung
DNA1C	<i>austriaca</i>	5	1,394795	,0183261
	<i>kerner</i>	2	1,410410	,0207702

4.6 Genomgröße im Zusammenhang mit „methodisch-technischen“ Aspekten

Im weiteren Verlauf der Datenauswertung wurde versucht die große Anzahl an unterschiedlichen Parametern, welche bereits bei den Messungen aufgenommen wurden und anschließend direkt oder in Form von Codes in die Datenbank übertragen wurden, zu nutzen. Nun galt es zu überprüfen ob diese Parameter, einerseits Antworten auf technische Fragestellungen bei der Messung von Genomgrößen mittels Durchflusszytometrie ermöglichen, oder andererseits Rückschlüsse über systematische oder populationsgenetische Aussagen zulassen.

4.7 Einfluss unterschiedlicher Standards auf die Messergebnisse

Einen technisch-methodischen Aspekt, welcher für die Genomgrößenmessung von großem Interesse ist, soll die Frage, ob bzw. wie stark das Messergebnis von der Wahl des Standards abhängig ist, beleuchten. Zu diesem Zweck wurde wie bereits erwähnt die ersten fünf Individuen der Populationen 401 – 411 (mit Ausnahme der Populationen 407, 408 und 410) sowohl mit *Solanum pseudocapsicum* als auch mit *Glycine max* als Standard vermessen.

Die Auswertung mittels T-Test, nach der Überprüfung auf Normalverteilung der relevanten Daten, ergab in den Populationen 401, 402, 404 und 406, dass bei den DNA-1C-Mittelwerten trotz geringer Unterschiede (zB 401 → *Glycine max* MW = 0,952 pg und *Solanum pseudocapsicum* MW = 0,939 pg), jedoch in Kombination mit sehr geringen Standardabweichungen (zB 401 → 0,005 bzw. 0,009) welche Variationskoeffizienten <1% entsprechen, ein Unterschied erkannt wurde. Beispielsweise wurde im Fall der Population 401 beim T-Test festgestellt, dass sich die mit unterschiedlichen Standards gemessenen DNA-1C-Mittelwerte signifikant (Signifikanzwert = 0,001) voneinander unterscheiden.

Bei den Populationen 409 und 411 konnte mittels T-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den DNA-1C-Mittelwerten festgestellt werden (Signifikanzwerte 0,887 bzw. 0,593).

Die nachfolgende Abbildung soll die Ergebnisse aller betrachteten Populationen nochmals grafisch darstellen und verdeutlichen (siehe Abb. 17).

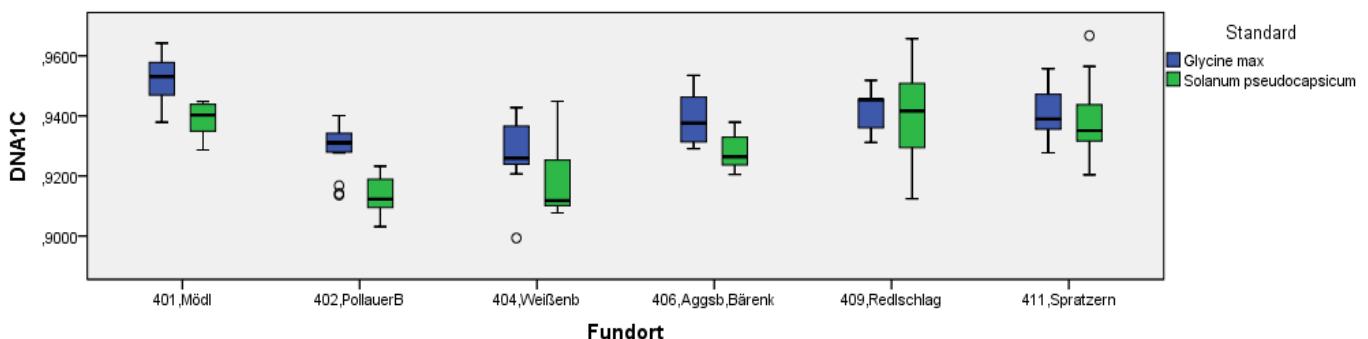


Abb. 17. Boxplotdiagramm. Direkter Vergleich der DNA-1C-Mittelwerte einer Population gemessen mit unterschiedlichen Standards, aufgeteilt nach Populationen

4.8 Einfluss unterschiedlicher Messgeräte auf die Messergebnisse

Im Zusammenhang mit der vorhergehenden steht auch die Fragestellung, welche den Einfluss der Verwendung unterschiedlicher Messgeräte (wie es natürlich auch meist bei Ergebnissen unterschiedlicher Labors der Fall ist) auf die DNA-1C-Mittelwerte überprüfen soll. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass es sich bei den mit den zwei verschiedenen Messgeräten gemessenen Werten, anders als oben, nur teilweise um Werte der gleichen Individuen, welche also tatsächlich mit beiden Geräten vermessen wurden, handelt. Es handelt es sich jedoch immer um Werte von Individuen einer einzigen Population, wodurch zumindest eine deutliche Beeinflussung durch die Messgeräte ersichtlich sein würde. Weiters wurden hier nur DNA-1C-Werte, welche mit *Solanum pseudocapsicum* gemessen wurden, verglichen um die Beeinflussung durch die Verwendung verschiedener Standards auszuschließen.

Die Überprüfung der Normalverteilung der Werte mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest ergab, dass die DNA-1C-Mittelwerte jener Populationen, welche mit unterschiedlichen Geräten vermessen wurden, überwiegend normalverteilt sind und somit die Verwendung eines T-Tests zulässig ist (unter Beachtung des Ergebnisses des Levene-Tests für Varianzgleichheit). Die Durchführung eines T-Tests zum Vergleich der DNA-1C-Mittelwerte bei der Verwendung unterschiedlicher Messgeräte war letztendlich bei 16 Populationen möglich und ergab in der überwiegenden Zahl der Fälle, dass die Verwendung unterschiedlicher Messgeräte keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-1C-Mittelwerte hat. Die Populationen 407, 430 und 433 sind auf Grund zu geringer Anzahl an Datensätzen bei einem der beiden Geräte ebenfalls nicht aussagekräftig, wodurch sich die Anzahl der verwertbaren Populationen auf 13 dezimiert. Unter diesen 13 Populationen, gab es drei

Populationen (408, 414 und 418) mit signifikantem Unterschied zwischen den DNA-1C-Mittelwerten der unterschiedlichen Geräte. Hierbei handelte es sich wiederum um sehr geringe Unterschiede im Hundertstel-Picogramm-Bereich, was folgendes Beispiel veranschaulichen soll.

Die gemessenen DNA-1C-Mittelwerte der Population 418 (Dachstein) ergaben beim Gerät CytoFlow ML einen Mittelwert von 1,862 pg [eine zusätzliche Dezimalstelle angeben!] ($N = 43$ (runs)) und beim Gerät CytoFlow Space einen Mittelwert von 1,873 pg ($N = 30$ (runs)) und unterscheiden sich bei einem Signifikanzwert von 0,001 signifikant voneinander. Dieses Ergebnis lässt sich grafisch folgendermaßen darstellen.

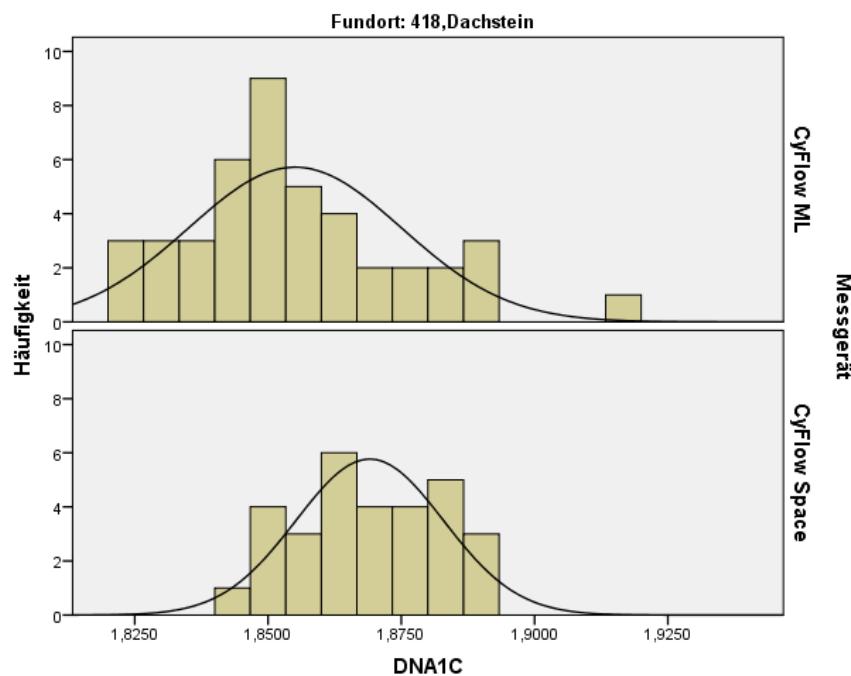


Abb. 18. Histogramm. Vergleich der DNA-1C-Mittelwerte für die tetraploiden Population von *B. l. ssp. laevigata* vom Dachstein (418) gemessen mit unterschiedlichen Geräten

Bei den übrigen 10 Populationen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit unterschiedlichen Geräten gemessenen DNA-1C-Werten festgestellt werden. In diesen Fällen zeigen die Grafiken ein ähnliches Bild wie es nachfolgend (Abb. 19) am Beispiel der Population 415 (Großeck) zu sehen ist. Bei der Population 415 wurde bei einem Signifikanzwert von 0,368 kein signifikanter Unterschied zwischen den Messgeräten festgestellt.

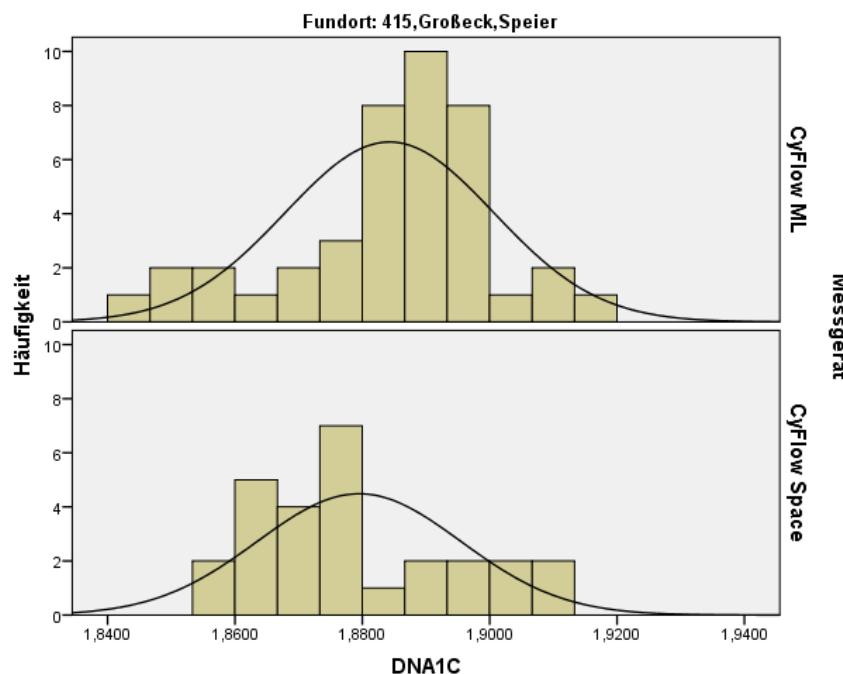


Abb. 19. Histogramm. Vergleich der DNA-1C-Mittelwerte für die tetraploide Population von *B. I. ssp. laevigata* von Großeck/Speiereck (415) gemessen mit unterschiedlichen Geräten

Werden die verschiedenen Populationen nach der Zugehörigkeit zu ihren Subspecies zusammengefasst, so ergibt die Durchführung eines T-Tests für unabhängige Stichproben getrennt nach Subspezies (davor wurde wiederum die Normalverteilung der Daten überprüft), dass die DNA-1C-Mittelwerte nicht signifikant durch der Verwendung eines bestimmten Messgeräts beeinflusst werden. Der T-Test ergab bei den drei Subspezies, die auf unterschiedlichen Geräten gemessen wurden, *Biscutella laevigata* ssp. *austriaca*, *Biscutella laevigata* ssp. *kerner* und *Biscutella laevigata* ssp. *laevigata* jeweils keinen signifikanten Unterschied der DNA-1C-Werte. Bei *Biscutella laevigata* ssp. *laevigata* ergab der T-Test ein besonders gut übereinstimmendes Bild der gesamten DNA-1C-Mittelwerte an den beiden Messgeräten: Cytoflow ML MW = 1,869 pg und Cytoflow Space MW = 1,868 pg, wobei bei einem Signifikanzwert von 0,481 kein Unterschied festgestellt werden konnte (vgl. Abb. 20).

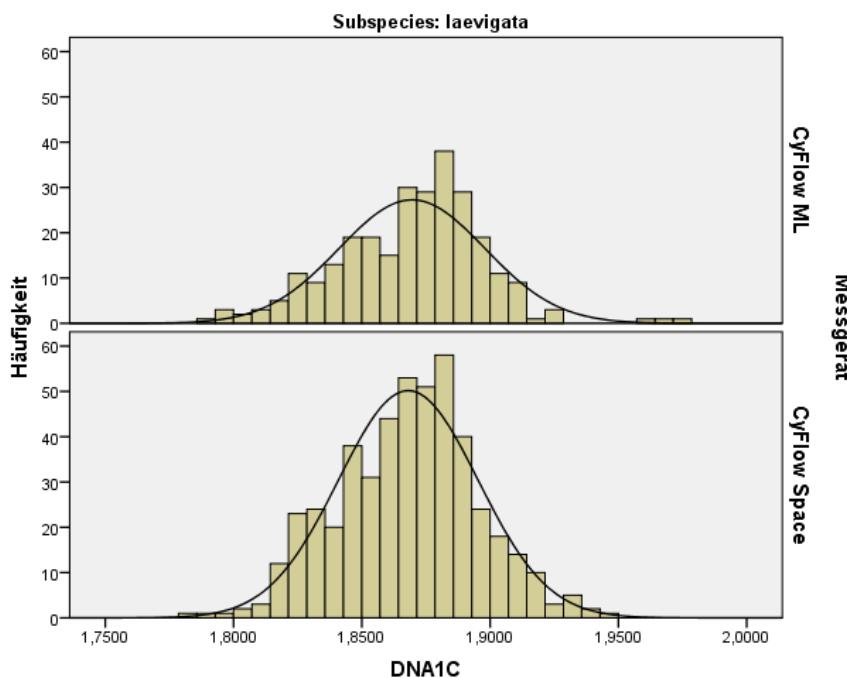


Abb. 20. Histogramm. Vergleich der DNA-1C-Mittelwerte der tetraploiden Populationen von *B. l. ssp. laevigata*, gemessen mit unterschiedlichen Geräten

4.9 Vergleich der Messgenauigkeit der beiden Geräte anhand der G1-Variationskoeffizienten

Um die Mess-Genauigkeit der beiden CyFlow Geräte zu vergleichen wurden die gesamten Variationskoeffizienten der G1-Peaks der Proben des jeweils verwendeten Geräts herangezogen. Nach der Prüfung auf Normalverteilung, welche jedoch negativ ausfiel, wurde der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Ergebnisse der beiden Geräte verwendet und brachte folgendes Ergebnis (Tab. 19):

Tab. 19. Mann-Whitney-U-Test. Gegenüberstellung der Mittleren Ränge der Variationskoeffizienten der G1-Peaks, für unterschiedliche Messgeräte

	Messgerät	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
G1 Absorb. CV	CyFlow ML	1101	884,90	974273,00
	CyFlow Space	823		
	Gesamt	1924		
G1 Absorb. CV				
Mann-Whitney-U		367622,000		
Wilcoxon-W		974273,000		
Z		-7,087		
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,000		

Es ist ein deutlicher Unterschied der Mittleren Ränge bei den beiden Geräten zu beobachten, wodurch auch ein signifikanter Unterschied (Signifikanzwert $< 0,001$) zwischen den Variationskoeffizienten des Cytoflow ML und des Cytoflow Space festgestellt wurde. Dieses Ergebnis bedeutet also, dass die Variationskoeffizienten der G1-Peaks der Probe beim Gerät Cytoflow ML im Schnitt niedriger sind als beim Gerät Cytoflow Space, was auch in folgender Grafik zu erkennen ist (Abb. 21).

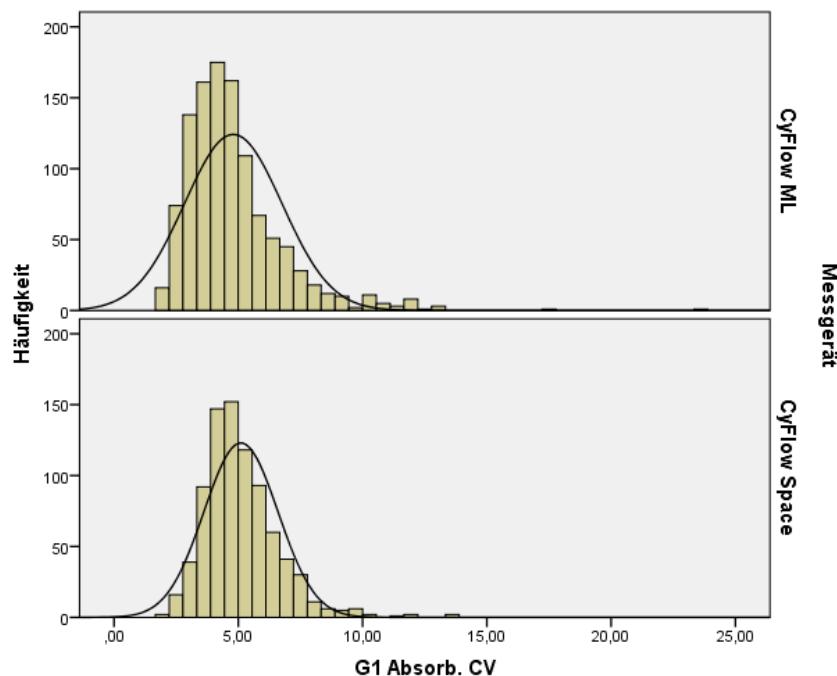


Abb. 21. Histogramm. Gegenüberstellung der Variationskoeffizienten aller G1-Peaks aufgeteilt nach unterschiedlichen Messgeräten (für alle Subspezies)

4.10 Einfluss der Durchlaufgeschwindigkeit (speed) auf die Messergebnisse

Ziel der folgenden grafischen Darstellungen und Tests ist es zu untersuchen, ob die verwendete Durchlaufgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Die im Streudiagramm entsprechend der Durchlaufgeschwindigkeit eingetragenen (zuvor nach Ploidiestufen aufgeteilten) DNA-1C-Mittelwerte zeigen keinen erkennbaren Zusammenhang. Die entsprechenden Regressionsgeraden haben eine Steigung von nahezu Null. Bei den Tetraploidien ergab sich beispielsweise folgendes Bild (Abb. 22):

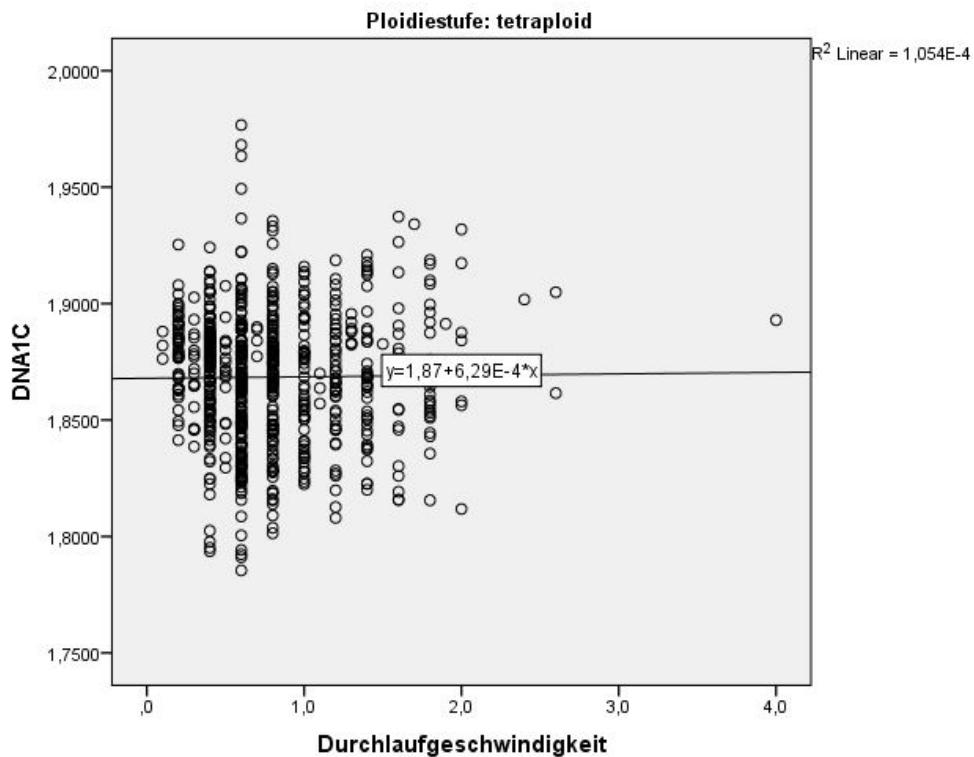


Abb. 22. Streudiagramm mit Regressionsgerade. Darstellung der Verteilung der DNA-1C-Mittelwerte bei der tetraploiden *B. l. ssp. laevigata* bei unterschiedlichen Durchlaufgeschwindigkeiten.

Zur Feststellung ob ein Zusammenhang zwischen den Variationskoeffizienten (CV) des G1- Peaks der Probe und der Durchlaufgeschwindigkeit besteht, wurde nach dem Test auf Normalverteilung beider Parameter, welcher negativ verlief, einerseits ein Streudiagramm mit Regressionsgeraden dargestellt und andererseits ein Test auf Korrelation nach Spearman-Rho durchgeführt. Der Test nach Spearman-Rho ergab, dass es einen signifikanten Zusammenhang (Signifikanzwert < 0,001) zwischen der Durchlaufgeschwindigkeit und dem Variationskoeffizienten gibt. Hierbei handelt es sich um einen positiven Zusammenhang mit mittlerer Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = 0,643$), was bedeutet, dass es bei einer Erhöhung der Durchlaufgeschwindigkeit auch zu höheren Variationskoeffizienten kommt (vgl. Tab. 20).

Tab. 20. Spearman-Rho-Korrelation. Ausgabettabelle nach Durchführung des Tests auf Korrelation nach Spearman-Rho

			G1 Absorb. CV	Durchlaufgeschwindigkeit
Spearman-Rho	G1 Absorb. CV	Korrelationskoeffizient	1,000	,643**
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	1926	1886
	Durchlaufgeschwindigkeit	Korrelationskoeffizient	,643**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	1886	1914

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Die Darstellung als Streudiagramm soll den Zusammenhang des Variationskoeffizienten des G1-Peaks mit der Durchlaufgeschwindigkeit grafisch veranschaulichen und liefert folgendes Ergebnis, wobei der lineare Zusammenhang der Werte mit folgender Geradengleichung beschrieben wird: G1 Probe CV = 3,23 + 2,05 * Durchlaufgeschwindigkeit (vgl. Abb. 23).

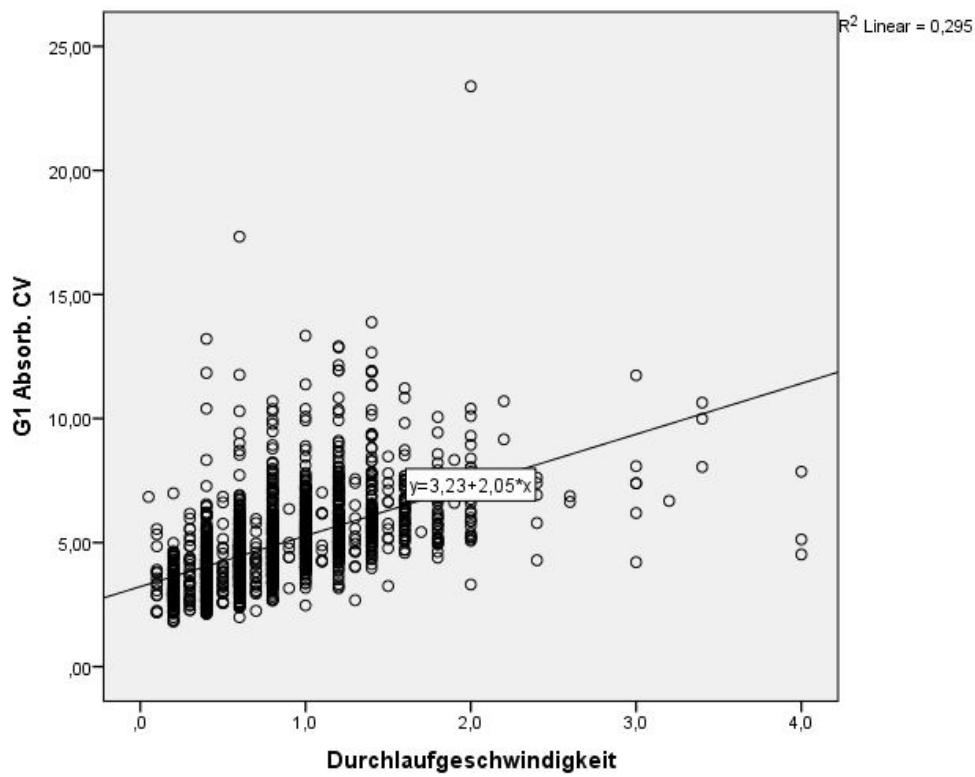


Abb. 23. Streudiagramm mit Regressionsgerade. Darstellung der Verteilung der Variationskoeffizienten aller G1-Peaks bei unterschiedlichen Durchlaufgeschwindigkeiten (für alle Subspezies).

4.11 Einfluss der Anzahl der gemessenen Kerne auf die Messergebnisse

Mit den folgenden grafischen Darstellungen und Tests soll untersucht werden, ob die Anzahl der gemessenen Kerne (pro run) einen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Dazu wurden die Messdaten aller Fundorte herangezogen. Nach der Überprüfung der Normalverteilung der zu vergleichenden Daten, welche negativ war, wurde beim Test auf Korrelation nach Spearman-Rho, aufgeteilt nach den Subspezies folgendes Ergebnis festgestellt: Zwischen der Anzahl der gemessenen Kerne und dem Variationskoeffizienten für den G1-Peak der Probe war bei keiner Subspezies ein positiver Zusammenhang feststellbar. Bei der Subspezies *B. l. ssp. austriaca* ergab sich für die Verteilung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks bei unterschiedlicher Anzahl von gemessenen Kernen folgendes Streudiagramm (siehe Abb. 24).

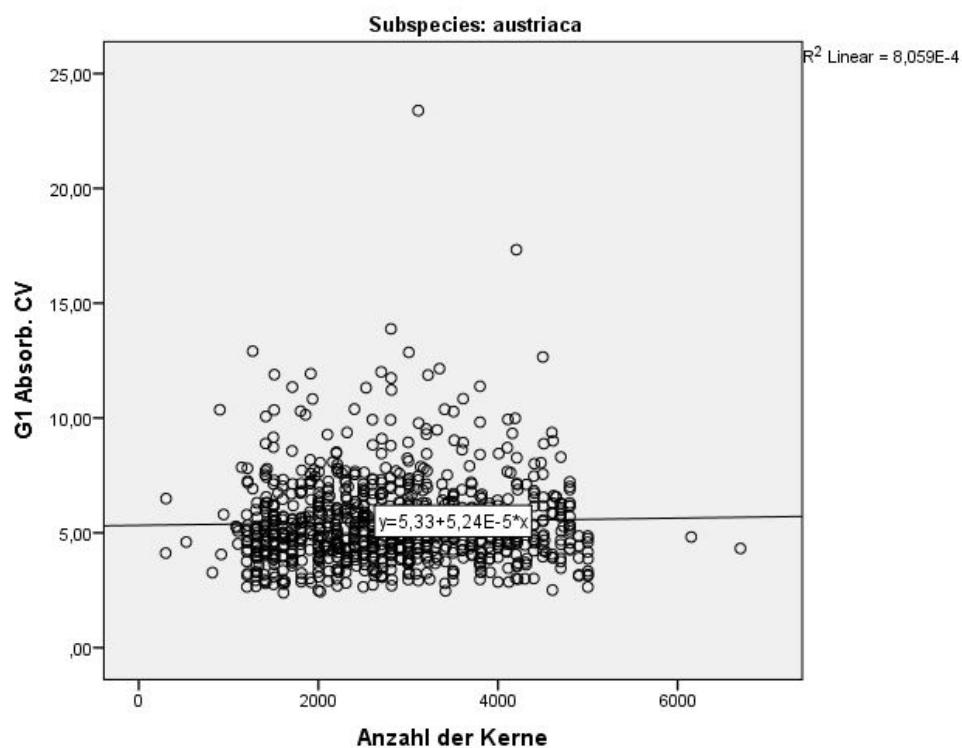


Abb. 24. Streudiagramm mit Regressionsgerade. Darstellung der Verteilung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks von *B. l. ssp. austriaca* bei unterschiedlicher Anzahl an gemessenen Kernen.

Der Test auf Korrelation nach Spearman-Rho ergab hierfür keine signifikante Korrelation (Signifikanzwert = 0,294) zwischen der Anzahl der Kerne und dem Variationskoeffizienten des G1-Peaks und die eingezeichnete Regressiongerade hat eine Steigung von nahezu Null.

4.12 Zusammenhang der Variationskoeffizienten (CV) von Probe und Standard

Der Zusammenhang des Variationskoeffizienten des G1-Peaks der Probe mit dem Variationskoeffizienten des G1-Peaks des Standards wurde einerseits durch Streudiagramme grafisch dargestellt und andererseits, nach Überprüfung der Normalverteilung der CV-Werte, welche jedoch negativ war, auch durch die Verwendung des Spearman-Rho-Tests ausgewertet. Die Auswertung erfolgte aufgetrennt nach Subspezies und zeigt für die beiden Subspezies *B. l. ssp. austriaca* und *B. l. ssp. laevigata* folgendes Bild (Abb. 25 und 26).

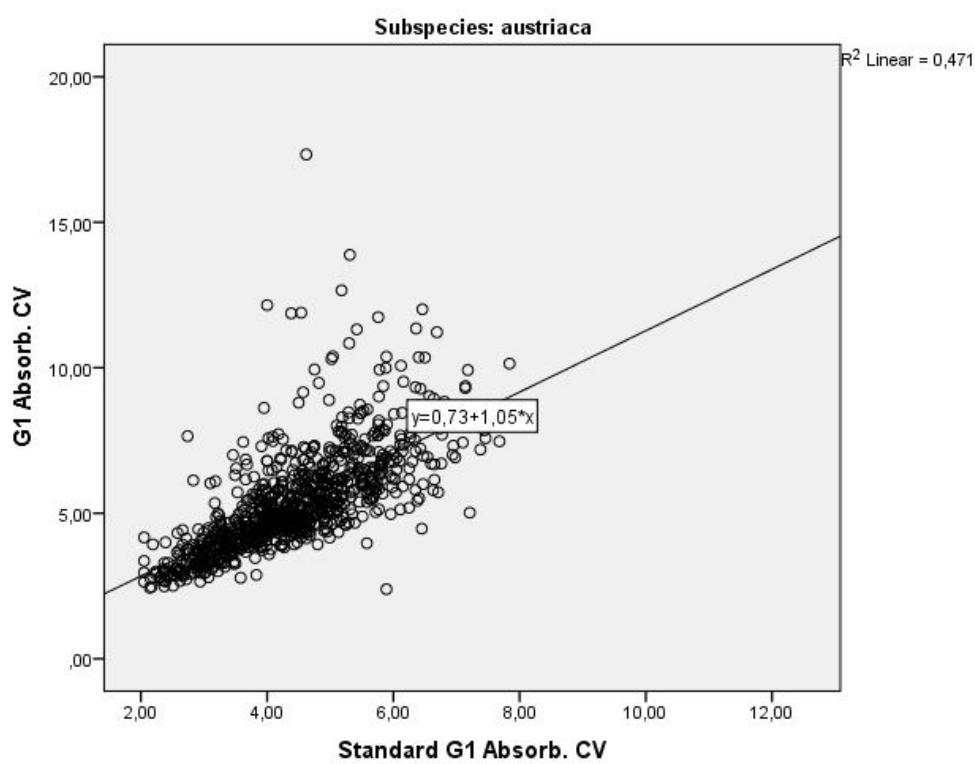


Abb. 25. Streudiagramm mit Regressionsgerade. Darstellung der Verteilung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks von *B. l. ssp. austriaca* im Verhältnis zu den Variationskoeffizienten der G1-Peaks des Standards

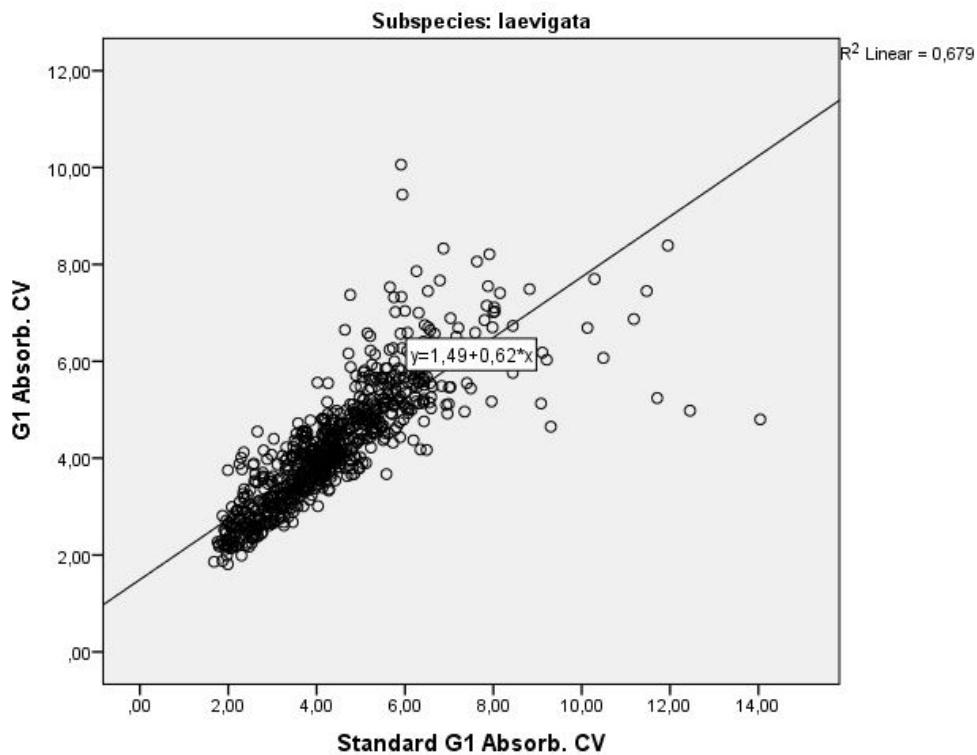


Abb. 26. Streudiagramm mit Regressionsgerade. Darstellung der Verteilung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks von *B. l. ssp. laevigata* im Verhältnis zu den Variationskoeffizienten der G1-Peaks des Standards

Schon anhand der Grafiken lässt sich ein Zusammenhang zwischen den jeweiligen CV-Werten der Proben gut erkennen. Dieser Zusammenhang konnte durch die Verwendung des Tests auf Nichtparametrische Korrelation nach Spearman-Rho bestätigt werden. Der Spearman-Rho-Test ergab bei der Subspezies *B. l. ssp. austriaca* eine signifikante (Signifikanzwert < 0,001), mittlere, positive Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,785) und bei *B. l. ssp. laevigata* ebenfalls eine signifikante (Signifikanzwert < 0,001), hohe, positive Korrelation (Korrelationskoeffizient = 0,904). Dementsprechend weisen auch die Regressionsgeraden eine signifikante Steigung auf.

4.13 Einfluss des Zeitfaktors auf die Messergebnisse – Zeit nach dem Sammeln/Präparieren/Färben

Eine weitere wichtige Fragestellung betraf die Zeitspanne bis zur Weiterverarbeitung des Pflanzenmaterials nach dem Sammeln und deren Einfluss auf die Proben. Um eine Veränderung der Proben festzustellen wurden zwei Parameter im Zeitverlauf nach dem Sammeln betrachtet - einerseits der 1C-DNA-Gehalt („DNA-1C“) und andererseits der Variationskoeffizient des G1-Peaks („G1 Absorb. CV“).

Die Betrachtung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks lässt keine Veränderung im Laufe der Zeit nach dem Sammeln erkennen. Scheinbar leidet die Qualität des Pflanzenmaterials, sofern es gut gekühlt und schonend transportiert wird, nicht oder kaum. Das folgende Boxplot-Diagramm (Abb. 27) zeigt die Entwicklung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks nach dem Sammeln für alle diploiden und tetraploiden Proben gemeinsam und veranschaulicht die Konstanz der Werte auch nach längeren Zeitspannen zwischen Sammeln und Messen.

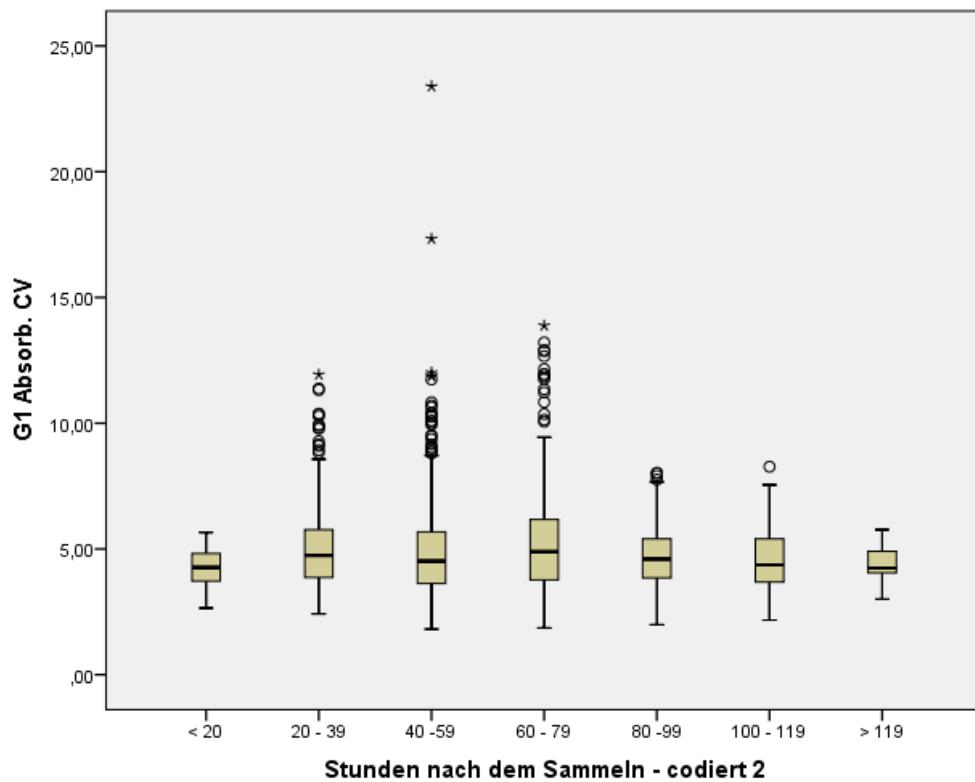


Abb. 27. Boxplotdiagramm. Entwicklung der Variationskoeffizienten aller G1-Peaks (alle Subspezies) bei unterschiedlich langen Zeitspannen zwischen Sammeln und Messen – eingeteilt in Kategorien.

Folgende Tabelle (Tab. 21) zeigt die Verteilung der in die Grafik einfließenden Werte.

Tab. 21. Einfließende Fälle und deren Aufteilung auf die gewählten Kategorien der vergangenen Stunden zwischen Sammeln und Messen.

	Stunden nach dem Sammeln - codiert 2	Fälle	
		Gesamt	
		N (runs)	Prozent
G1 Absorb. CV	< 20	38	100,0%
	20 - 39	416	100,0%
	40 - 59	697	100,0%
	60 - 79	300	100,0%
	80 - 99	203	100,0%
	100 - 119	181	100,0%
	> 119	33	100,0%

Auch die Entwicklung der DNA-1C-Gehalte nach dem Sammeln zeigt ein ähnlich konstantes Bild (hier exemplarisch an den Werten der Diploiden grafisch dargestellt) und lässt auf keine negative Beeinflussung der Messergebnisse innerhalb der ersten fünf Tage nach dem Sammeln schließen (vgl. Abb. 28).

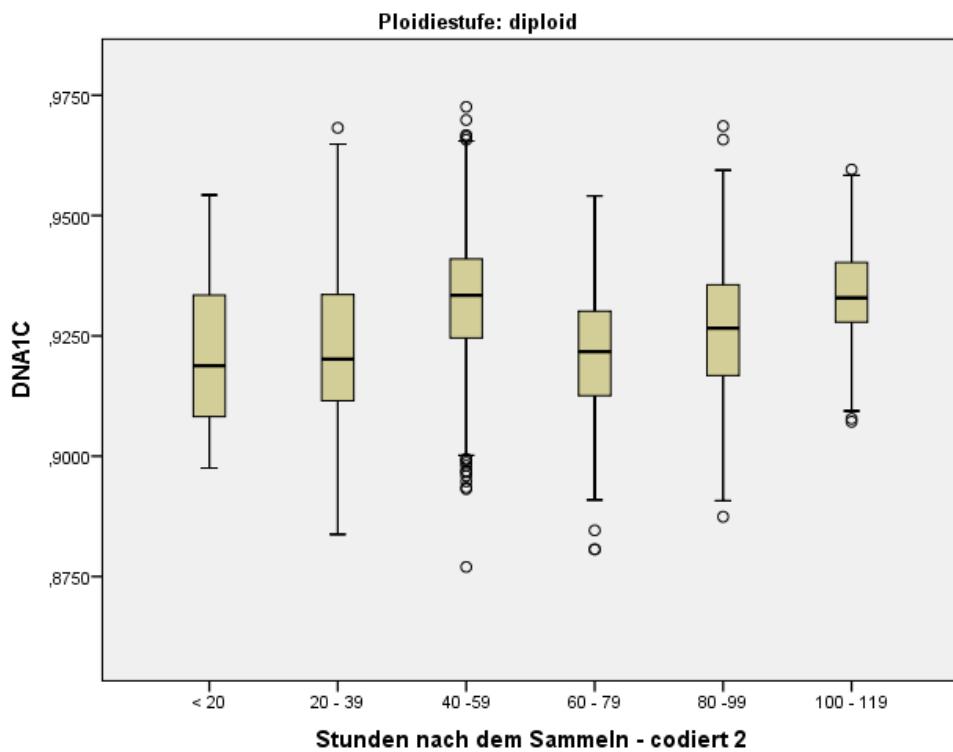


Abb. 28. Boxplotdiagramm. Entwicklung der DNA-1C-Gehalte aller Subspezies bei unterschiedlich langen Zeitspannen zwischen Sammeln und Messen – eingeteilt in Kategorien.

Die weiteren Vergleiche dieser beiden Parameter mit der vergangenen Zeit einerseits nach dem Präparieren und andererseits nach dem Färben ergaben, dass es bei durchgehender Lagerung im Kühlschrank zu keiner auffälligen Beeinflussung der Messergebnisse innerhalb von ein bis zwei Tagen kommt. Folgende Grafiken sollen veranschaulichen wie konstant die Ergebnisse sowohl für die DNA-1C-Gehalte also auch für die Variationskoeffizienten der G1-Peaks waren. Hierzu wurden die Individuen einzelner Populationen, in diesem Fall von 408 (Gösting bei Graz) und 429 (Schneeberg, Klosterwappen), herangezogen (siehe Abb. 29 und 30).

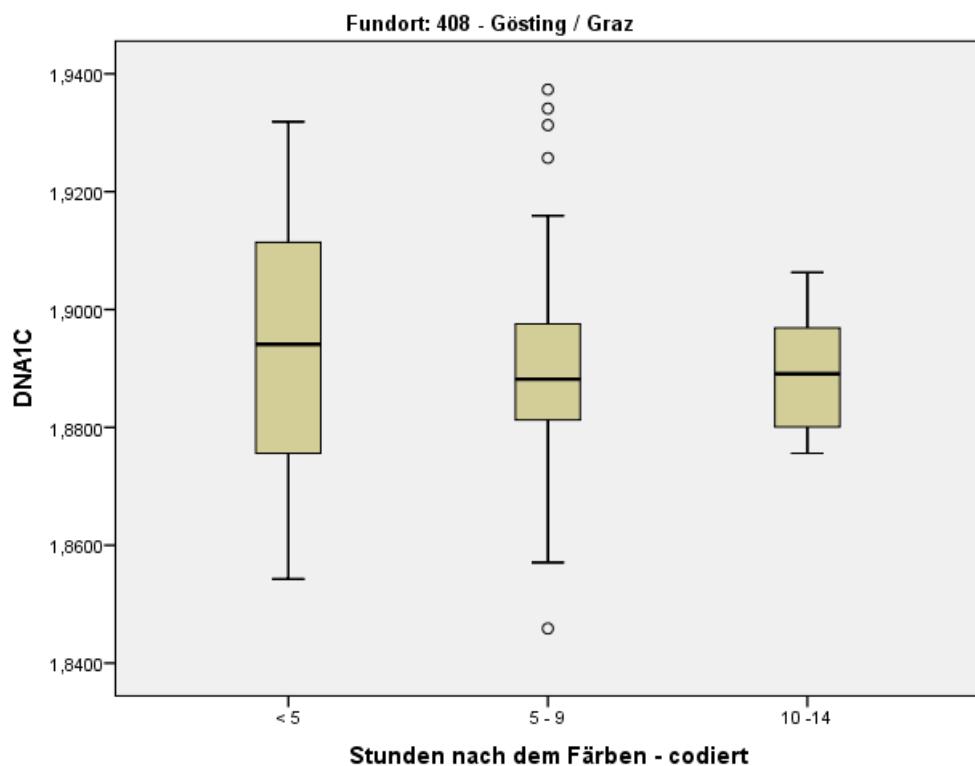


Abb. 29. Boxplotdiagramm. Entwicklung der DNA-1C-Gehalte der Proben von *B. l. ssp. laevigata* von Gösting/Graz (408) bei unterschiedlich langen Zeitspannen zwischen Färben und Messen

Diese Grafik unterstreicht die Aussage, dass sich der DNA-1C-Gehalt in den Stunden nach dem Färben kaum verändert.

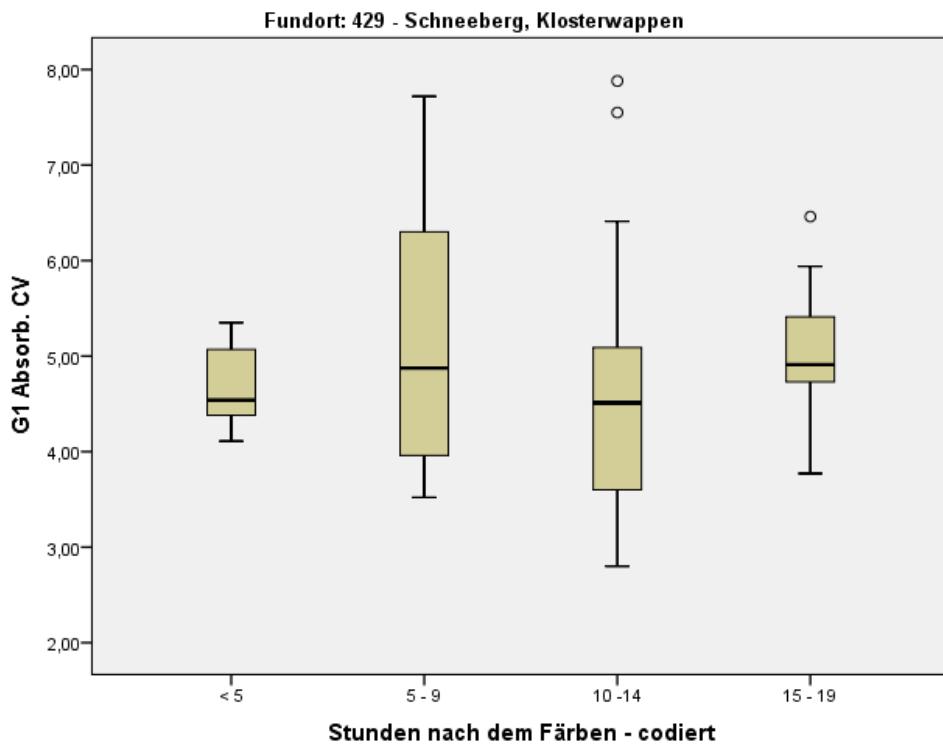


Abb. 30. Boxplotdiagramm. Entwicklung der Variationskoeffizienten der G1-Peaks der Proben von *B. l. ssp. austriaca* vom Schneeberg/Klosterwappen (429) bei unterschiedlich langen Zeitspannen zwischen Färben und Messen

Auch an dieser Grafik lässt sich die Konstanz der Variationskoeffizienten der G1-Peaks in den Stunden nach dem Färben gut erkennen.

5. Diskussion

5.1 Chromosomenzählung

Wie erwartet konnten die von Manton (1934, 1937), Schönfelder (1968b) und König (1994) angegebenen Chromosomenzahlen, durch die eigenen Chromosomenzählungen bestätigt werden. Auf Grund der relativ geringen Genomgröße von *Biscutella laevigata* sind auch die Chromosomen dieser Pflanze vergleichsweise klein. Die Datenbank von „Royal Botanic Gardens“ gibt beispielsweise bei der Abfrage der DNA-1C-Werte für die Klasse der Angiospermen eine minimale Genomgröße von 0,06 pg (*Genlisea margaretae*) und eine maximale Genomgröße von 152,20 pg (*Paris japonica*) an (vgl. Greilhuber et al., 2006 bzw. Pellicer et al., 2010). Der Mittelwert aller in der Datenbank erfassten Angiospermen liegt mit 5,79 pg deutlich höher als die Genomgröße von *Biscutella laevigata*, welche mit einem DNA-

1C-Wert von 0,93 pg angegeben wird. Auch die folglich relativ kleinen mitotischen Metaphasekerne, welche König (1994, S. 33) mit ca. $6 \mu\text{m}^2$ für Diploide und $10 \mu\text{m}^2$ für Tetraploide angibt, erschweren durch ihre geringen Größe das Erlangen guter Chromosomenbilder, was weiters dazu führt, dass auch die Zählung der Chromosomen von *Biscutella laevigata* relativ schwierig ist. Besonders bei den Tetraploiden ist die Chromosomenzählung durch die erhöhte Anzahl schwieriger und daher mit $2n = 4x = \pm 36$ angegeben, was auch in der Literatur des Öfteren zu finden ist.

Es wurde auch versucht Meiosestadien zu präparieren, da bei ihnen die Chromosomenzahl, besonders bei Polyploiden, leichter festzustellen ist. Leider konnte bei der Untersuchung der Meiosestadien jedoch kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden.

5.2 Überblick über die Genomgrößen

Die relativ große Anzahl von 36 besammelten Populationen und die große Zahl an, in mehreren Durchläufen gemessen, Individuen von 626 begünstigt eine statistische Auswertung. Wie bereits erwähnt wurden zwei Populationen während der Auswertung mit SPSS grundsätzlich von der Auswertung ausgeschlossen, da die Individuenzahlen sehr gering waren und somit ein Vergleich mit den anderen Populationen die Ergebnisse hätte verfälschen können. Die geografische Aufteilung der Subspezies bzw. der Ploidiestufen von Ost nach West ist wie angenommen wird durch die Verbreitungsgeschichte von *Biscutella laevigata* bedingt. Die diploiden Populationen werden als präglaziale bzw. interglaziale Relikte und die tetraploiden Populationen als postglaziale Einwanderer gesehen und somit ist die geografische Aufteilung von *B. l. laevigata* indirekt durch die Höhenlage bzw. den Alpenraum natürlich vorgegeben. Da in den Bundesländern Tirol und Vorarlberg jedoch keine Populationen besammelt wurden lässt sich diese Aussage im Fall unserer Daten nicht lückenlos belegen.

Mit der Besammlung von 20 diploiden Populationen und 14 tetraploiden Populationen ist eine gute Verteilung der Ploidiestufen für Vergleiche gelungen. Auch die Menge der diploiden und tetraploiden Individuen stehen mit 358 zu 261 in einem einigermaßen ausgewogenen Verhältnis um gute Vergleiche ziehen und fundierte Aussagen treffen zu können.

Die Arbeit mit einer relativ großen Stichprobe und die damit erhaltenen großen Datenmengen ermöglichte, die Berechnung gut vergleichbarer und stabiler Werte für den DNA-Gehalt einzelner Subspezies bzw. Pflanzen unterschiedlicher Ploidiestufen.

Der Vergleich der DNA-1C-Gehalte lässt Mutmaßungen über die evolutionäre Entstehung bzw. die systematische Stellung der Unterarten zueinander zu. Trotz der besonders ähnlichen DNA-1Cx-Wert der tetraploiden Subspezies *B. l. ssp. laevigata* von 0,934 pg und der diploiden Subspezies *B. l. ssp. kernerl* von 0,938 pg erscheint eine Entwicklung der Subspezies *B. l. ssp. laevigata* aus *B. l. ssp. kernerl* jedoch als sehr fragwürdig, da die tetraploiden Pflanzen nach aktuellen Theorien erst postglazial eingewandert sind, die Verbreitungsgebiete der beiden Subspezies sich jedoch nicht überschneiden, nicht berühren und auch nicht nahe beisammen liegen. Bei den Populationen, welche direkt an die tetraploiden Populationen des Alpenraums angrenzen handelt es sich hingegen um *B. l. ssp. austriaca* mit einem DNA-1Cx-Wert von 0,926 pg, was eine nahe Verwandtschaft mit bzw. eine Entstehung aus dieser Subspezies nahelegt.

Interessant ist auch die Tatsache, dass der 1Cx-Mittelwert der Tetraploiden mit 0,934 pg fast exakt dem 1Cx-Mittelwert der Diploiden mit 0,928 pg entspricht, was wiederum auf eine sehr hohe Genauigkeit der Werte, welche durch die große Stichprobe erreicht werden konnte, hinweist.

Der Vergleich der DNA-1C-Mittelwerte mit Werten von König (1994, S. 41 f), welche jedoch bei deutlich geringerer Individuenzahl (26 Pflanzen) bzw. auf Grund einer anderen Messmethode auch bei deutlich geringerer Zahl an vermessenen Kernen pro Pflanze ermittelt wurden, zeigt bei den Diploiden einen niedrigeren Mittelwert als jenen welcher für diese Arbeit ermittelt wurde und bei Tetraploiden einen fast identen Mittelwert. König (1994, S. 42) beschreibt einen 1C-Mittelwert von 0,99 pg für die Diploiden und einen Mittelwert von 1,87 pg für die Tetraploiden. Wie bereits erwähnt erhielten wir im Rahmen dieser Untersuchungen bei den Diploiden einen Mittelwert von 0,928 pg (N = 1142) und bei Tetraploiden einen Mittelwert von 1,869 pg (N = 751) für den DNA-1C-Gehalt.

5.3 Variation der Messwerte innerhalb der Individuen, der Populationen, der Subspezies, bzw. innerhalb der Ploidiestufen

Beim Vergleich der Durchläufe (runs) eines Individuums konnten sehr konstante Ergebnisse für die DNA-1C-Werte festgestellt werden, welche sich nur in Bereichen von Tausendstel- bzw. manchmal Hundertstel-Picogramm unterschieden. Beispielweise wurde beim Individuum 1 ein Mittelwert von 0,944 pg ermittelt, welcher sich aus drei Durchläufen mit Messwerten von 0,9436, 0,9442 und 0,9448, eine Standardabweichung von nur 0,00063 ergibt. Diese kleinen Schwankungen können, bei gleicher Probe und sehr kurz nacheinander

gemessenen Durchläufen am gleichen Gerät, nur auf technische Einstellungen bzw. technisch verursachte Messschwankungen zurückgeführt werden.

Auch die in Tabelle 11 dargestellten DNA-1C-Mittelwerte der Population in Mödling zeigen ein weitgehend homogenes Bild und stützen die Aussage, dass die DNA-1C-Werte innerhalb einer Population sehr konstant und daher gut vergleichbar sind.

Durch die Darstellung der DNA-1C-Mittelwerte in den Tabellen 8-10 für die Subspezies *B. l. ssp. austriaca*, *B. l. ssp. kernerii* und *B. l. ssp. laevigata* wird die grundsätzlich enge Spannweite der DNA-1C-Werte innerhalb der jeweiligen Subspezies gezeigt. Schwankungen der DNA-1C-Mittelwerte, welche innerhalb der Ploidiestufen auftreten, können bei den Diploiden einerseits auf die unterschiedlichen Subspezies zurückgeführt werden und andererseits auch auf die innerhalb einer Subspezies unterschiedlichen Höhenlagen der Fundorte zurückgeführt werden (vgl. Abb. 13 und Tab. 12 + 13). Auch bei den Tetraploiden lassen sich Schwankungen der DNA-1C-Werte ebenfalls durch unterschiedliche Seehöhen der Fundorte erklären (vgl. Abb. 14 bzw. Tab. 14 + 15). Bei weiteren Untersuchungen dieser Erkenntnisse wäre es besonders interessant in den Gebieten mit Populationen in hohen Lagen nochmals nach Populationen in niederen Lagen zu suchen um im direkten Vergleich, eng benachbarte Populationen auf unterschiedlichen Höhenlagen genauer betrachten zu können. Wobei an diesem Punkt jedoch auch zu erwähnen ist, dass bereits in der Publikation von Machatschky-Laurich (1926) der Verdacht angesprochen wird, dass es sich bei den diploiden Populationen der Subspezies *B. l. ssp. austriaca* im Raum Rax, Schneearpe und Hochschwab um eine eigene Unterart handeln könnte. Untersuchungen mit ähnlichem Ergebnis wie jenes, dass die DNA-1C-Mittelwerte von *Biscutella laevigata* innerhalb der jeweiligen Ploidiestufe bzw. im Fall der Diploiden innerhalb der Subspezies *B. l. ssp. austriaca* mit steigender Seehöhe sinken, findet man in der Literatur auch bei anderen Spezies. Beispielsweise schreiben auch Greilhuber und Temsch (2001) über den Zusammenhang des DNA-Mittelwertes von *Arachis duranensis* mit unterschiedlichen Seehöhen. Auch in dieser Studie wird ein negativer Zusammenhang zwischen der Genomgröße und der Seehöhe der Fundorte der Pflanzen beschrieben.

5.4 Triploide Individuen in den diploiden Populationen

Als auffallendes Ergebnis ist das wiederholte Auftreten von einzelnen Triploiden Individuen in diploiden Populationen zu nennen. Hierbei sollte besonders betont werden, dass jeweils genau ein triploides Individuum in den sieben betroffenen, diploiden Populationen gefunden wurde, was bei 365 gemessenen diploiden Individuen einem Anteil von 1,9 % entspricht. In

den tetraploiden Populationen wurden hingegen keine Individuen anderer Ploidiestufen gefunden. Wie bereits erwähnt wurde das sehr vereinzelte Vorkommen von triploiden Individuen von *Biscutella laevigata* auch bereits von König (1994) und Dannemann (2000) bemerkt. Die Annahme, dass triploide Pflanzen von *B. laevigata* spontan entstehen können wurde bereits von Manton (1937) angemerkt. Auch Olowokudejo (1980), König (1994), Dannemann (2000) und Tremetsberger, König, Samuel, Pinsker und Stuessy (2002, S. 165) gehen davon aus, dass natürliche triploide Pflanzen von *B. laevigata* spontan entstehen können. Manton (1937) berichtet im Rahmen ihrer zahlreichen Selbstfertilitäts- und Kreuzungsexperimente sogar vom spontanen Entstehen von Triploiden Hybriden aus im Garten frei blühenden Diploiden und Tetraploiden. Die künstliche Herstellung von triploiden Hybriden durch König (1994, S. 36) erfolgte aus der Kreuzung einer diploiden und einer tetraploiden Pflanze. Die Fertilität der künstlich hergestellten triploiden Hybriden ist erwartungsgemäß stark gestört (König, 1994, S. 40). Viele triploide Pflanzen können selbst keine Samen bilden. Im Allgemeinen wird beim Vorkommen von triploiden Pflanzen davon ausgegangen, dass diese aus der Bestäubung der Blüte einer diploiden Pflanze mit dem Pollen einer tetraploiden Pflanze (oder umgekehrt) entstanden.

Im Fall von *B. laevigata* s.l. erscheint die Vorstellung einer solchen Entstehung von Triploiden jedoch als sehr unwahrscheinlich, da die diploiden und tetraploiden Populationen räumlich weit voneinander entfernt vorkommen und es daher kaum zu einer Hybridisierung kommen kann. Weiters fällt bereits bei der Betrachtung der Tabelle 16 auf, dass sich das Vorkommen von triploiden Individuen auf die diploiden Populationen beschränkt, wobei jedoch sowohl bei *B. l. ssp. austriaca* als auch *B. l. ssp. kernerii* triploide Individuen gefunden wurden. Es ist daher zu vermuten, dass die triploiden Individuen in den diploiden Populationen durch Fehler in der Meiose einer diploiden Pflanze und die nachfolgende Verschmelzung eines solchen nicht reduzierten Gameten mit einem reduzierten Gameten, entstehen. Die gefundenen triploiden Pflanzen trugen auch Früchte, wobei die Keimfähigkeit und die damit verbundene Fertilität dieser Pflanzen jedoch nicht weiter überprüft wurden.

Auch der Mittelwert für den DNA-1C-Gehalt aller triploiden Individuen passt mit 1,405 pg sehr gut zu den 1C-Werten der Diploiden und Tetraploiden. Der Vergleich der DNA-1Cx-Werte ermöglicht einen direkten Vergleich und zeigt wie nahe die gemessenen Werte der unterschiedlichen Ploidiestufen beisammen liegen. Der Mittelwert der DNA-1Cx-Gehalte der Diploiden beträgt wie bereits erwähnt wurde 0,928 pg. Etwas größer ist der 1Cx-Wert mit 0,934 pg (exakt 0,934309 pg) bei den Tetraploiden, wobei der Unterschied nur 0,006 pg beträgt. Der 1Cx-Wert der Triploiden ist mit 0,934 pg (exakt 0,934124 pg) fast exakt gleich

wie jener der Tetraploiden und unterstreicht wiederum die Konstanz der DNA-Menge auch zwischen den unterschiedlichen Ploidiestufen.

5.5 Einfluss unterschiedlicher Standards auf die Messergebnisse

Der Einfluss unterschiedlicher Standards auf die Messergebnisse der Durchflusszytometrie war ein wichtiger Faktor, der für die Standards *Solanum pseudocapsicum* und *Glycine max* überprüft wurde. Diese beiden Standards weisen eine ähnliche Genomgröße wie das zu untersuchende Objekt (*B. laevigata*) auf, wodurch im dadurch entstehenden Diagramm die „Peaks“ (Kurvengipfel in der grafischen Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messwerte) in einem ähnlichen Bereich liegen und somit leichter vergleichbar sind, ohne sich jedoch zu überschneiden, was eine getrennte Auswertung erschweren oder sich die Mittelwerte verzerren würde. Da es noch keine offizielle, einheitliche Liste mit gegeneinander kalibrierten Standards für die Messung der Genomgröße mittels Durchflusszytometrie gibt bzw. sich unterschiedliche Listen offiziell und auf internationaler Ebene nicht durchsetzen konnten, sind Daten, welche mit unterschiedlichen Standards gemessen wurden, immer mit Vorsicht zu betrachten bzw. zu vergleichen. Hinzu kommt bei der Betrachtung von Messwerten aus unterschiedlichen Labors (bzw. wie in diesem Fall, von unterschiedlichen Instrumenten) auch die Tatsache, dass methodische Einflüsse und der Einfluss unterschiedlicher Durchflusszytometer noch weitgehend unbekannt sind (Dolezel und Greilhuber, 2010, S. 638). Aus diesem Grund wurden die mit *Glycine max* vermessenen Individuen der Population 408 ebenfalls aus der Auswertung zur Beantwortung dieser Fragestellung herausgenommen. In diesem Fall wurden zwar die ersten fünf Individuen mit *Glycine max* vermessen, dies geschah, auf Grund technischer Probleme, jedoch mit einem anderen Messgerät als bei der Messung mit *Solanum pseudocapsicum* und lässt in diesem Fall somit keinen direkten Vergleich zu.

Die bei den Untersuchungen festgestellten Unterschiede der DNA-1C-Werte, bei gleichen Individuen und unterschiedlichen Standards, können also auf die Verwendung unterschiedlicher Standards zurückgeführt und auch statistisch nachgewiesen werden. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass gerade durch die sehr genauen und stabilen Messergebnisse, sehr geringe Unterschiede festgestellt werden können.

5.6 Einfluss unterschiedlicher Messgeräte auf die Messergebnisse

Erfreulicherweise konnte bei den meisten Populationen kein signifikanter Unterschied zwischen den DNA-1C-Mittelwerten, welche an unterschiedlichen Geräten gemessen wurden, gefunden werden. Dieses Ergebnis spricht für die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Labors, sofern wichtige Faktoren wie die Wahl des Standards oder die Färbemethode gleich sind.

Einen Unterschied zwischen den beiden Geräten gab es jedoch hinsichtlich der Genauigkeit der Messung, welcher durch den Vergleich der Variationskoeffizienten ermittelt wurde. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Qualität der verwendeten Geräte zurückzuführen, da das Modell CyFlow ML zwar älter als das Modell CyFlow Space ist, jedoch trotzdem das ältere ML Modell mit einer höheren Genauigkeit misst.

5.7 Einfluss der Durchlaufgeschwindigkeit (speed) bzw. der Anzahl der gemessenen Kerne auf die Messergebnisse

Gerade bei einer großen Anzahl an vermessenen Kernen ist auch die Durchflussgeschwindigkeit ein nicht zu unterschätzender Faktor für die Messdauer pro Probe. Nun stellt sich jedoch die Frage ob die gemessenen DNA-Werte von der Durchflussgeschwindigkeit beeinflusst werden bzw. ob die Durchflussgeschwindigkeit einen Einfluss auf die Genauigkeit der Messung (zB den Variationskoeffizienten) hat. Für diese Fragestellung ergaben die Untersuchungen, dass ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen der Durchlaufgeschwindigkeit und dem gemessenen Variationskoeffizienten der G1-Peaks besteht. Um möglichst genaue Messungen mit niedrigen Variationskoeffizienten, welche ja auch ein Gütekriterium darstellen, zu erhalten, ist es demnach notwendig die Durchlaufgeschwindigkeit zu drosseln.

Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die Anzahl der gemessenen Kerne, welche neben der Durchlaufgeschwindigkeit, ebenfalls einen entscheidender Faktor für die Messdauer einer Probe darstellt, genauer zu betrachten. Bei der Messung von Genomgrößen mit dem Durchflusszytometer werden üblicherweise relativ viele Kerne (etwa im Bereich von 3000 – 5000) gemessen, was einer Messdauer von ca. 4 Minuten pro Messdurchlauf entspricht. Um eventuell ein schnelleres Arbeiten bei gleicher Genauigkeit zu ermöglichen, galt es daher den Einfluss der Anzahl der gemessenen Kerne auf die DNA-1C-Mittelwerte und auf die Messqualität also die Genauigkeit der Messung in Form des Variationskoeffizienten zu überprüfen. In beiden Fällen konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Das Streudiagramm der Abbildung 22 zeigt, dass auch kein erkennbarer Zusammenhang zwischen den DNA-1C-Werten und der Durchlaufgeschwindigkeit besteht, was wiederum bedeutet, dass die Genauigkeit der Messung zwar unter einer erhöhten Durchlaufgeschwindigkeit leidet, der DNA-1C-Wert jedoch nicht auffällig in eine Richtung beeinflusst wird.

Für die Praxis bedeuten diese Ergebnisse, dass die Anzahl der gemessenen Kerne keinen so starken Einfluss auf die Qualität der Messungen haben wie angenommen wurde und es somit keinen Sinn macht besonders viele Kerne zu messen. Eine Anzahl von 1500 – 2000 gemessenen Kernen ist nach diesen Ergebnissen ausreichend. Um eine gute Qualität (also eine möglichst niedrige Standardabweichung bzw. niedrige Variationskoeffizienten) zu erhalten, wäre es hingegen sinnvoll diese geringere Anzahl an Kernen mit einer geringen Durchlaufgeschwindigkeit zu messen, da eine erhöhte Durchlaufgeschwindigkeit auch zu höheren Variationskoeffizienten führt. Hierbei erscheint die Wahl der Durchlaufgeschwindigkeit unter 0,8 als sinnvoll um den Variationskoeffizienten möglichst unter 5 % zu halten.

5.8 Zusammenhang der Variationskoeffizienten (CV) von Probe und Standard

Im Vergleich der Variationskoeffizienten der G1-Peaks von Probe und Standard konnte jeweils eine mittlere bis starke, positive Korrelation der Werte festgestellt werden. Das Ergebnis der Korrelation der Variationskoeffizienten von Probe (G1-Peak) und Standard (G1-Peak) lässt darauf schließen, dass hohe Variationskoeffizienten und die damit verbundene geringere Genauigkeit der Messung kaum auf Qualität des Pflanzenmaterials zurückzuführen ist, wobei jedoch von einer gewisse Mindestqualität des Pflanzenmaterials ausgegangen wird. Andernfalls gäbe es vermutlich keine Zusammenhang zwischen den beiden Variationskoeffizienten. Es bleibt zu vermuten, dass ein erhöhter Variationskoeffizient bei den Messungen eher durch technische Parameter, Messgerät oder durch Einflüsse während der Präparierung und Färbung der Probe entsteht und somit immer das gesamte in einer Probe enthaltene Pflanzenmaterial betreffen.

5.9 Einfluss des Zeitfaktors – nach dem Sammeln/Präparieren/Färben

Das allgemeine Bestreben ist es das Pflanzenmaterial so gut wie möglich zu kühlen, schonend zu transportieren und so rasch als möglich weiter zu verarbeiten. Nun trat während der Arbeiten jedoch teilweise der Fall ein, dass das Pflanzenmaterial nach dem Sammeln, auf Grund der Entfernung des Fundorts zum Institut oder auch Mangels Verfügbarkeit der

Messgeräte, nicht am gleichen Tag präpariert und dadurch natürlich auch nicht gemessen werden konnte. Die oben angeführten Auswertungen sollten daher Aufschluss darüber geben, ob und wenn ja wie sehr eine zu lange Lagerung nach dem Sammeln die Messergebnisse beeinflusst und des Weiteren auch ob die Proben (bzw. die Qualität der Proben) sich nach dem Präparieren bzw. nach dem Färben verändern und somit die Messergebnisse beeinflussen.

Die Betrachtung der Ergebnisse lässt die Annahme zu, dass bei guter Lagerung des Pflanzenmaterials bzw. der Proben durchaus auch mit ein paar Tage altem Material gute und aussagekräftige Messergebnisse erzielt werden können. Somit ist auch problemlos möglich Pflanzenmaterial aus weiter entfernten Gebieten am heimischen Institut zu messen, wenn man für eine angemessene Zwischenlagerung sorgen kann. Auch das Aufbewahren im Kühlschrank von bereits präparierten oder gefärbten Proben (beispielsweise während eines Feiertags), um diese erst am folgenden Tag zu messen, sollte kein Problem für die Messung und die Qualität der Ergebnisse darstellen. Beispielsweise ist in den Abbildungen 27 und 30 gut zu erkennen, dass der Variationskoeffizient und somit die Genauigkeit der Messungen weder unter längeren Zeitspannen nach dem Sammeln noch durch längere Zeitspannen nach dem Färben litt.

6. Anhang

6.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Genomgröße von *Biscutella laevigata* und deren Messung mittels Durchflusszytometrie. Das Pflanzenmaterial umfasst Proben aus diploiden und tetraploiden Populationen und auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird gesondert auf das Vorkommen von triploiden Individuen in diploiden Populationen eingegangen. Einerseits werden durch die Analyse einer relativ großen Stichprobe systematisch-populationsgenetische Aspekte beleuchtet und andererseits werden auch technisch-methodische Fragestellungen behandelt.

Chromosomenzählungen bestätigten die bisher bekannten Werte aus der Literatur für Diploide ($2n = 2x = 18$) und Tetraploide ($2n = 4x = 36$). Die Variabilität der Genomgröße innerhalb der Ploidiestufen, der Unterarten, der Populationen und der einzelnen Individuen wurde ebenfalls analysiert. Die DNA-1Cx-Mittelwerte der unterschiedlichen Ploidiestufen stimmen gut überein und lassen Rückschlüsse über die evolutionäre Entwicklung der einzelnen Unterarten zu. So kann beispielsweise vermutet werden, dass sich die tetraploide *B. l. ssp. laevigata* mit einem 1Cx-Mittelwert von 0,934 pg aus der diploiden *B. l. ssp. austriaca* mit einem 1Cx-Mittelwert von 0,926 pg entwickelt haben könnte, da die Verbreitungsgebiete dieser beiden Subspezies an einander grenzen und sich sogar leicht überschneiden. Das Vorkommen triploider Individuen beschränkte sich wie bereits erwähnt auf die diploiden Populationen. Hier wurde in sieben diploiden Populationen jeweils genau ein Triploides Individuum gefunden, was bei einer Gesamtanzahl von 365 gemessenen, diploiden Individuen einem Anteil von 1,9 % entspricht. Beim Vergleich der Durchläufe (runs) eines Individuums konnten sehr konstante Ergebnisse für die DNA-1C-Werte festgestellt werden, welche sich nur in Bereichen von Tausendstel- bzw. manchmal Hundertstel-Picogramm unterschieden. Auch die DNA-1C-Werte innerhalb ausgewählter Populationen waren sehr konstant und homogen. Die Spannweite der DNA-1C-Mittelwerte innerhalb der unterschiedlichen Subspezies lässt sich durch die unterschiedlichen Höhenlagen der Fundorte erklären.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen unterschiedlicher technischer bzw. methodischer Parameter auf die Messergebnisse untersucht. Hier kamen wir beispielsweise zu dem Schluss, dass die Verwendung unterschiedlicher Standards zu statistisch nachweisbar, leicht verschiedenen Ergebnissen führen kann. Hingegen konnte bei den meisten Populationen kein signifikanter Unterschied zwischen den DNA-1C-Mittelwerten, welche an

unterschiedlichen Geräten gemessen wurden, gefunden werden. Dieses Ergebnis spricht für die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Labors, sofern wichtige Faktoren wie die Wahl des Standards oder die Färbemethode gleich sind. Die Dauer der Messung einer Probe hängt besonders von der Durchlaufgeschwindigkeit und der Anzahl der gemessenen Kerne ab. Nach der Bewertung der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Anzahl von 1500-2000 gemessene Kerne ausreicht um eine die Genauigkeit und somit die Qualität einer Messung zu gewährleisten. Hingegen ist es sinnvoll diese relativ geringe Anzahl an Kernen bei einer niedrigen Durchlaufgeschwindigkeit (am besten unter 0,8) zu messen.

Im Vergleich der Variationskoeffizienten der G1-Peaks von Probe und Standard konnte jeweils eine mittlere bis starke, positive Korrelation der Werte festgestellt werden. Das Ergebnis der Korrelation der Variationskoeffizienten von Probe (G1-Peak) und Standard (G1-Peak) lässt darauf schließen, dass hohe Variationskoeffizienten und die damit verbundene geringere Genauigkeit der Messung kaum auf Qualität des Pflanzenmaterials zurückzuführen ist, wobei jedoch von einer gewisse Mindestqualität des Pflanzenmaterials ausgegangen wird.

Durch die Variation der Zeitabstände zwischen der Sammlung des Pflanzenmaterials und dessen Verarbeitung, Färbung und Messung, werden methodische Einflüsse auf das Messergebnis beleuchtet. Das Ergebnis der Untersuchungen war, dass die Genauigkeit der Messungen kaum darunter litt, wenn die Zeitspanne zwischen Sammeln, Präparieren bzw. Färben und der Messung sich verlängerte. Bei guter, kühler Lagerung kann das Pflanzenmaterial problemlos auch nach 2-4 Tagen weiterverarbeitet und vermessen werden. Der Variationskoeffizient der Messungen dient auch hier als Parameter zur Beurteilung der Genauigkeit und der damit verbundenen Qualität der Messung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philipp Glaser
Adresse: Sechshauserstraße 12/5, 1150 Wien, Österreich
Telefon: 0664 14 58 239
E-mail: philipp_glaser@gmx.at
Geburtstag und -ort: 14. Oktober 1986, Gmünd

Bildungsweg

seit WS 2007 Lehramtstudium - Bewegung und Sport + Biologie und Umweltkunde
2007 6 Monate Heeresdienst; ab April Ausbildung zum Rettungssanitäter und Einsatzfahrer
2001-2006 Bundeshandelsakademie für Informationsmanagement und Informationstechnologie, Gmünd
1993-2001 Peter-Rosegger-VS, Öko-Hauptschule (HS 2), Gmünd

Literaturverzeichnis

- Baltisberger, M. & Frey, D. (1997). *Systematische Botanik. Einheimische Farn- und Samenpflanzen*. Zürich: vdf Hochschulverlag AG
- Bresinsky, A. und J. Grau (1970). *Zur Chorologie und Systematik von Biscutella im Bayrischen Alpenvorland*. Ber. Bayer. Bot. Ges. 42: 101 - 108
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Markl, J. (Hrsg). (2006). *Biologie*. (6. Auflage). München: Pearson Studium
- Cires, E., Cuesta, C., Fernández, M.A., Nava, H.S., Vázquez, V.M. & Fernández, J.A. (2011). *Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from species with extremely mucilaginous compounds: an example in the genus Viola L. (Violaceae)*. Anales Jardín Botánico de Madrid 68 (2): 139-154.
- Fischer, M. A., Oswald, K., Adler W. (2008). *Exkursionsflora von Österreich, Lichtenstein, Südtirol*. 3. Auflage. Linz: Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen
- Dannemann, A. (2000). *Der Einfluss von Fragmentierung und Populationsgröße auf die genetische Variation und Fitness von seltenen Pflanzenarten am Beispiel von Biscutella laevigata (Brassicaceae)*. Dissertationes Botanicae. Band 330. Marburg: Philipps-Universität
- Dolezel, J. & Bartos, J. (2005). *Plant DNA Flow Cytometry an Estimation of Nuclear Genome Size*. Annals of Botany 95: 99-110
- Dolezel J. & Greilhuber J. (2010). *Nuclear Genome Size: Are We Getting Closer?* Journal of the international Society for Advancement of Cytometry. Part A. 77A: 635-643
- Durka, W. (2002). *Chromosomenzahlen, Ploidiestufen und DNA-Gehalt*. Schriftenreihe für Vegetationskunde. 38, 57-73. Bundesamt für Naturschutz, Bonn
- Greilhuber, J., Temsch, E. M. & Loureiro, J. C. M. (2007). *Nuclear DNA Content Measurement*. In J. Greilhubers, J. Dolezel & J. Suda. *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. (S. 65-101). Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim
- Greilhuber, J., Borsch, T., Müller, K., Worberg, A., Poremski, S., Barthlott, W. (2006). *Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size*. Plant Biology 8: 770-777
- Greilhuber J., Dolezel J., Lysák M.A & Bennett M.D. (2005). *The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents*. Annals of Botany 95: 225-260
- Greilhuber J., Temsch E. M. (2001). *Genome size in Arachis duranensis: a critical study*. Genome. 44(5): 826-830. NRC Research Press
- Hsiao-Ching L. & Tsai-Yun L. (2005). *Isolation of Plant Nuclei Suitable for Flow Cytometry From Recalcitrant Tissue by Use of a Filtration Column*. Plant Molecular Biology Reporter 23: 53-58
- König, C. (1994). *Biometrische und karyosystematische Untersuchungen am Polyploidkomplex Biscutella laevigata – Biosystematic and Ecology*. Series No. 6
- König, C. (1994). *Biometrische und karyosystematische Untersuchungen am Polyploidkomplex Biscutella laevigata*. Wien: Österreichische Akademie der Wissenschaften
- Machatschky-Laurich, B. (1926). *Die Arten der Biscutella L. Sectio Thlaspidium (Med.) DC.* – Bot. Arch. 13: 1-155
- Manton, I. (1934). *The problem of Biscutella laevigata L.* Z. Indukt. Abstammungs- Vererbungsl. 67: 41-57
- Manton, I. (1937). *The problem of Biscutella laevigata : II. The Evidence from Meiosis*. Annals of Botany, 1: 439 - 462
- Pellicer J., Fay M. F., Leitch I. J. (2010). *The largest eukaryotic genome of them all?* Botanical Journal of the Linnean Society 164: 10-15.
- Schönfelder, P. (1968b). *Adalpin – dealpin. Ein historisch-chorologisches Begriffspaar*. Mitteilungen der floristisch-soziologischen Arbeitsgemeinschaft. N. F. Heft 13

- Schönfelder, P. (1970). *Südwestliche Einstrahlungen in der Flora und Vegetation Nordbayerns*. Ber. Bayer.Bot. Ges. 42: 17-100
- Temsch, E. M. (2003). *Genome Size Variation in Plants with Special Reference to the Genus Arachis (Fabaceae), and the Methodological Improvement by Application of a new Optical Immersion-Gel in Flow Cytometry*. Wien: Universität Wien, Department of Systematic and Evolutionary Botany, Faculty Center of Biodiversity.
- Tremetsberge, K., König, C., Samuel, R., Pinsker, W., & Stuessy, T. F. (2002). *Infraspecific genetic variation in Biscutella laevigata (Brassicaceae): new focus on Irene Manton's hypothesis*. Plant Systematics and Evolution. 233: 163-181
- Weiss-Schneeweiss, H. Emadzade, K., Jang, T.-S., Schneeweiss, G.M. (2013). *Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants. Cytogenetic and Genome Research*. Karger AG: Basel
- Weiss-Schneeweiss, H. & Schneeweiss, G.M. (2013). *Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Angiosperms*. Plant Genome Diversity Volume 2, Springer-Verlag: Wien

Elektronische Quellen

Royal Botanic Gardens. (Zugriff: 22.06.2014, 16:24). <http://data.kew.org/cvalues/>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 7. Übersichtskarte mit eingezeichneten Fundortsnummern. (Zugriff 15.05.2014, 12:32).

http://www.welt-atlas.de/map_of_the_alps_politically_1-796